

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038702**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.10.07

(21) Номер заявки
201491813

(22) Дата подачи заявки
2013.03.29

(51) Int. Cl. **C07K 14/18** (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ВЕКТОРНЫЕ ЧАСТИЦЫ, ИМЕЮЩИЕ УЛУЧШЕННУЮ
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСДУКЦИИ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ DC-SIGN**

(31) 13/436,472; 61/666,103; 61/732,756;
61/789,575

(32) 2012.03.30; 2012.06.29; 2012.12.03;
2013.03.15

(33) US

(43) 2015.08.31

(86) PCT/US2013/034640

(87) WO 2013/149167 2013.10.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММЬЮН ДИЗАЙН КОРП. (US)

(72) Изобретатель:
**Николаи Кристофер Джеймс, Тарин
Семих У. (US)**

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

(56) WO-A1-2011011584
WO-A2-2010105251
WO-A2-2008011636

C. GOUJON ET AL.: "Characterization of Simian Immunodeficiency Virus SIVSM/Human Immunodeficiency Virus Type 2 Vpx Function in Human Myeloid Cells", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 82, no. 24, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 12335-12345, XP55066966, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01181-08, the whole document

M. SAEED ET AL.: "Role of the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) Pathway in Degradation of Hepatitis C Virus Envelope Proteins and Production of Virus Particles", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 286, no. 43, 28 October 2011 (2011-10-28), pages 37264-37273, XP55066978, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M111.259085, the whole document

(57) Предложен способ (и его варианты) получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, включающий (а) культивирование в питательной среде, содержащей кифунозин, упаковывающей вирус клетки, и (b) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, где указанные псевдотипированные лентивирусные векторные частицы являются более высокоманнозилированными по сравнению с контрольной композицией из тех же псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных в отсутствие кифунозина.

B1**038702****038702****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет относительно заявки на патент США № 13/436472, поданной 30 марта 2012 г., в настоящее время патент США № 8323662, выданный 4 декабря 2012 г.; и предварительных заявок на патент США под номерами 61/666103, поданной 29 июня 2012 г.; 61/732756, поданной 3 декабря 2012 г. и 61/789575, поданной 15 марта 2013 г., все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Включение материала, поданного в электронном виде, посредством ссылки

Включенный посредством ссылки во всей своей полноте машинно-читаемый перечень аминокислотных/нуклеотидных последовательностей представлен одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: один ASCII (текстовый) файл с названием "46417A_SeqListing.txt" 246173 байт, созданный 29 марта 2013 г.

Область техники

Раскрытие относится к материалам и способам, которые могут использоваться для создания улучшенных псевдотипированных лентивирусных векторных частиц.

Уровень техники

Дендритные клетки (ДК) являются важнейшими антигенпрезентирующими клетками для инициации и контроля иммунных реакций. ДК могут захватывать и обрабатывать антигены, мигрировать от периферии к лимфоидному органу и презентировать антигены отдыхающим Т-клеткам, в главном комплексе гистосовместимости (МНС)-ограниченного вида. Эти клетки получены из костного мозга (КМ) и демонстрируют дендритную морфологию и высокую подвижность. Открытие ДК как специализированных антигенпрезентирующих клеток (АПК) вызвало попытки стратегий иммунизации/вакцинации на основе ДК, включающие нацеливание на ДК для проявления специфических антигенов. Рекомбинантные векторы на основе вирусов были разработаны в качестве механизма для непосредственной доставки к клеткам-хозяевам гена, кодирующего назначенный антиген(ы). Посредством стимулирования желаемого адаптивного иммунного ответа, экспрессируемый генный продукт обеспечивает благоприятный терапевтический эффект.

Задачи достижения безопасной и эффективной системы включают конструирование вектора, который эффективно нацелен на нужный набор клеток-хозяев, обеспечивая подходящую систему доставки, и экспрессирование желаемого антигена для того, чтобы вызвать эффективный иммунный ответ, так что она может быть широко использована в определенной популяции субъектов-людей.

Гликопротеины оболочки вируса Синдбис и других альфавирусов, раскрытых в настоящем документе, включаются в липидный бислой мембраны вирусной частицы. Как правило, вирусная мембрана (оболочка) включает в себя множество копий тримеров, состоящих из двух гликопротеиновых гетеродимеров E1 и E2, которые получают посредством расщепления одного белка-предшественника. Белок-предшественник включает от N- к C-концу белки E3, E2, 6K и E1. Малый гликопротеин E3 служит в качестве сигнальной последовательности для транслокации белка E2 в мембране и отщепляется от E2 при помощи фурина или другой Ca^{2+} -зависимой сериновой протеиназы. Белок 6K служит в качестве сигнальной последовательности для транслокации белка E1 в мембране и затем отщепляется от белка-предшественника. Публикации WO 2008/011636 и US 2011/0064763 раскрывают лентивирусные упаковывающие системы.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что лентивирусные векторные частицы, которые обладают двумя характеристиками (а) псевдотипированы с высокоманнозилированным гликопротеином альфавируса и (б) содержат белок Vpx, обладают неожиданно улучшенной эффективностью трансдукции клеток, экспрессирующих DC-SIGN. Эти частицы инфицируют клетки, экспрессирующие DC-SIGN, в частности дендритные клетки, значительно эффективнее в сравнении с лентивирусными векторными частицами, имеющими только одну из этих двух характеристик. В конкретных случаях представлены высокоманнозилированные псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, которые содержат белок Vpx и лентивирусный геном, содержащий последовательность, представляющую интерес (например, полинуклеотид, кодирующий антиген).

Способы создания псевдотипированных лентивирусных векторных частиц

В одном аспекте настоящего раскрытия представлен способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, включающий: (а) культивирование в питательной среде, содержащей ингибитор маннозидазы, предпочтительно ингибитор маннозидазы I, а также упаковывающую вирус клетку, включающую: (1) геном лентивирусного вектора, содержащий полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген, (2) полинуклеотид, кодирующий гликопротеин альфавируса, который преимущественно связывает клетки, экспрессирующие DC-SIGN и (3) полинуклеотид, кодирующий ингибитор SAMHD1; и (б) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

В другом аспекте настоящего раскрытия представлен способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, включающий:

(а) культивирование в питательной среде, содержащей кифунензин, упаковывающий вирус клетки,

которая включает: (1) геном лентивирусного вектора, содержащий полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген, (2) полинуклеотид, кодирующий гликопротеин E2 вируса Синдбис, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, и (3) полинуклеотид, кодирующий белок Vpx или белок Vpr, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1; и (b) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN. В некоторых вариантах реализации гликопротеин E2 на 90% идентичен SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1]. В некоторых вариантах реализации (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком, и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис. В некоторых вариантах реализации гликопротеин E2 представляет собой SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, белок Vpr содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или вирус-специфический антиген. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE, например, MAGE-A3 и MAGE-A1, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100, gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, например, TRP2, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного gas, реаранжировки bcr/abl, Her2/neu, мутированного p53, p53 дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена, онкобелков Т-антигена вируса клеток Меркеля и альфа-фетопротеина. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, вирус-специфический антиген представляет собой антиген HIV, антиген SIV, антиген аденовирусов, антиген энтеровирусов, антиген коронавируса, антиген калицивирусов, антиген вируса чумы плотоядных, антиген вируса Эбола, антиген флавивирусов, антиген вирусов гепатита, антиген вирусов герпеса, антиген вируса инфекционного перитонита, антиген вирусов гриппа, антиген вирусов лейкемии, антиген вируса Марбург, антиген ортомиксовирусов, антиген вирусов папилломы, антиген вирусов парагриппа, антиген парамиксовирусов, антиген парвовирусов, антиген пестивирусов, антиген пикорнавирусов, антиген вируса полиомиелита, антиген вируса оспы, антиген вируса полиомы, антиген вируса бешенства, антиген реовирусов, антиген ретровирусов или антиген ротавирусов.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который между двумя антигенами содержит саморасщепляющийся пептид A2. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, саморасщепляющийся пептид A2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, первый антиген представляет собой MAGE-A3, а второй антиген представляет собой NY-ESO-1.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,01 мкг/мл до около 1 мг/мл. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,1 до около 1 мкг/мл. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,25 до около 2 мкг/мл.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, упаковывающая вирус клетка дополнительно содержит: (i) полинуклеотид, который содержит гены gag и pol; и (ii) полинуклеотид, который кодирует белок rev. В некоторых или любом из вариантов реализации, опи-

санных в настоящем документе, гены gag и pol оптимизированы для кодона человека и содержат неоптимизированное окно около позиции 1228-1509 SEQ ID NO: 54. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, полинуклеотид, содержащий гены gag и pol, не имеет функционального элемента, чувствительного к rev (RRE). В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, полинуклеотид, содержащий гены gag и pol, не имеет функционального RRE потому что RRE был удален. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, ген pol кодирует неактивный фермент интегразу. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, фермент интегразы имеет мутацию D64V.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, полинуклеотид, кодирующий белок Vpx или белок Vpr, находится на той же или другой плазмиде, что и полинуклеотид, кодирующий белок rev, или полинуклеотид, содержащий гены gag и pol.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора получен из HIV-1.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора имеет инактивированный 3' длинный концевой повтор (LTR) или самоинактивирующийся 3' длинный концевой повтор (LTR). В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора содержит элемент U3 у которого отсутствует по меньшей мере одно из следующих: энхансерная последовательность, TATA-бокс, сайт Sp1, сайт NK-каппа В или полипуриновый тракт (PPT).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21 [SIN вектор], 22 [703 вектор] или 23 [704 вектор].

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания/стимуляции дендритных клеток. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, фактор созревания/стимуляции дендритных клеток выбран из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая антиген, функционально связана с промотором, выбранным из группы, состоящей из промотора убиквитина-С человека (UbiC), немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV) и промотора, чувствительного к тетрациклину. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, промотор представляет собой интрон-дефицитный промотор. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, указанный интрон-дефицитный промотор представляет собой UbiC.

Связанные аспекты настоящего раскрытия представляют лентивирусную векторную частицу, которую производят по любому из способов, указанных выше.

Композиции, содержащие псевдотипированные лентивирусные векторные частицы

В другом аспекте настоящего раскрытия представлена композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, которые содержат (а) ингибитор SAMHD1, (b) экзогенный полинуклеотид, кодирующий антиген и (с) гликопротеин оболочки, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90% N-связанных гликанов в указанной композиции содержат структуру от Man₅ до Man₉, предпочтительно Man₉.

В другом аспекте настоящего раскрытия представлена композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, которые содержат (а) белок Vpx, (b) экзогенный полинуклеотид, кодирующий антиген и (с) гликопротеин оболочки, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом по меньшей мере 80% N-связанных гликанов в указанной композиции содержат структуру Man₉.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая является, по меньшей мере на 80% идентичной белку Vpx SIVmac (SEQ ID NO: 44).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, белок Vpr содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере на 90% идентична SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, псевдотипированная лентивирусная векторная частица инфицирует дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN с эффективностью трансдукции *in vitro*, составляющей по меньшей мере 1%, или по меньшей мере 5%,

или по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 20%. См., например, процедуру в примере 8.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, гликопротеин представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, гликопротеин E2 обладает по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1]. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или вирус-специфический антиген. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE, например MAGE-A3 и MAGE-A1, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100, gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, например, TRP2, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного *ras*, реаранжировки *bcr/abl*, *Her2/neu*, мутированного *p53*, *p53* дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена, онкобелков Т-антигена вируса клеток Меркеля и альфа-фетопротеина. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, вирус-специфический антиген представляет собой антиген HIV, антиген SIV, антиген аденовирусов, антиген энтеровирусов, антиген коронавирусов, антиген калицивирусов, антиген вируса чумы плотоядных, антиген вируса Эбола, антиген флавивирусов, антиген вирусов гепатита, антиген вирусов герпеса, антиген вирусов инфекционного перитонита, антиген вирусов гриппа, антиген вирусов лейкемии, антиген вируса Марбург, антиген ортомиксовирусов, антиген вирусов папилломы, антиген вирусов парагриппа, антиген парамиксовирусов, антиген парвовирусов, антиген пестивирусов, антиген пикорнавирусов, антиген вируса полиомиелита, антиген вируса оспы, антиген вируса бешенства, антиген реовирусов, антиген ретровирусов или антиген ротавирусов.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который между двумя антигенами содержит саморасщепляющийся пептид A2. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, саморасщепляющийся пептид A2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, первый антиген представляет собой NY-ESO-1, а второй антиген представляет собой MAGE-A3.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора получен из HIV-1.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора имеет инактивированный 3' длинный концевой повтор (LTR) или самоинактивирующийся 3' длинный концевой повтор (LTR). В некоторых аспектах геном лентивирусного вектора содержит элемент U3, у которого отсутствует по меньшей мере одно из следующих: энхансерная последовательность, TATA-бокс, сайт Sp1, сайт NK-каппа В или полипуриновый тракт (PPT).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21 [SIN вектор], 22 [703 вектор] или 23 [704 вектор].

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания/стимуляции дендритных клеток. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, фактор созревания/стимуляции дендритных клеток выбран из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

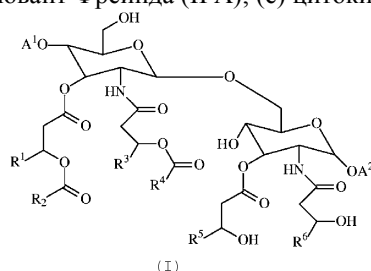
В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, нуклеотидная последовательность, кодирующая антиген, функционально связана с промотором, выбранным из группы, состоящей из промотора убиквитина-С человека (UbiC), немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV) и промотора, чувствительного к тетрациклину. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, промотор представляет собой интрон-дефицитный промотор. В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, указанный интрон-дефицитный промотор представляет собой про-

мотор убиквитина-С человека (UbiC).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, псевдотипированные лентивирусные векторные частицы имеют ИЕ по меньшей мере 10^5 /мл.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, композиция дополнительно содержит иммуностимулирующее средство.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, композиция дополнительно содержит адъювант. Например, как раскрыто в настоящем документе, адъюванты включают квасцы или 3-де-О-ацелированный монофосфорилипид А (MPL). Классы адъювантов, раскрытые в настоящем документе, включают (а) соли алюминия, (b) эмульсионные композиции по типу масло-в-воде, необязательно с другими специфическими иммуностимулирующими средствами, такими как мурамиловые пептиды или другие компоненты стенки бактериальной клетки или без них, (c) сапониновые адъюванты, в том числе ISCOM (иммуностимулирующие комплексы) и ISCOMATRIX; (d) полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA); (e) цитокины и (f) адъюванты формулы (I).



где фрагменты A1 и A2 независимо выбраны из группы, включающей водород, фосфат и фосфатные соли. Натрий и калий являются иллюстративными противоионами для фосфатных солей. Фрагменты R¹, R², R³, R⁴, R⁵ и R⁶ независимо выбраны из группы, включающей гидрокарбил, имеющий от 3 до 23 атомов углерода, представленный C₃-C₂₃. Для большей ясности будет объяснено, что когда фрагмент "независимо выбран из" указанной группы, включающей множество представителей, следует понимать, что представитель, выбранный как первый фрагмент, ни в коей мере не влияет или не ограничивает выбор представителя, выбранного в качестве второго фрагмента. Атомы углерода, к которым присоединяются R¹, R³, R⁵ и R⁶ асимметричны и, таким образом, могут существовать в стереохимической конфигурации R или S. В одном варианте реализации все эти атомы углерода находятся в R стереохимической конфигурации, в то время как в другом варианте реализации все эти атомы углерода находятся в S стереохимической конфигурации.

В различных вариантах реализации настоящего раскрытия, адъювант имеет химическую структуру формулы (I), но фрагменты A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 и R6 выбраны из подмножеств вариантов, представленных для этих фрагментов ранее, где эти подмножества определены ниже посредством E1, E2 и т.д.

E1: A₁ представляет собой фосфат или фосфатную соль, и A₂ представляет собой водород.

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

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

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

E5: R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой C₉-C₁₃-алкил; и R² и R⁴ представляют собой C₁₁-C₁₅-гидрокарбил.

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

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

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

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

E10: R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой ундецил, и R² и R⁴ представляют собой тридецил.

В некоторых вариантах реализации каждый из E2-E10 объединен с вариантом реализации E1 и/или гидрокарбильные группы E2-E9 представляют собой алкильные группы, предпочтительно алкильные группы с прямой цепью.

Предпочтительным адъювантом является E1 в комбинации с E10, при этом (i) A₁ представляет собой фосфат или фосфатную соль, и A₂ представляет собой водород и (ii) R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой ундецил, а R² и R⁴ представляют собой тридецил.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, гликопротеины оболочки также связывают клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1.

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, псевдотипированные лентивирусные векторные частицы также более эффективно трансдуцируют клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1 по сравнению с клетками, не экспрессирующими мышинный SIGNR1.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из нижеследующего подробного описания. Тем не менее, следует иметь в виду, что подробное описание и конкретные примеры хотя и указывают на конкретные варианты реализации настоящего раскрытия, представлены только для иллюстрации, поскольку в пределах сущности и объема настоящего изобретения возможны различные изменения и модификации, которые будут очевидны специалистам в данной области техники из этого подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A и 1B проиллюстрирована способность псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных в присутствии различных ингибиторов маннозидазы (например, кифунензина, DMNJ и свайнсонина), инфицировать клетки HT1080, стабильно экспрессирующие рецептор DC-SIGN (1A) или с отсутствием DC-SIGN (1B). Эффективность инфицирования оценивали путем определения экспрессии GFP в лентивирусном векторе. На оси у представлен процент GFP-положительных клеток.

На фиг. 2A и 2B проиллюстрирована способность псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных в присутствии 400 мкг/мл DMNJ или различных концентраций кифунензина, инфицировать клетки HT1080, стабильно экспрессирующие рецептор DC-SIGN (2A) или с отсутствием DC-SIGN (2B). Эффективность инфицирования оценивали так, как показано на фиг. 1.

На фиг. 3A представлена схема, иллюстрирующая специфичность субстрата для PNGазы F и ЭндоН. PNGаза F представляет собой общую эндогликозидазу, которая будет расщеплять все N-связанное гликозилирование независимо от профиля гликозилирования. ЭндоН является специализированной эндогликозидазой, которая будет расщеплять только высокоманнозное N-связанное гликозилирование. ЭндоН расщепляет только высокоманнозное N-связанное гликозилирование (т.е. ЭндоН будет направлена на 2 из 4 сайтов на SINVar1 при отсутствии кифунензина и на 4 из 4 сайтов SINVar1 в присутствии кифунензина). На фиг. 3B проиллюстрированы результаты эксперимента для определения статуса гликозилирования гликопротеинов на псевдотипированных лентивирусных векторных частицах, полученных в присутствии кифунензина или DMNJ с помощью анализа изменения подвижности в геле при проведении ДСН ПААГЭ и иммуноблоттинга с антителом против вирусной оболочки Синдбис.

На фиг. 4A проиллюстрирована способность псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных в присутствии 400 мкг/мл DMNJ или различных концентраций кифунензина, инфицировать клетки HT1080, стабильно экспрессирующие рецептор DC-SIGN. Эффективность инфицирования оценивали так, как показано на фиг. 1. На фиг. 4B проиллюстрированы результаты эксперимента для определения статуса гликозилирования гликопротеинов E2 на псевдотипированных лентивирусных векторных частицах, полученных, как показано на фиг. 4A.

На фиг. 5A представлены результаты вестерн-блоттинга (анти-НА) НА-меченого SIVmacVpx, экспрессированного в клетках 293T, который клонировали в вектор экспрессии млекопитающих под контролем промотора CMV (конструкт с названием рENV-SIVmacVpx). На фиг. 5B представлены результаты вестерн-блоттинга (анти-НА) вирусных белковых экстрактов из вирусных частиц, содержащих НА-меченый SIVmacVpx. Для иммуноблоттинга с антителом к НА на гель загружали 100 нг р24 на лунку. Антитело к р24 использовали в качестве контроля загрузки.

На фиг. 6 представлен график рассеяния событий трансдукции, измеряемых посредством селекции на дендритных клетках, которые были положительны в отношении CD11c и оценки процента клеток, положительных в отношении GFP (ось x; как результат инфицирования VSV-G псевдотипированным интеграционно-дефектным лентивирусом с или без Vpx) с DC-SIGN на оси y.

На фиг. 7 представлен график рассеяния событий трансдукции, измеряемых посредством селекции на дендритных клетках, которые были положительны в отношении CD11c и оценки процента клеток, положительных в отношении GFP (ось x; как результат инфицирования VSV-G псевдотипированным интеграционно-компетентным лентивирусом с или без Vpx) с DC-SIGN на оси y.

На фиг. 8 представлен график рассеяния событий трансдукции, измеряемых посредством селекции на дендритных клетках, инфицированных интеграционно-дефектным лентивирусом с или без Vpx, псевдотипированным SINvar1, и полученным в присутствии или отсутствии кифунензина. На оси y представлено количество клеток, которые были положительными в отношении CD11c или DC-SIGN, а на оси x представлено процентное количество клеток, положительных в отношении GFP.

На фиг. 9A представлены результаты вестерн-блоттинга гликопротеинов вируса Синдбис, полученных согласно примеру 1 без обработки (дорожки 1-3), 400 мкг/мл DMNJ (дорожки 4-6) или 1 мкг/мл кифунензина (дорожки 7-9). Частицы не обрабатывали эндогликозидазой (дорожки 1, 4, 7), инкубировали с ЭндоН в течение 1 ч (дорожки 2, 5, 8) или инкубировали с PNGазой F в течение 1 ч (дорожки 3, 6, 9). Затем образцы анализировали с помощью анализа изменения подвижности в геле и иммуноблоттинга с антителом к оболочке вируса Синдбис. На фиг. 9B (без ингибитора маннозидазы) представлен профиль интенсивности каждой полосы из дорожек 1-3 и его положение на дорожке. На фиг. 9C (обработка DMNJ) представлен профиль интенсивности каждой полосы из дорожек 4-6 и его положение на дорожке.

На фиг. 9D (обработка кифунензином) представлен профиль интенсивности каждой полосы из дорожек 7-9 и его положение на дорожке.

Что касается фиг. 10A, клетки 293T huDC-SIGN трансдуцировали векторами, упакованными с дикого типа (WT) или дефектной интегразой (D64V) и векторным геномом, содержащим расширенную делецию 3'PPT (703) или 3'PPT (704). Через 48 ч после трансдукции выполняли гнездовой Alu-ПЦР анализ ДНК, экстрагированной из трансдуцированных клеток. Столбики ошибок указывают стандартную ошибку среднего значения трансдукции, выполненных в трех повторностях. На фиг. 10B и 10C продемонстрирован уровень интеграции векторов WT/703 и D64V/704, кодирующих GFP-T2A-NeoR с помощью двух независимых способов. Что касается фиг. 10B, клетки HT1080 huDC-SIGN трансдуцировали с серийными разведениями указанных векторов. Трансдуцированные клетки выращивали при селекции G418, и подсчитывали устойчивые к неомицину колонии, представляющие отдельные события интеграции. События интеграции рассчитывали так, как описано в примере 10. Что касается фиг. 10C, клетки HT1080 huDC-SIGN трансдуцировали указанными векторами. Проточную цитометрию проводили в множественных точках времени после трансдукции, чтобы определить процент клеток, экспрессирующих GFP. Столбики ошибок указывают стандартную ошибку среднего значения проточной цитометрии в трех повторностях.

Фиг. 11: МКПК человека обрабатывали GM-CSF и IL-4 в течение 3 дней, а затем инкубировали с 20 нг р24 ID-VP02, кодирующего GFP. Во время добавления вектора, культура состояла главным образом из ДК, В-клеток и Т-клеток. Через три дня после трансдукции, клетки анализировали в отношении поверхностных маркеров и классифицировали как ДК (CD11c^{полож}) 6%, В-клетки (CD11c^{отр}, CD19^{полож}) 10% или Т-клетки (CD11c^{отр}, CD3ε^{полож}) 80%. События трансдукции измеряли посредством оценки процента положительных в отношении GFP клеток в каждой популяции клеток. Числа на графиках представляют процент клеток в пределах GFP⁺ селекции.

Фиг. 12: часть генома вектора (вверху) представлена как содержащая длинные концевые повторы (LTR) на каждом конце. Сайты донора сплайсированного фрагмента (SD) и акцептора сплайсированного фрагмента (SA) фланкируют сигнал упаковки пси (ψ), частичную gag последовательность и Rev-чувствительный элемент (RRE). Компоненты между промотором антигена (промотор) и 3' LTR не выделены, и поэтому используются знаки в виде косой черты (/). Представлена часть WT gag/pol (посередине), демонстрирующая гены gag (черный прямоугольник) и pol (серый прямоугольник) с последующим RRE. Два компонента, которые являются гомологичными между WT gag/pol и векторным геномом (RRE и первыми 354 п.о. gag) представлены в скобках (без соблюдения масштаба). Предполагаемая область рекомбинации между векторным геномом и WT gag/pol показана соединительными линиями. Представлена часть RI gag/pol (снизу), демонстрирующая кодон-оптимизированные гены gag и pol (белые прямоугольники, чтобы отличить от дикого типа). Не кодон-оптимизированный сдвиг рамки считывания между gag и pol генами представлен в его нативной последовательности кодонов (перекрытия черных и серых прямоугольников). Праймеры, используемые для анализа рекомбинации psi-gag, показаны с их приблизительными местоположениями в конструктах. Праймеры ПЦР первого раунда представлены закрытыми стрелками и являются парами 709 и 710 (для детектирования psi-gag рекомбинанта) или 709 и 378 (для детектирования интегрированного векторного генома). Ожидаемый ампликон для интегрированного вектора с парами праймеров 709 и 378 составляет 1697 п.о. Праймеры гнездовой ПЦР представлены открытыми стрелками и являются парами 863 и 835 (для детектирования psi-gag рекомбинанта с WT gag/pol) или 863 и 864 (для детектирования psi-gag рекомбинации с RI gag/pol). Ожидаемый ампликон с любой из рекомбинантных пар праймеров psi-gag составляет 937 п.о.

На фиг. 13: клетки 293T трансфецировали плазмидами WT gag/pol или RI gag/pol в присутствии либо плазмиды Rev (+) или плазмиды с пустым остовом (-). Через двадцать четыре часа клетки лизировали и анализировали на экспрессию белков Gag с использованием антитела к р24.

Необработанный белок Gag (p55) и р24 указаны стрелками. Лизат из нетрансфецированных клеток был включен в качестве контроля. Одинаковая загрузка лунок была подтверждена с помощью антитела к актину.

На фиг. 14A: GFP-кодирующий вектор получали с двумя количествами плазмид (6 или 3 мкг) или WT gag/pol или RI gag/pol. Полученные в результате уровни р24 в супернатанте вектора показаны в таблице. На фиг. 14B: клетки 293T подвергали трансдукции 2-кратными разведениями векторов, полученных в 14A и анализировали на экспрессию GFP через 2 дня. Рассчитывали GFU/мл и наносили на ось у. Количество в мкг плазмиды gag/pol, используемое для получения вектора (6 мкг или 3 мкг) наносили на ось х. WT gag/pol и RI gag/pol приведены в виде черных или белых столбцов соответственно.

На фиг. 15: мышей линии C57BL/6 иммунизировали указанными дозами (2×10^7 , 1×10^8 или 5×10^8 TE) ЛВ, кодирующего полноразмерный OVA или только носителем HBSS. ЛВ были либо интеграционно-компетентным (ИНТ+) или интеграционно-дефицитным (ИНТ-) и полученным либо с WT- или RI gag/pol, как указано. На 12 день после иммунизации процент OVA₂₅₇-специфических селезеночных Т-клеток CD8 измеряли посредством ВОЦ для IFN-γ после пептидной рестимуляции ex vivo.

На фиг. 16: мышей линии C57BL/6 (5 на группу) иммунизировали 5×10^8 TE интеграционно-

дефицитного (ИНТ-) ЛВ, полученного или с WT или RI gag/pol, кодирующим полиэпитопный антиген (LV1b) который содержит H-2^b-ограниченный OVA₂₅₇ CD8 Т клеточный эпитоп, а затем на 28 день после иммунизации подвергали воздействию 1×10^7 TCID₅₀ (инфекционная доза для тканевой культуры) дикого типа WR-штамма вакцинного вируса (VV-WT), WR-штамма рекомбинантного OVA вакцинного вируса (rVV-OVA), или ничем не воздействовали. На 33 день (5 день после испытания) вирусную нагрузку в яичниках каждого животного измеряли с помощью анализа TCID₅₀.

На фиг. 17А: клетки 293Т подвергли трансдукции векторами WT gag/pol или RI gag/pol. Через два дня геномную ДНК выделяли и анализировали на интегрированную провирусную ДНК посредством анализа ПЦР с использованием пары праймеров 709 и 378, которая связывается в геноме вектора, как схематически показано на фиг. 12. ПЦР-продукты визуализировали на 1% агарозном геле. Размер ампликона векторного генома обозначен стрелкой. Контроль матрицы не был включен в ПЦР и гель. На фиг. 17В: геномную ДНК с фиг. 17А анализировали на провирусные рекомбинанты psi-gag с помощью первого раунда ПЦР с последующей гнездовой ПЦР. В первом раунде ПЦР используются пары праймеров 709 и 710, которые связываются в векторном геноме и сдвиг рамки считывания в пределах gag/pol соответственно. 1 мкл продукта первого раунда ПЦР использовали в качестве матрицы в гнездовой ПЦР или в неразбавленном виде (1:1), или в разведениях 1:100 или 1:1000. Пары праймеров для гнездовой ПЦР представляли собой или 863 и 835, или 863 и 864. Первая пара (863, 835) связывается в векторном геноме и WT gag/pol соответственно. Последняя пара (863, 864) связывается в векторном геноме и RI gag/pol. Все праймеры и их сайты связывания схематически изображены на фиг. 12. Были включены только контроли матрицы. Полученные в результате гнездовой ПЦР продукты визуализировали на 1% агарозном геле. Размер ампликона рекомбинанта psi-gag показан стрелкой. На фиг. 17С: полосу из гнездовой ПЦР для WT gag/pol (светлая полоса ниже 1 кб) клонировали в вектор ТОРО-ТА и секвенировали.

Последовательность полосы рекомбинанта WT gag/pol psi-gag показана с областями, отмеченными для выравнивания с векторным геномом, частичным gag или WT gag/pol. Двойные косые линии (//) и точки указывают на последовательности, которые не показаны для простоты. Цифры на последовательности указывают положение нуклеотидов на ампликоне. Пары оснований 1-414 рекомбинанта psi-gag выравниваются с геномом вектора, тогда как п.о. 120-937 выравниваются с WT gag/pol. Для справки, частичная gag последовательность представляет собой п.о. 76-439 рекомбинанта. На фиг. 17D: полосу из гнездовой ПЦР для RI gag/pol (слабая полоса между 1 и 3 кб) клонировали в вектор ТОРО-ТА и секвенировали. Последовательность полосы рекомбинанта RI gag/pol показана с областями, отмеченными для выравнивания с векторным геномом или RI gag/pol. Точки указывают на последовательности, которые не показаны для простоты. Цифры на последовательности указывают положение нуклеотидов на ампликоне. Пары оснований 1-1253 рекомбинанта RI выравниваются с геномом вектора, тогда как п.о. 1254-1329 выравниваются с RI gag/pol. Для справки, частичная gag последовательность представляет собой п.о. 76-439 рекомбинанта. Полная последовательность и выравнивание показаны на (дополнительной фиг. S1B).

На фиг. 18: клетки HT1080 и клетки HT1080, стабильно экспрессирующие (А) человеческий DC-SIGN (HT1080 huDC-SIGN), (В) мышинный SIGNR1 (HT1080 mSIGNR1), (С) мышинный SIGNR3 (HT1080 mSIGNR3) или (D) мышинный SIGNR5 (HT1080 mSIGNR5) инкубировали с концентрированным (1000-кратно) интеграционно-дефицитным псевдотипированным вектором VSV-G, кодирующим GFP или псевдотипированными векторами ID-VP02, кодирующими GFP, которые получали или в присутствии или при отсутствии кифунизина (кифу).

На фиг. 19А: экспрессию SIGNR1 и SIGNR5 на селезеночных и лимфатических клетках анализировали на событиях живых одиночных клеток. Продемонстрирован образец контрольного окрашивания с отсутствием специфических антител SIGNR1 или SIGNR5. На фиг. 19В: события живых одиночных клеток из селезенки и лимфатических узлов были разделены на В-клетки (B220 + TCRβ⁻, меченый R4), Т-клетки (TCRβ⁺, B220⁻, меченый R5) и ДК (B220⁻ TCRβ⁻ MHC-II⁺ CD11c^{hi}, меченый R7), а затем проанализированы на экспрессию SIGNR5 и SIGNR1. Для всех подмножеств частота положительных событий составляла ≤0,00 в негативных контролях без специфических антител SIGNR1 и SIGNR5.

На фиг. 20: фенотип GFP-экспрессирующих клеток в дренированном лимфатическом узле после подкожной инъекции ID-VP02, кодирующего GFP, анализировали с помощью проточной цитометрии. Самкам мышей линии BALB/c (15 на группу) вводили подкожно в подушечку лапы с помощью инъекции 3×10^{10} геномов ID-VP02, кодирующих GFP, контрольный ID-VP02, кодирующий нефлуоресцентный белок, или ничего не вводили. Через четыре дня подколенные и шейные лимфатические узлы отдельно объединяли от 5 мышей (3 пула на группу лечения) и анализировали на присутствие клеток, экспрессирующих GFP. (А) Живые синглетные события из подколенных (дренирующих) или шейных (не дренирующих) лимфатических узлов анализировали на экспрессию GFP. Клетки подколенного лимфатического узла от наивного или отрицательного контроля ID-VP02 служили в качестве отрицательных контролей. (В) Частота CD11c⁺ и MHC-II⁺ на GFP⁺ событиях из подколенных лимфатических узлов мышей, которым инъекционно вводили ID-VP02, кодирующий GFP, показаны черными точками, наложенными на общие события B220⁻TCRβ⁻, показанные серым цветом, посредством ссылки. (С) Экспрессия SIGNR1 на GFP⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ событиях показана с (левая панель) и без (правая панель) включения SIGNR1-

специфических антител. Статистика селекции представляет собой среднее значение трех биологических повторностей. Значения на панели (А) являются количеством положительных событий на 1×10^6 клеток, в то время как все другие значения селекции представляют собой проценты.

На фиг. 21: мыши линии C57BL/6 (3 на группу) получали однократную подкожную инъекцию 3×10^{10} геномов ID-VP02 в основание хвоста. Биораспределение, как определено по наличию обратно транскрибированного ДНК вектора ID-VP02 в указанных тканях, оценивали посредством количественной ПЦР через 1, 4, 8, 21, или 42 дня после инъекции. Паховые и шейные лимфатические узлы обозначены как дренирующие и не дренирующие соответственно. Вводимую ДНК нормализовали до 200 нг. Предел количественного определения (ПКО) из 10 копий на реакцию определялся наименьшим числом копий на стандартной кривой. Образцы, которые не амплифицировали в 40 циклах количественной ПЦР, были обозначены как не детектируемые (НД).

На фиг. 22: (А) мышей линии C57BL/6 иммунизировали указанными дозами (векторные геномы) ID-VP02, кодирующего полноразмерный OVA или только носителем HBSS. На 12 день после иммунизации процент OVA₂₅₇-специфических селезеночных Т-клеток CD8 измеряли посредством ВОЦ. (В) Кинетики первичного и вторичного ответа Т-клеток CD8 на ID-VP02, кодирующий OVA, определяли путем иммунизации мышей (5 на группу) 1×10^{10} геномов ID-VP02 в режиме примирования-буста с 35 дневным интервалом, и анализировали ответы Т-клеток CD8 селезенки в указанных временных точках. График иммунизации был построен таким образом, чтобы все группы были проанализированы с помощью ВОЦ в один и тот же день. (С) Репрезентативное внутриклеточное окрашивание IFN- γ , TNF- α и IL-2 и поверхностное окрашивание CD107a на жизнеспособных Т-клетках CD8 после пептидной рестимуляции. (D) Частота Т-клеток CD8, экспрессирующих комбинации IFN- γ , TNF- α , IL-2 и CD107a около пика и после уменьшения первичных и вторичных ответов. Незначительные количества Т-клеток CD8, которые были IFN- γ отрицательными, экспрессировавшими любую другую эффекторную молекулу. (Е) Эффекторный/памяти фенотип CD44^{hi} H-2K^b-OVA₂₅₇ пентамер⁺ Т-клеток CD8 оценивали путем окрашивания CD127 и KLRG1 в указанных временных точках.

Фиг. 23: (А) Схема эксперимента: мышей линии C57BL/6 (5 на группу) иммунизировали 5×10^{10} , 1×10^{10} или 2×10^9 векторных геномов ID-VP02, кодирующих полиэпитопный антиген (LV1b), который содержит H-2^b-ограниченный OVA₂₅₇ и LCMV GP₃₃ CD8 Т-клеточные эпитопы, а затем на 35 день после иммунизации подвергали воздействию 1×10^7 TCID₅₀ дикого типа WR-штамма вакцинного вируса (VV-WT), WR-штамма рекомбинантного OVA вакцинного вируса (rVV-OVA), или ничем не воздействовали. На 40 день (5 день после испытания) измеряли ответы Т-клеток CD8 селезенки и вирусную нагрузку в яичниках. (В) OVA₂₅₇- и LCMV GP₃₃-специфические ответы Т-клеток CD8 измеряли посредством окрашивания внутриклеточного IFN- γ и TNF- α после пептидной рестимуляции *ex vivo*. Показаны репрезентативные точечные диаграммы цитокинового профиля Т-клеток CD8. (С) Частота OVA₂₅₇-специфичных IFN- γ + Т-клеток CD8 для каждого животного. (D) Вирусная нагрузка (измеренная при помощи анализа TCID₅₀) в яичниках каждого животного.

На фиг. 24: (А) мышей линии BALB/c (5 на группу) иммунизировали указанными дозами в векторных геномах: ID-VP02, кодирующего АН1А5, гетероклитического мутанта эпитопа АН1 отторжения эндогенной опухоли СТ26, связанного с OVA (OVA-АН1А5) или только носителем HBSS. На 12 день после иммунизации процент АН1А5- или АН1-специфических селезеночных Т-клеток CD8 измеряли посредством ВОЦ. (В) Через двенадцать дней после иммунизации иммунизированным и нативным мышам (3 на группу) внутривенно вводили смесь 1:1:1 меченных красителем клеток-мишеней, каждую инкубированную с АН1, АН1А5 или контрольным пептидом. На следующий день отбирали селезенки и относительное восстановление каждой популяции сравнивали между нативными и иммунизированными мышами, чтобы рассчитать специфическое уничтожение. (С) Мышей BALB/c (10 на группу) иммунизировали 4×10^9 векторных геномов ID-VP02, кодирующих OVA-АН1А5. Через четыре недели мышам с помощью инъекции вводили подкожно 8×10^4 клеток опухоли СТ26 в правый бок, и мышей умерщвляли, когда размер опухоли превышал 100 мм². (D) Терапевтическая иммунизация: мышам линии BALB/c (10 на группу) с помощью инъекции вводили подкожно 8×10^4 клеток опухоли СТ26. Через четыре дня мышей или иммунизировали 4×10^9 векторных геномов ID-VP02, кодирующих OVA-АН1А5 или ничего не вводили и мышей умерщвляли, когда размер опухоли превышал 100 мм².

Подробное описание изобретения

Раскрытие относится к материалам и способам, пригодным для создания псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, которые эффективно связывают и продуктивно инфицируют клетки, экспрессирующие DC-SIGN (например, дендритные клетки). Способы и материалы в настоящем описании относятся к неожиданному открытию того, что комбинация белка Vpx в лентивирусной векторной частице с высокоманнозилированными (например, посредством культивирования упаковывающих вирус клеток в присутствии кифуназина) гликопротеинами альфавируса (например, гликопротеинами вируса Синдбис) в оболочке приводит к получению лентивирусных векторных частиц, которые инфицируют неделящиеся клетки, экспрессирующие DC-SIGN (например, дендритные клетки) значительно более эффективно, чем лентивирусные векторные частицы, в которых в оболочке отсутствует белок Vpx или вы-

сокоманнозилированные гликопротеины. Одним предпочтительным аспектом настоящего раскрытия является то, что лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с гликопротеином E2 вируса Синдбис и полученные в присутствии кифуенезина, значительно более эффективно инфицируют дендритные клетки, если частицы также содержат в вирионе белок Vpx, что предоставляет возможность доставки и экспрессии последовательности, представляющей интерес (например, полинуклеотида, кодирующего антиген) к дендритной клетке.

Определения

Термин "функциональный фрагмент", при использовании в отношении полипептида, означает усеченный полипептид, т.е. с отсутствием одной или более аминокислот от N-конца или C-конца, и который сохраняет желаемую активность. При использовании со ссылкой на белок Vpx, "функциональный фрагмент" означает фрагмент, который сохраняет способность ингибировать активность SAMHD1. Этот термин может аналогично быть применен к усеченным полинуклеотидам.

Термин "вариант" при использовании в отношении полипептида означает полипептид, который имеет одну или несколько замен, делеций или инсерций по отношению к родительскому полипептиду. В некоторых случаях вариант представляет собой тот, который сохраняет желаемую активность. При использовании со ссылкой на белок Vpx, "функциональный вариант" означает вариант, который сохраняет способность ингибировать активность SAMHD1. Этот термин может аналогично быть применен к полинуклеотидам, которые имеют одну или несколько замен, делеций или инсерций по отношению к родительскому полинуклеотиду.

Как используется в настоящем документе, термин "консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую аналогичные свойства, например размер, заряд, гидрофобность, гидрофильность и/или ароматичность, и включает обмены, указанные ниже:

Исходная	Иллюстративная
Ala (A)	val; leu; ile
Arg (R)	lys; gln; asn
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln
Asp (D)	glu; asn
Cys (C)	ser; ala
Gln (Q)	asn; glu
Glu (E)	asp; gln
Gly (G)	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; норлейцин
Leu (L)	норлейцин; ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg; gln; asn
Met (M)	leu; phe; ile
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr
Pro (P)	ala
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr; phe
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; норлейцин

Аминокислотные остатки, которые имеют общие свойства боковых цепей, часто группируют следующим образом.

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислые: asp, glu;
- (4) основные: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Используемые в настоящем документе термины "интеграционно-дефицитный" и "интеграционно-дефектный" применяются взаимозаменяемо. Интеграционно-дефицитный вирусный вектор представляет собой тот, который по меньшей мере 10-кратно (предпочтительно, по меньшей мере 20-кратно, по меньшей мере 30-кратно, по меньшей мере 40-кратно, по меньшей мере 50-кратно, по меньшей мере 60-кратно, по меньшей мере 70-кратно, по меньшей мере 80-кратно, по меньшей мере 90-кратно, по меньшей мере 100-кратно, по меньшей мере 150-кратно, по меньшей мере 200-кратно, по меньшей мере 250-

кратно, по меньшей мере 300-кратно, по меньшей мере 350-кратно, по меньшей мере 400-кратно, по меньшей мере 450-кратно, по меньшей мере 500-кратно, по меньшей мере 550-кратно, по меньшей мере 600-кратно, по меньшей мере 650-кратно, по меньшей мере 700-кратно, по меньшей мере 750-кратно, по меньшей мере 800-кратно, по меньшей мере 850-кратно, по меньшей мере 900-кратно, по меньшей мере 950-кратно или по меньшей мере 1000-кратно) менее эффективен при интеграции, чем интеграционно-компетентный вирусный вектор. Например, интеграционно-дефицитный может означать, по меньшей мере, от около 20-кратной до около 100-кратной меньшую эффективность при интеграции по сравнению с вирусным вектором, который не был модифицирован для того, чтобы стать интеграционно-дефектным. Интеграция может быть измерена любым способом, известным в данной области техники, например, путем ПЦР детектирования интеграционных событий вблизи элемента *Alu*.

"Псевдотипированный" лентивирус представляет собой лентивирусную частицу, имеющую один или более оболочечных гликопротеинов, которые кодируются вирусом, отличающимся от лентивирусного генома. Гликопротеин оболочки может быть модифицированным, мутированным или сконструированным, как описано в настоящем документе.

Как используется в настоящем документе, термин "экзогенный антиген" относится к антигену, который был сконструирован с помощью генной инженерии для экспрессии в лентивирусных векторах, раскрытых в настоящем документе. Соответственно, термин явно включает антигены, полученные из HIV, которые были генетически модифицированы для экспрессии в лентивирусных векторах, раскрытых в настоящем документе.

Как используется в настоящем документе, гликопротеин E2 вируса Синдбис, который "преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN" представляет собой гликопротеин, который связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN более эффективно, чем с клетками, которые не экспрессируют DC-SIGN.

Белок оболочки вируса Синдбис содержит четыре N-связанных гликана - два на белке E2 и два на белке E1. Два N-гликана вируса, полученного в клетках млекопитающих в отсутствие ингибитора маннозидазы I, имеют высокоманнозную структуру (один N-связанный гликан E2 и один N-связанный гликан E1), в то время как остальные два имеют сложную структуру. Два N-гликана со сложной структурой экспонированы на поверхности белка оболочки, в то время как два N-гликана с высокоманнозной структурой залегают в центре тримера оболочечных белков. См. публикацию Morizono et al., *J Virol*, 84:14, 6923-34 (2010), включенную в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, как правило, 50% N-связанных гликанов на вирусной частице с гликопротеином вируса Синдбис, полученным в клетках млекопитающих, будут иметь высокоманнозную структуру. "Высокоманнозильрованная" вирусная частица представляет собой частицу, в которой, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% N-связанных гликанов на гликопротеинах вирусной оболочки содержат, по меньшей мере, структуру Man₅, предпочтительно, Man₉, измеренную, например, посредством масс-спектрометрии (см. Crispin et al., *JBC* 2009).

Ингибиторы SAMHD1

Vpx и Vpr

В некоторых или любом из вариантов реализации ингибитор SAMHD1 представляет собой белок Vpx или белок Vpr. Vpx кодируется среди прочих вирусами HIV-2, SIV обезьян вида черной мангабей (SIVsm), SIV обезьян вида красноголовый мангабей (SIVrcm) и SIV макака (SIVmac). Vpx HIV-2 и SIV представляет собой белок из 112 аминокислот (aa), 18 кДа, упакованный в вирион в значительных количествах через его взаимодействие с областью p6 предшественника p55^{gag}. Недавно было продемонстрировано, что Vpx ингибирует активность SAMHD1, фактора рестрикции, экспрессированного в дендритных и миелоидных клетках человека. Laguette et al., *Nature*, 474, 654-657 (2011). SAMHD1 был идентифицирован как фактор рестрикции, который приводит в значительной степени к невосприимчивости дендритных и миелоидных клеток человека к HIV-1 инфекции.

Vpx из SIV и HIV-2 на 83% идентичны на аминокислотном уровне. См. публикацию Goujon et al., *J Virol*, 82:24, 12335-12345 (2008). Соответственно можно предположить, что отличающиеся между SIV и HIV-2 остатки не являются важными для функционирования Vpx. Кроме того, мутационный анализ Vpx из SIV и HIV-2 был проведен другими исследователями, и может быть использован в качестве руководства при генерации вариантов Vpx для использования в материалах и способах по настоящему раскрытию. См. публикацию Goujon et al. Мутанты Asn26Ala, Ser52Ala и Ser63Ala/Ser65Ala не влияют на функцию Vpx. Делеция мутаций богатых пролином C-концевых 11 остатков Ser13Ala, Lys84Ala/Lys85Ala, Thr17Ala, Thr28Ala, Gly86Ala/Cys87Ala, Ser13Ala/Thr17Ala/Thr28Ala, His39Ala и Tyr66Ala/Tyr68Ala/Tyr71Ala, Trp49Ala/Trp53Ala/Trp56Ala и Lys68Ala/Lys77Ala уничтожает активность Vpx.

В некоторых или любом из вариантов реализации лентивирусные векторные частицы, описанные в настоящем документе, содержат белок Vpx или его вариант. В некоторых или любом из вариантов реализации вариант сохраняет способность ингибировать SAMHD1. В некоторых или любом из вариантов реализации указанный вариант включает в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 45 (SIVsm Vpx). В некоторых или любом из вариантов

реализации указанный вариант включает в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 46 (SIV_{rcm} Vpx). В некоторых или любом из вариантов реализации указанный вариант включает в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 44 (SIV_{mac} Vpx). В некоторых или любом из вариантов реализации указанный вариант включает в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 47 (HIV-2).

Анти-SAMHD1 активность Vpx была локализована в N-концевых 86 остатках Vpx. Gramberg et al., *J Virol*, 84:3, 1387-1396. Соответственно, в некоторых или любом из вариантов реализации функциональный фрагмент содержит ингибиторную область SAMHD1 Vpx, т.е. аминокислотные остатки 1-86 SEQ ID NO: 44.

В то время как Vpx присутствует только в некоторых лентивирусах, все лентивирусы приматов кодируют ген, тесно связанный с Vpx, который называется Vpr. Как известно, Vpr вызывает остановку клеточного цикла. Недавно, тем не менее, белки Vpr, выделенные из SIV_{deb} и SIV_{mus}, продемонстрировали ингибирование SAMHD1 человека. Lim et al., *Cell Host & Microbe*, 11, 194-204 (2012). Соответственно, в некоторых или любом из вариантов реализации лентивирусные векторные частицы, описанные в настоящем документе, содержат SAMHD1-ингибирующий белок Vpr или его вариант, который сохраняет способность ингибировать SAMHD1. В некоторых или любом из вариантов реализации указанный вариант включает в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 48 (SIV_{deb} Vpr). В некоторых или любом из вариантов реализации указанный вариант включает в себя аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90 или 95% идентичную SEQ ID NO: 49 (SIV_{mus} Vpr).

Информация из выравниваний последовательности белков Vpx может быть использована для создания функциональных вариантов и функциональных фрагментов вариантов Vpx, как определено выше. Способы делеции и мутации аминокислот хорошо известны в данной области техники. См. публикацию Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, (1998), включая все дополнения до 2011 г. Обычно для того, чтобы сконструировать функциональные варианты, неконсервативные или консервативные замены или делеции могут быть введены в положениях, которые отличаются между вирусами, кодирующими белок Vpx, поскольку эти положения, как правило, позволяют неконсервативные замены, при этом сохраняя функцию. Для положений с аминокислотными остатками, сохраняющимися среди вирусов, остаток либо сохраняется или вводятся консервативные замены. Vpx, Vpr и их варианты исследуют на способность ингибировать активность SAMHD1 в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, или известными в данной области техники. См. публикации Lim et al., *Cell Host & Microbe*, 11, 194-204 (2012) и Lahouassa et al., *Nature Immunol*, 13:3, 223-229 (2012), которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Несмотря на предыдущие сообщения, свидетельствующие, что упаковка SIV_{mac} Vpx в вирионы HIV-1 требует модификации области р6 белка Gag, чтобы иметь сходство с р6 SIV_{mac} (Sunseri et al., *J Virol*, 86:6 (2012)), авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что SIV_{mac} Vpx эффективно упаковывается в псевдотипированные лентивирусные векторы на основе HIV-1, раскрытые в настоящем документе, без необходимости модификации р6 или слияния Vpx с Vpr HIV-1. Соответственно в некоторых или любом из вариантов реализации белок Vpx не слит с белком Vpr. Подобным образом, в некоторых или любом из вариантов реализации белок gag в упаковывающей клетке не модифицирован в сравнении с его нативной последовательностью.

В некоторых или любом из вариантов реализации белок Vpx слит с белком Vpr HIV-1.

Как правило, белок Vpx упакован в вирусной частице. Тем не менее, в некоторых или любом из вариантов реализации ген, кодирующий белок Vpx, включен в геном лентивирусов и экспрессируется, когда вирусные частицы инфицируют клетки-мишени.

Оболочка вирусного вектора

Вирусы, переносимые членистоногими (Арбовирусы) представляют собой вирусы, которые передаются хозяину, такому как люди, лошади или птицы, инфицированным вектором членистоногих, таких как комар. Арбовирусы в свою очередь делятся на подсемейства вирусов, которые включают альфавирусы и флавивирусы, имеющие одноцепочечный РНК-геном с положительной полярностью и оболочку, содержащую гликопротеины. Например, вирус лихорадки денге, вирус желтой лихорадки и вирус лихорадки Западного Нила принадлежат к семейству флавивирусов, а вирус Синдбис, вирус леса Семлики и вирус венесуэльского энцефалита лошадей являются членами семейства альфавирусов (Wang et al. *J. Virol.* 66, 4992 (1992)). Оболочка вируса Синдбис включает в себя два трансмембранных гликопротеина (Mukhopadhyay et al. *Nature Rev. Microbio.* 3, 13 (2005)): E1, который считается ответственным за слияния, и E2, который считается ответственным за связывание с клетками. Гликопротеины оболочки вируса Синдбис, как известно, псевдотипируют другие ретровирусы, в том числе онкоретровирусы и лентивирусы.

Оболочка вируса Синдбис и других альфавирусов входит в липидный бислой мембраны вирусной частицы, и обычно включает в себя множество копий двух гликопротеинов, E1 и E2. Каждый гликопротеин имеет трансмембранные участки; E2 имеет цитоплазматический домен из около 33 остатков, в то

время как цитоплазматический концевой сегмент E1 является очень коротким (около 2 остатков). Оба, E1 и E2 имеют пальмитиновые кислоты, прикрепленные в пределах трансмембранных участков или вблизи них. E2 первоначально синтезируется в виде белка-предшественника, который расщепляется посредством фурина или другой Ca^{2+} -зависимой сериновой протеиназы на E2 и небольшой гликопротеин под названием E3. Между последовательностями, кодирующими E2 и E1 расположена последовательность, которая кодирует белок, называемый 6K. E3 и 6K являются сигнальными последовательностями, которые служат для транслокации в мембрану гликопротеинов E2 и E1 соответственно. Участок в геноме вируса Синдбис, кодирующий оболочечные белки Синдбис, включает в себя последовательность, кодирующую E3, E2, 6K и E1. Как используется в настоящем документе, "оболочка" вируса семейства арбовирусов включает, по меньшей мере, E2, и может также включать E1, 6K и E3. Типичная последовательность гликопротеинов оболочки вируса Синдбис, штамма HR, представлена как SEQ ID No. 17 (E3, E2, 6K и E1 полипротеин). Последовательности гликопротеинов оболочки для других арбовирусов можно найти, например, в GenBank. Например, последовательность, кодирующую гликопротеины вируса денге можно найти по номеру доступа GQ252677 (среди других в GenBank) и в базе данных вирусных вариаций в NCBI (доступы в GenBank и базу данных вирусных вариаций включены посредством ссылки для последовательностей гликопротеинов оболочки), а последовательность, кодирующую гликопротеины оболочки вируса венесуэльского энцефалита лошадей по номеру доступа NP 040824 (включена посредством ссылки для последовательностей гликопротеинов оболочки).

Следует понимать, что ссылки на "номер остатка гликопротеина E2" (например, остаток 160, 70, 76 или 159) определяется со ссылкой на аминокислотную последовательность белка SEQ ID NO: 18, которая представляет собой гликопротеин E2 штамма HR вируса Синдбис (т.е. "эталонный штамм HR Синдбис"). Например, если был получен вариант гликопротеина E2 Синдбис, в котором остаток 70 был удален из SEQ ID NO: 18, то "остаток 160" относится к фактическому остатку 159 такого варианта. Аналогичные положения в других альфавирусах могут быть определены посредством выравниваний, которые максимизируют гомологию.

При использовании терминов "присоединение", "связывание", "нацеливание" и т.п., они применяются взаимозаменяемо и не предназначены для обозначения механизма взаимодействия между гликопротеином оболочки вируса Синдбис и клеточным компонентом. DC-SIGN (специфический для дендритных клеток ICAM-3 (молекулы внутриклеточной адгезии 3)-захватывающий неинтегрин; также известный как CD209) представляет собой C-тип лектин-подобного рецептора, способного к быстрому связыванию и эндоцитозу материалов (Geijtenbeek T. B., et al. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 33-54, 2004). По-видимому, E2 нацеливает вирус на дендритные клетки через DC-SIGN. Как продемонстрировано в настоящем документе, клетки, экспрессирующие DC-SIGN, трансдуцируют частицами вирусных векторов, псевдотипированными с E2 вируса Синдбис лучше (по меньшей мере 2-кратно, по меньшей мере 3-кратно, по меньшей мере 4-кратно, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно или по меньшей мере 10-кратно лучше) по сравнению с изогенными клетками, которые не экспрессируют DC-SIGN. Как представляется, механизм, посредством которого гликопротеин E2 облегчает инфицирование вирусом, вовлекает DC-SIGN, возможно, через прямое связывание с DC-SIGN или вызывая изменение конформации или посредством другого механизма. Независимо от фактического механизма, таргетинг посредством E2 является предпочтительным для клеток, экспрессирующих DC-SIGN, а именно дендритных клеток.

Вирус Синдбис также связывает клетки через гепарансульфат (Klimstra et al., *J Virol* 72: 7357, 1998; Burmes and Griffin, *J Virol* 72: 7349, 1998). Поскольку гепарансульфат и другие гликозаминогликаны клеточной поверхности обнаруживаются на поверхности большинства типов клеток, желательно уменьшить взаимодействие между гепарансульфатом и гликопротеинами оболочки вируса Синдбис. Это может быть достигнуто путем уменьшения связывания оболочки вируса Синдбис с гепарансульфатом или путем увеличения связывания, например, увеличения авидности вирусной оболочки Синдбис к дендритным клеткам, или того и другого. В результате уменьшается неспецифическое связывание с другими молекулами, которые могут быть экспрессированы другими типами клеток, и которые могут встречаться, даже если оболочка является специфической для DC-SIGN, а улучшенная специфичность может служить для того, чтобы избежать нежелательных побочных эффектов, таких как побочные эффекты, которые могут уменьшить желаемый иммунный ответ, или побочные эффекты, связанные с внецелевой трансдукцией клеток других типов. В качестве альтернативы или в дополнение к преимуществам относительно специфичной трансдукции клеток, экспрессирующих DC-SIGN, вирусные частицы, псевдотипированные с гликопротеином E2 оболочки вируса Синдбис, могут предложить и другие преимущества по сравнению с вирусными частицами, псевдотипированными с такими гликопротеинами, как VSVG. Примеры таких преимуществ включают снижение опосредованного комплементом лизиса и/или снижение таргетинга нервных клеток, оба из которых, как полагают, связаны с введением псевдотипированных вирусных частиц VSV-G.

В различных вариантах реализации лентивирусные векторные частицы, раскрытые в настоящем документе, специфически связывают клетки, экспрессирующие DC-SIGN, и уменьшают или устраняют связывание с гепарансульфатом. То есть, гликопротеин E2 оболочки вируса Синдбис может быть моди-

фицирован, чтобы преимущественно направлять вирус к дендритным клеткам, которые экспрессируют DC-SIGN по сравнению с другими типами клеток. На основании информации, полученной среди других исследований из структурных исследований и молекулярного моделирования, варианты последовательности белков оболочки, особенно гликопротеинов E2 и E1, разработаны и созданы так, что гликопротеины поддерживают свои функции в качестве белков оболочки, но обладают желаемой специфичностью связывания, авидностью или уровнем связывания. Кандидат вариантных последовательностей может быть создан для каждого гликопротеина и проанализирован с помощью способов, описанных ниже, или других способов, известных в данной области техники, чтобы идентифицировать гликопротеины оболочки с наиболее желательными характеристиками.

Некоторые варианты последовательности E2 Синдбис имеют по меньшей мере одно аминокислотное изменение на остатке 160 по сравнению с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 18 (эталонная последовательность E2 Синдбис HR). Остаток 160 удален или изменен на аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты. Изменение наиболее часто представляет собой замещение по меньшей мере одной аминокислоты, но, в качестве альтернативы, может представлять собой добавление или делецию одной или нескольких аминокислот. Предпочтительно, любые дополнительные аминокислоты малочисленны и не содержат антигенный эпитоп (например, гемагглютининовая маркировочная последовательность), что может компрометировать безопасность.

При наличии двух или более изменений, оба могут быть одного и того же типа (например, замена) или различных типов (например, замена и делеция). Множественные изменения в белковой последовательности могут быть разбросаны или находиться рядом.

В некоторых вариантах реализации варианты последовательности содержат по меньшей мере одно изменение аминокислоты в области приблизительно от остатка 50 приблизительно до остатка 180 E2 вируса Синдбис (SEQ ID NO: 18). В пределах этой области находятся аминокислоты, которые участвуют в связывании с гепарансульфатом. Посредством снижения результирующего положительного заряда E2, электростатическое взаимодействие с гепарансульфатом может быть уменьшено, что приводит к снижению связывания с гепарансульфатом. Кандидатные положительно заряженные аминокислоты в этой области включают лизины на остатках 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149, 159 и аргинин на остатках 65, 92, 128, 137, 157, 170, 172 (Bear et al., *Virology* 347: 183-190, 2006) SEQ ID NO: 18. По меньшей мере, некоторые из этих аминокислот непосредственно вовлечены в связывание E2 с гепарансульфатом. Результирующий положительный заряд может быть уменьшен за счет делеции лизина или аргинина или замены лизина или аргинина на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту. Например, один или более из этих остатков лизина и аргинина могут быть заменены глутаминовой или аспарагиновой кислотой. Некоторые варианты реализации имеют по меньшей мере одну замену лизина 70, 76 или 159. В тех случаях, когда E2 экспрессируется в виде полипротеина с E3, лизин, расположенный рядом с природным сайтом расщепления E3/E2 сохраняется - то есть узнаваемая последовательность и сайт расщепления не изменяются. В качестве альтернативы, нативный сайт расщепления эндопептидазой заменен узнаваемой последовательностью для различных эндопептидаз.

Некоторые варианты E2 вируса Синдбис также модифицируют таким образом, что оказываются положительное влияние на связывание с дендритными клетками. Изменение глутаминовой кислоты, обнаруженное в остатке 160 в эталонной последовательности HR (SEQ ID NO: 18), может улучшить связывание с дендритными клетками (см. публикацию Gardner et al., *J Virol* 74, 11849, 2000, включенную в полном объеме). В определенных вариантах обнаруживаются такие изменения, как делеция остатка 160 или замена остатка 160. В определенных вариантах незаряженная аминокислота заменена на Glu, в других вариантах, не-кислая аминокислота заменена на Glu. Как правило, Glu160 заменяется одной из малых или алифатических аминокислот, включая глицин, аланин, валин, лейцин или изолейцин.

Другие варианты включают в себя два или больше (например, 3, 4 или 5) изменений аминокислот. Как правило, в этих вариантах одно из изменений представляет собой Glu160, а оставшееся изменение(-я) представляют собой изменения одного или более из остатков лизина и аргинина в области, охватывающей остаток от приблизительно 50 до приблизительно 180. Некоторые из вариантов включают изменение Glu160 на некислотный остаток или делецию и одно или больше изменений лизина 70, лизина 76, или лизина 159 неосновной аминокислотой. Некоторые конкретные варианты включают Glu160 на Gly, Lys 70 на Glu, и Lys 159 на Glu; Glu 160 на Gly, Lys 70, 76 и 159 на Glu; делецию Glu 160 и Lys 70 и 159 на Glu; и делецию Glu 160 и Lys 70, 76 и 159 на Glu. В некоторых вариантах реализации вариант E2 является на 80-100% (например, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97 или 99%) идентичным любой из SEQ ID NO: 30-43 [SINvar1-14 E2].

В некоторых случаях белок E2 сначала экспрессируется в виде полипротеина в слиянии, по меньшей мере, с E3 или в слиянии с лидерной последовательностью. Независимо от того, является ли лидерная последовательность E3 или другой последовательностью, E2 в вирусной оболочке должен быть свободен от E3 или другой лидерной последовательности. Другими словами, предпочтительно, E2 не является слитым белком E3/E2. В некоторых вариантах реализации, E2 экспрессируется как часть полипротеина E3-E2-6K-E1. В этих вариантах реализации, полипротеин является на 80-100% (например, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97 или 99%) идентичным любой из SEQ ID NO: 3-16 [полипротеин SINvar1-14]. Вирус

Синдбис природно экспрессирует E2 как часть полипротеина и участки соединения E3/E2, E2/6K и 6K/E1 имеют последовательности, которые распознаются и расщепляются эндопептидазами. Как правило, соединение E3/E2 расщепляется фурином или фуриноподобной сериновой эндопептидазой между остатками 65 и 66. Фурин обладает специфичностью в отношении парных остатков аргинина, разделенных двумя аминокислотами. Для поддержания расщепления E3/E2 фурином, остатки 62-66 (RSKRS; SEQ ID NO: 26) должны содержать два остатка аргинина с разделением двумя аминокислотами и остаток серина. В качестве альтернативы может быть использована другая последовательность расщепления вместо последовательности расщепления фурином E3/E2 или любая из других последовательностей расщепления. Могут быть включены сайты узнавания и расщепления для эндопептидаз, включая, без ограничения, аспарагиновые эндопептидазы (например, катепсин D, химозин, протеазу HIV), цистеиновые эндопептидазы (бромелайн, папаин, калпаин), металлоэндопептидазы (например, коллагеназа, термолизин), сериновые эндопептидазы (например, химотрипсин, фактор IXa, фактор X, тромбин, трипсин), стрептокиназы. Последовательности сайта узнавания и расщепления для этих ферментов являются хорошо известными.

Аминокислоты E2 вируса Синдбис, кроме уже упомянутых, также могут быть изменены. Обычно последовательность варианта E2 будет иметь по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью E2, или она может иметь по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности. В некоторых вариантах реализации последовательность варианта E2 имеет по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 30 [SINvar1], или она может иметь по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности. В некоторых вариантах реализации последовательность варианта E2 имеет по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 31 [SINvar2], или она может иметь по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности. В некоторых вариантах реализации последовательность варианта E2 имеет, по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 32 [SINvar3], или она может иметь по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности.

Вариантный гликопротеин должен обладать биологической функцией, такой как способность облегчать инфицирование дендритных клеток вирусной частицей, которая имеет оболочку, содержащую E2. Эксперименты выявили области гликопротеиновой оболочки, которые демонстрируют важную роль в различных аспектах вирусной сборки, прикрепления к клеточной поверхности и инфицирования. При создании вариантов, в качестве руководства может быть использована следующая информация. Цитоплазматический концевой сегмент E2 - приблизительно остатки 408-415 - является важным для вирусной сборки (публикация West et al. J Virol 80: 4458-4468, 2006; включена в настоящий документ во всей своей полноте). Другие области участвуют в формировании вторичной структуры (приблизительно остатки 33-53); и участвуют в транспорте и стабильности белка (приблизительно остатки 86-119) (публикация Navaratnarajah et al., J Virol 363: 124-147, 2007; включена в настоящий документ во всей своей полноте). Вариант может сохранять гидрофобный характер области, которая охватывает мембраны, приблизительно остатков 370-380. Вариант может сохранять один или оба N-связанных остатков сайтов гликозилирования NIT (остатки 196-198) и NFT (остатки 318-320), и может сохранять один или более сайтов, которые являются пальмитоилированными (C-396, C416 и C417) (Strauss and Strauss Microbiol Rev 58, 491-562, 1994; стр. 499-509 включены). С другой стороны, многие области E2 могут быть изменены без неблагоприятного события. Например, вставки транспозонов в разных местах в E2 по-прежнему приводят в результате к жизнеспособному вирусу (Navaratnarajah, там же).

В некоторых вариантах реализации в белки E3, 6K или E1 может быть введен пептид-метка. Для некоторых целей метка может быть введена в E2, но метка не желательна для использования в продукте для введения пациентам-людям. Пептид-метка, который представляет собой короткую последовательность (например, 5-30 аминокислот), может быть использован для облегчения обнаружения экспрессии оболочки и ее наличия в вирусных частицах. Для целей детекции маркировочная последовательность, как правило, будет детектироваться с помощью антител или химических веществ. Другим применением метки является облегчение очистки вирусных частиц. Подложку, содержащую партнера по связыванию с меткой, можно использовать для абсорбции вируса. Элюирование вируса может быть достигнуто путем обработки фрагментом, который вытесняет метку из партнера по связыванию или, когда маркировочная последовательность связана с расщепляемой последовательностью, удобно обеспечивать высвобождение вируса будет обработка соответствующей эндопептидазой. (См., например, Qiagen catalog, Factor Xa Protease System). Удаление пептида-метки, как правило, желательно в целях безопасности применения вирусных частиц у субъектов-животных. Если метку не удалять, может возникнуть иммунный ответ на метку.

Подходящие метки включают среди прочих, без ограничений, FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 28) (патент США № 4703004, включен в настоящий документ во всей своей полноте), для которой имеются коммерчески доступные антитела, белок, связывающий хитин, белок, связывающий мальтозу, глутатион-S-трансферазу, поли(His) (патент США № 4569794, включен в настоящий документ во всей своей полноте), тиоредоксин, HA (гемагглютининовая)-метка. Поли(His) может быть адсорбирована на аффинных средах, содержащих связанные ионы металлов, например, никель или кобальт, и элюирована при низком уровне pH среды.

Вирусные частицы могут оцениваться для определения специфичности гликопротеина оболочки, включенного в вирус, нацеленный на дендритные клетки. Например, смешанная популяция клеток костного мозга может быть получена от субъекта и культивирована *in vitro*. В качестве альтернативы могут быть получены и использованы изогенные клеточные линии, которые экспрессируют или не экспрессируют DC-SIGN. Рекombинантный вирус может быть введен в смешанную популяцию клеток костного мозга или изогенные клеточные линии, и экспрессия гена-репортера, включенного в вирус, может быть проанализирована в культивируемых клетках. В некоторых вариантах реализации может применяться анализ предельного разведения, в котором смешанную популяцию клеток разделяют на отдельные части, которые затем по отдельности инкубируют с уменьшающимися количествами вируса (например, 2-кратное, 5-кратное, 10-кратное уменьшение вируса в каждой части). В некоторых вариантах реализации, по меньшей мере около 50%, более предпочтительно, по меньшей мере, около 60%, 70%, 80% или 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере около 95% инфицированных клеток в смешанной популяции клеток представляют собой дендритные клетки, которые экспрессируют DC-SIGN. В некоторых вариантах реализации соотношение инфицированных дендритных клеток к инфицированным не дендритным клеткам (или клеткам, которые не экспрессируют DC-SIGN) составляет по меньшей мере около 2:1, по меньшей мере около 3:1, по меньшей мере около 4:1, по меньшей мере около 5:1, по меньшей мере около 6:1, по меньшей мере около 7:1, по меньшей мере около 8:1, по меньшей мере около 9:1, по меньшей мере около 10:1, по меньшей мере около 20:1, по меньшей мере около 30:1, по меньшей мере около 40:1, по меньшей мере около 50:1, по меньшей мере около 100:1, по меньшей мере около 200:1, по меньшей мере около 500:1, по меньшей мере около 1000:1, по меньшей мере около 5000:1, по меньшей мере около 10000:1 или больше. Для предельного разведения, большая селективность, как правило, наблюдается в более высоких разведениях (т.е. при меньших количествах) вводимого вируса.

Активность псевдотипированных вирусных частиц может быть определена с помощью любого из разнообразных способов. Например, предпочтительный способ для измерения инфективной эффективности (ИЕ, инфекционные единицы) осуществляется путем введения вирусных частиц в клетки и измерения экспрессии продукта, кодируемого в геноме вектора. Может применяться любой продукт, который может быть проанализирован. Одним удобным типом продукта является флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Другие продукты, которые могут быть использованы, включают белки, экспрессируемые на поверхности клеток (например, детектирование посредством связывания антител), ферменты и т.п. Если продукт представляет собой антиген, а клетки представляют собой дендритные клетки, инфективность/активность может быть оценена путем определения иммунного ответа. Кроме того, можно определять побочные эффекты у млекопитающих. Способность специфически нацеливаться на дендритные клетки также может быть исследована непосредственно, например, в клеточной культуре, как описано ниже.

Вирусные частицы также могут быть получены и исследованы на их селективность и/или их способность облегчать проникновение в мембрану клетки-мишени. Вирусные частицы, которые имеют оболочку с немодифицированными гликопротеинами, могут быть использованы в качестве контроля для сравнения. Коротко, клетки, экспрессирующие рецептор для гликопротеина оболочки, инфицируют вирусом с помощью стандартного анализа инфицирования. По истечении заданного времени, например, через 48 ч после инфицирования, клетки могут быть собраны и с помощью, например, проточной цитометрии может быть определен процент клеток, инфицированных вирусом. Селективность может быть оценена в баллах путем расчета процента клеток, инфицированных вирусом. Подобным образом, влияние гликопротеина оболочки варианта на титр вируса может быть определено количественно путем деления процента клеток, инфицированных вирусом, содержащим оболочку варианта на процент клеток, инфицированных вирусом, содержащим соответствующий гликопротеин оболочки дикого типа (немодифицированный). Особенно подходящий вариант будет иметь наилучшее сочетание селективности и инфекционного титра. После того, как вариант выбран, могут быть выполнены анализы концентрации вируса, чтобы подтвердить, что эти вирусы могут быть концентрированы без ущерба для активности. Вирусные супернатанты собирают и концентрируют с помощью ультрацентрифугирования. Титры вирусов могут быть определены путем предельного разведения исходного вирусного раствора и инфицирования клеток, экспрессирующих рецептор для гликопротеина оболочки, измерения экспрессии продукта, экспрессированного вирусами, как описано выше.

Проникновение лентивирусной векторной частицы в клетку-мишень представляет собой другой тип оценки активности. Для оценки проникновения вирусов HIV-1 использовали гибридный белок BlaM-Vpr (бета-лактамаза Vpr); для оценки эффективности белка оболочки в облегчении слияния и проникновения

в клетку-мишень, может быть использовано слияние BlaM и гликопротеина оболочки вируса Синдбис, например E1 или E2/E1 гибридного белка. Вирусные частицы могут быть получены, например, путем кратковременной трансфекции упаковывающих клеток одним или более векторами, содержащими вирусные элементы, BlaM-Vpr и вариант оболочки, представляющей интерес (и, при необходимости, аффинную молекулу). Полученные в результате вирусы могут быть использованы для инфицирования клеток, экспрессирующих молекулу, молекулу нацеливания (или аффинную молекулу), которая специфически связывается в отсутствие или в присутствии свободного ингибитора связывания (такого как антитело). Клетки затем промывают CO₂-независимой средой и нагружают красителем CCF2 (Auroga Bioscience). После инкубации при комнатной температуре для предоставления возможности завершения реакции расщепления, клетки могут быть зафиксированы с помощью параформальдегида и проанализированы с помощью проточной цитометрии и микроскопии. Наличие голубых клеток указывает на проникновение вирусов в цитоплазму; меньше голубых клеток можно ожидать при добавлении блокирующих антител (публикация Cavois et al. *Nat Biotechnol* 20: 1151-1154, 2002; включена в настоящий документ во всей своей полноте).

Для исследования того, зависит ли проникновение от низкого уровня pH, а также для идентификации гликопротеинов оболочки с желаемой зависимостью от уровня pH, на стадии инфицирования может быть добавлен NH₄Cl или другое соединение, которое изменяет уровень pH (NH₄Cl нейтрализует кислые компартменты эндосом). В случае применения NH₄Cl, исчезновение голубых клеток указывает, что проникновение вирусов зависит от низкого уровня pH. Кроме того, чтобы подтвердить зависимость активности от pH, в инкубационный буфер могут быть добавлены лизосомотропные средства, такие как хлорид аммония, хлорохин, конканамицин, бафиломицин A1, монензин, нигерицин и т.д. Эти средства повышают уровень pH в компартментах эндосом (например, Droese and Altendorf, *J. Exp. Biol.* 200, 1-8, 1997). Ингибирующее действие этих средств выявляет роль pH для вирусного слияния и проникновения. Можно сравнить различные кинетики проникновения среди вирусов, демонстрирующих разные фузогенные молекулы, и выбрать наиболее подходящие для конкретного применения.

Анализ проникновения на основе ПЦР могут быть использованы для мониторинга обратной транскрипции и измерения кинетики синтеза вирусной ДНК в качестве индикатора кинетики проникновения вируса. Например, вирусные частицы, содержащие определенную молекулу белка оболочки, инкубируют с клетками-мишенями, такими как клетки 293T, ДК или любые другие клетки, которые были разработаны для экспрессии, или которые природно экспрессируют соответствующий связывающий партнер (рецептор) молекулы белка оболочки. Либо сразу, либо по прошествии времени (чтобы предоставить возможность произойти инфицированию), несвязанные вирусы удаляют, и аликвоты клеток анализируют на вирусные нуклеиновые кислоты. Из этих аликвот экстрагируют ДНК и подвергают анализу амплификации, как правило, в полуколичественном анализе, применив LTR-специфическими праймерами. Появление LTR-специфических продуктов ДНК означает успех вирусного проникновения.

Лентивирусный векторный геном

Частица вирусного вектора содержит геном, который содержит по меньшей мере одну последовательность (например, 1, 2, 3, 4 или 5), представляющую интерес. Могут быть включены другие последовательности, например, последовательности, которые предоставляют возможность упаковки генома в вирусную частицу и последовательности, которые стимулируют экспрессию последовательности(-ей), представляющей(их) интерес после трансдукции клетки-мишени. Геном может быть получен из любого из большого количества подходящих, доступных векторов на основе лентивирусного генома, включая те, которые определены для применения в генной терапии человека, например, те, которые описаны авторами Pfeifer и Verma (публикация Аппи. *Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211, 2001; которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Для простоты, указанный геном, также упоминается как "геном вирусного вектора" или "векторный геном".

Остов

Подходящие геномы лентивирусных векторов включают геномы на основе вируса иммунодефицита человека (HIV-1), HIV-2, вируса иммунодефицита кошек (FIV), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита обезьян (SIV) и вируса медузы/висна. Желательной характеристикой лентивирусов является то, что они способны инфицировать как делящиеся, так и не-делящиеся клетки, клетке-мишени не обязательно быть делящейся (или необязательно стимулировать клетки-мишени к делению). Как правило, геном и гликопротеины оболочки будут на основе различных вирусов, таким образом, полученная в результате частица вирусного вектора является псевдотипированной. Желательно вводить характеристики безопасности векторного генома. Характеристики безопасности включают самоинактивирующийся LTR и не-интегрирующий геном.

В некоторых типичных вариантах реализации геном вирусного вектора содержит последовательности генома лентивирусов, например, геном HIV-1 или геном SIV. Конструкт вирусного генома может содержать последовательности из 5' и 3'-LTR лентивируса, и в частности, может содержать последовательности R и U5 из 5' LTR лентивируса и инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут представлять собой последовательности LTR из любого лентивируса от любых видов. Например, они могут представлять собой последовательности LTR из HIV,

SIV, FIV или BIV. Как правило, последовательности LTR представляют собой последовательности LTR HIV.

Векторный геном может содержать инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR (публикации Zufferey et al. *J Virol* 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., *J Virol* 72:8150, 1998; US2010/0323403, все включены в настоящий документ во всей своей полноте). Самоинактивирующийся вектор обычно имеет делецию энхансерных и промоторных последовательностей из 3' длинного концевого повтора (LTR), которая копируется в 5' LTR во время интеграции вектора. В одном случае элемент U3 из 3' LTR содержит делецию его энхансерной последовательности, полипуринового тракта (PPT), TATA-бокса, сайтов Sp1 и NF-каппа В. В результате самоинактивирующегося 3' LTR, провирус, который образуется после проникновения и обратной транскрипции, будет содержать инактивированный 5' LTR. Обоснованием является повышение безопасности путем снижения риска мобилизации генома вектора и влияние LTR на близлежащие клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3' LTR может быть сконструирован любым способом, известным в данной области техники. В различных вариантах реализации псевдотипированный лентивирусный вектор содержит геном лентивирусного вектора, включающий в себя последовательность SEQ ID NO: 23. Вектор содержит делецию 3' PPT и TATA-бокса. Таким образом, вектор является самоинактивирующимся, при этом (а) в инфицированной клетке-мишени предотвращается транскрипция полноразмерного векторного генома из векторов дцДНК с обратной транскрипцией, (b) после интеграции сводится к минимуму риск инсерционной активации, которая может произойти, если 3' LTR может функционировать в качестве промотора, и (с) расширенная делеция U3 может быть дополнена дополнительными, резервными механизмами безопасности (например, мутация интегразы).

Необязательно, последовательность U3 лентивирусного 5' LTR может быть заменена в вирусном конструкторе промоторной последовательностью, например, гетерологичной промоторной последовательностью. Это может увеличить титр вируса, выделенного из упаковывающей клеточной линии. Также может быть включена энхансерная последовательность. Может быть использована любая комбинация энхансер/промотор, которая увеличивает экспрессию генома вирусной РНК в упаковывающей клеточной линии. В одном примере используют энхансерную/промоторную последовательность CMV (патент США № 5385839 и патент США № 5168062, каждый из которых включен в настоящий документ во всей своей полноте).

В некоторых вариантах реализации риск инсерционного мутагенеза сведен к минимуму посредством конструирования генома лентивирусного вектора, который является интеграционно-дефектным. Для получения не-интегрирующего векторного генома можно применять разнообразные подходы. Эти подходы влекут за собой конструирование мутации(-ий) в компоненте фермента интегразы гена *pol*, при этом он кодирует белок с неактивной интегразой. Сам векторный геном может быть модифицирован для того, чтобы предотвратить интеграцию, например, посредством мутации или делеции одного или обоих сайтов прикрепления, или делая 3' LTR-проксимальный полипуриновый тракт (PPT) нефункциональным посредством делеции или модификации. Кроме того, доступны не-генетические подходы; они включают фармакологические средства, которые ингибируют одну или больше функций интегразы. Подходы не являются взаимоисключающими, то есть в одно и то же время может быть использован более чем один подход. Например, как интеграна, так и сайты прикрепления могут быть нефункциональными или интеграна и сайт PPT могут быть нефункциональными, или сайты прикрепления и сайт PPT могут быть нефункциональными, или все из них могут быть нефункциональными.

Как указано выше, один подход представляет собой создание и использование нефункциональной интегразы. Интеграна участвует в расщеплении вирусной двухцепочечной тупоконечной ДНК и соединении концов с 5'-фосфатами в двух цепях хромосомного целевого сайта. Интеграна имеет три функциональных домена: N-концевой домен, который содержит цинк-связывающий мотив (NHCC), ядро центрального домена, которое содержит каталитическое ядро и консервативный мотив DD35E (D64, D116, E152 в HIV-1), и C-концевой домен, который имеет ДНК-связывающие свойства. Точечные мутации, введенные в интеграну, являются достаточными, чтобы нарушить нормальную функцию. Было сконструировано и охарактеризовано много мутаций интегразы (см., публикации Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Apolonia, Thesis submitted to University College London, April 2009, стр. 82-97; Engelman et al. *J Virol* 69: 2729, 1995; Nightingale et al. *Mol Therapy*, 13: 1121, 2006; все из которых включены в настоящий документ в полном объеме). Последовательность, кодирующая белок интегразы может быть удалена или мутирована, чтобы привести к неактивности белка, предпочтительно без существенного ухудшения активности обратной транскриптазы или ядерного таргетинга, тем самым только предотвращая интеграцию провируса в геном клетки-мишени. Приемлемые мутации могут снижать катализ интегразы, перенос цепи, связывание с сайтами *att*, связывание с хромосомной ДНК хозяина и другие функции. Например, одна замена аспарагиновой кислоты на аспарагин в остатке 35 HIV или SIV интегразы полностью устраняет интеграцию вирусной ДНК. Делеции интегразы, как правило, ограничиваются C-концевым доменом. Удаление кодирующей последовательности для остатков 235-288 приводит в результате к пригодной нефункциональной интегразе (Engelman et al. *J Virol* 69:2729, 1995). В качестве дополнительных примеров могут быть созданы мутации, например, Asp64 (номера остатков приведены для HIV-1, соответствующие номера остатков для интегразы от других лентивирусов или ретровирусов

могут быть легко определены обычным специалистом в данной области техники) (например, D64E, D64V), Asp116 (например, D116N), Asn120 (например, N120K), Glu152, Gln148 (например, Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (например, W235E), Lys264 (например, K264R), Lys266 (например, K266R), Lys273 (например, K273R). Другие мутации могут быть сконструированы и исследованы в отношении интеграции, трансгенной экспрессии и любого другого желаемого параметра. Анализы для этих функций хорошо известны. Мутации могут быть созданы с помощью любого из разнообразных способов, в том числе сайт-направленного мутагенеза и химического синтеза последовательности нуклеиновой кислоты. Может быть сделана одна мутация, или в интегразе могут присутствовать более одной из этих мутаций. Например, интеграза может иметь мутации в двух аминокислотах, трех аминокислотах, четырех аминокислотах и т.д.

В качестве альтернативы или в сочетании с использованием мутанта(ов) интегразы также могут быть мутированы сайты прикрепления (att) в U3 и U5. Интеграза связывается с этими сайтами и 3'-концевой динуклеотид расщепляется на обоих концах векторного генома. СА динуклеотид расположен в углубленном 3' конце; СА требуется для процессинга, мутации интеграции блоков нуклеотидов в хромосому хозяина. Нуклеотид А из СА динуклеотида является наиболее важным нуклеотидом для интеграции, и мутации на обоих концах генома будут давать лучшие результаты (Brown et al J Virol 73:9011 (1999)). В одном иллюстративном примере СА на каждом конце меняется на TG. В других иллюстративных примерах СА на каждом конце меняется на TG на одном конце и на GT на другом конце. В других иллюстративных примерах СА на каждом конце удаляют; в других иллюстративных примерах на каждом конце из СА удаляют А.

Интеграцию также можно ингибировать путем мутации или делеции полипуринового тракта (PPT) (публикация WO 2009/076524; включена в настоящий документ во всей своей полноте), расположенного проксимально по отношению к 3' LTR. PPT представляет собой полипуриновую последовательность, состоящую из около 15 нуклеотидов, которые могут служить в качестве праймера сайта связывания для синтеза "плюс"-цепи ДНК. В этом случае мутации или делеции PPT нацелены на процесс обратной транскрипции. Без связи с механизмом, посредством мутации или делеции PPT, производство линейной ДНК радикально снижается, и по существу, производятся только 1-LTR кольцевые формы ДНК. Для интеграции требуется векторный геном линейной двухцепочечной ДНК, а без него интеграция по существу исключается. Как указано выше, PPT можно сделать нефункциональным при помощи мутации или делеции. Как правило, удаляют все около 15 нуклеотидов PPT, хотя в некоторых вариантах реализации могут быть сделаны более короткие делеции, составляющие 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 и 2 нт. При выполнении мутаций, как правило, делают множество мутаций, особенно в 5' половине PPT (McWilliams et al., J Virol 77:11150, 2003), хотя единичные и двойные мутации в первых четырех основаниях все еще уменьшают транскрипцию. Мутации, сделанные на 3' конце PPT, как правило, имеют более сильное влияние (Powell and Levin J Virol 70: 5288, 1996).

Эти различные подходы, для получения неинтегрирующего векторного генома могут быть использованы по отдельности или в комбинации. Использование более одного подхода может применяться для построения надежного вектора, защищенного от сбоев посредством резервных механизмов. Таким образом, мутации или делеции PPT могут быть объединены с мутациями или делециями сайта att или с мутациями интегразы, или мутации или делеции PPT могут быть объединены как с мутациями или делециями сайта att, так и мутациями интегразы. Подобным образом, мутации или делеции сайта att и мутации интегразы могут быть объединены друг с другом или с мутациями или делециями PPT.

Еще один подход к повышению безопасности псевдотипированных лентивирусных частиц включает модификацию плазмиды, содержащей gag/pol гены для удаления сайтов потенциальной рекомбинации с лентивирусным вектором. Этот подход может быть использован отдельно или в комбинации с любым из подходов, описанных в настоящем документе. Например, гены gag и pol могут быть "кодон оптимизированными" генами млекопитающих или человека, т.е. по меньшей мере 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% кодонов генов gag и/или pol заменены кодонами, которые кодируют ту же самую аминокислоту, но предпочтительно клетками млекопитающих, например клетками человека, тем самым улучшая или оптимизируя экспрессию в клетках млекопитающих, например, в клетках человека. Для оптимизации кодонов gag и pol генов, создается полинуклеотид, который изменяет кодоны "дикого типа" на кодоны, которые чаще используются в геноме человека. В HIV, тем не менее, некоторые части генома должны сохранять практически исходные кодоны (например, по меньшей мере 75, 80, 85, 90, 95 или 100% исходных кодонов) с тем чтобы обеспечить сдвиг рамки считывания, необходимый для синтеза Gag и Pol, начиная с того же иницирующего кодона мРНК. Для трансляции Gag-Pol требуется сдвиг рамки считывания в направлении 5' (-1 сдвиг) на соединении p7/p1, около кодона 432 мРНК. Трансляция Gag-Pol затем продолжается в этой новой рамке считывания до тех пор, пока позже стоп-кодон не достигнет около 3000 нуклеотидов. Рибосомный -1 сдвиг рамки считывания является сильно контролируемым событием, требующим как специфическую консенсусную скользящую последовательность, так и нижеследующую вторичную структуру РНК, которая вызывает временную остановку рибосомы. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновая кислота, кодирующая gag и pol содержит "неоптимизированное окно": область, которая начинается около положения 1228 (или начинается около по-

ложения 1218-1298, или 1218-1238, или 1228-1238, или 1218-1228, или 1228-1298, или 1238-1248, или 1248-1258, или 1258-1268, или 1268-1278, или 1278-1288, или 1288-1298) SEQ ID NO: 54 (открытая рамка считывания gag-pol) и заканчивается в положении 1509 (или заканчивается около положения 1373-1558, или 1373-1509, или 1373-1500, или 1373-1470, или 1373-1440, или 1373-1410, или 1373-1401, или 1373-1392, или 1373-1383, или 1401-1509, или 1440-1509, или 1499-1519, или 1499-1509, или 1509-1519) SEQ ID NO: 54, который по существу не изменяется по сравнению с последовательностью gag-pol дикого типа. Другими словами, не-оптимизированное окно сохраняет практически исходные кодоны (например, по меньшей мере 90, 95 или 100% исходных кодонов). Следует понимать, что не-оптимизированное окно, соответствующее нуклеотидам 1228-1509 SEQ ID NO: 54, может иметь фактически другую нумерацию нуклеотидов, когда SEQ ID NO: 54 является мутированной или является частью более крупной последовательности нуклеотидов; например, если плазида содержит 100 нуклеотидов 5' SEQ ID NO: 54, то, не-оптимизированное окно соответствует нуклеотидам 1328-1609 в плазмиде. В некоторых вариантах реализации область от нуклеотидов 1229 до 1298 сохраняет практически исходные кодоны, и/или область от нуклеотидов 1510-1558 является кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах реализации кодон-оптимизированный полинуклеотид, кодирующий Gag и Pol, содержит SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах реализации плазида, кодирующая кодон-оптимизированный полинуклеотид gag-pol, содержит последовательность SEQ ID NO: 55.

В некоторых или любом из вариантов реализации плазида, кодирующая кодон-оптимизированные gag и pol гены человека (и содержащая не-оптимизированное окно, описанное выше) также не имеет элемента, чувствительного к Rev (RRE). Делеция RRE удаляет еще одну область гомологии и потенциальную рекомбинацию между плазмидой gag/pol и плазмидой лентивирусного вектора. При комбинации такой подход исключает или минимизирует области гомологии между плазмидой gag/pol и лентивирусным вектором, что сводит к минимуму вероятность рекомбинации между этими плазмидами, которая может привести в результате к репликационно-компетентному вирусу. Понятно, что RRE все еще может присутствовать в упаковывающей клетке и процессе, но присутствует на другой плазмиде.

Регуляторный элемент

Как обсуждалось в настоящем документе, геном вирусного вектора содержит последовательность, представляющую интерес, которая желательна для экспрессии в клетках-мишенях. Как правило, последовательность, представляющая интерес, расположена между последовательностями 5' LTR и 3' LTR. Кроме того, последовательность, представляющая интерес, предпочтительно находится в функциональной связи с другими генетическими элементами, например регуляторными последовательностями транскрипции, включая промоторы или энхансеры, чтобы регулировать экспрессию последовательности, представляющей интерес, определенным образом. В некоторых случаях пригодные последовательности, регулирующие транскрипцию, представляют собой те, которые строго регулируются в отношении активности, как во времени, так и в пространстве. Элементы, контролирующие экспрессию, которые могут быть использованы для регуляции экспрессии компонентов, хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, индуцируемые промоторы, конститутивные промоторы, сигналы секреции, энхансеры и другие регуляторные элементы.

Последовательность, представляющая интерес, и любая другая экспрессируемая последовательность, как правило, находится в функциональной связи с внутренними промоторными/энхансерными регуляторными последовательностями. "Внутренний" промотор/энхансер представляет собой тот, который в конструкторе вирусного вектора находится между последовательностями 5' LTR и 3' LTR, и функционально связан с последовательностью, представляющей интерес. Внутренний промотор/энхансер может представлять собой любой промотор, энхансер или комбинацию промотора/энхансера, которые, как известно, увеличивают экспрессию гена, с которым они функционально связаны. "Функциональная связь" и "функционально связанный" означает, без ограничения, что последовательность находится в правильном положении и ориентации по отношению к промотору и/или энхансеру, так что при контакте промотора и/или энхансера с соответствующими молекулами последовательность, представляющая интерес, будет экспрессирована.

Выбор внутреннего промотора/энхансера основан на желаемой модели экспрессии последовательности, представляющей интерес, и специфических свойств известных промоторов/энхансеров. Таким образом, внутренний промотор может быть конститутивно активным. Неограничивающие примеры конститутивных промоторов, которые могут быть использованы, включают промотор для убиквитина (публикации патента США № 5510474; WO 98/32869, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме), CMV (публикации Thomsen et al., PNAS 81:659, 1984; патент США № 5168062, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме), бета-актина (публикация Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4831-4835, включенная в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме) и pgk (см., например, публикации Adra et al. 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam et al. 1984 Gene 32:409-417 и Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637, каждая из вышеизложенных включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах реализации промотор, используемый для контроля экспрессии антигенов, кодируемых геном псевдотипированного лентивирусного вектора, представляет собой ин-

трон-дефицитный промотор. В некоторых вариантах реализации для контроля экспрессии антигенов, кодируемых геном псевдотипированного лентивирусного вектора, используют промотор убиквитина-С человека (UbiC). В различных вариантах реализации промотор UbiC был модифицирован с удалением интронов, т.е. промотор является интрон-дефицитным. Полноразмерный промотор UbiC состоит из 1250 нуклеотидов. Интрон начинается на 412 и продолжается по всей длине до конца (412-1250). Эта область может быть удалена с целью сведения к минимуму гетерогенных вирусных геномных транскриптов. Вирусный геном HIV имеет внутри нативный интрон. Таким образом, лентивирус, содержащий промотор UbiC, будет иметь в общей сложности 2 интрона в геноме лентивируса. Интрон UbiC может существовать как в сплайсированной так и в не сплайсированной формах. Делеция интрона UbiC исключает возможность гетерогенных вирусных транскриптов и обеспечивает однородность поставляемых псевдотипированных лентивирусных частиц.

В качестве альтернативы промотор может быть тканеспецифичным промотором. В некоторых предпочтительных вариантах реализации промотор представляет собой промотор, специфичный к клетке-мишени. Например, промотор может быть из любого продукта, экспрессируемого дендритными клетками, включая CD11c, CD103, TLRs, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, маннозный рецептор, Dectin-1, Clec9A, MHC класса II. Кроме того, промоторы могут быть выбраны для обеспечения индуцируемой экспрессии последовательности, представляющей интерес. В данной области техники известен ряд систем для индуцируемой экспрессии, включая систему, чувствительную к тетрациклину, систему оператор-репрессор *lac*, а также промоторы, чувствительные к различным экологическим или физиологическим изменениям, включая тепловой шок, ионы металлов, например, промотор металлотионеина, интерфероны, гипоксию, стероиды, например, промотор прогестеронового или глюкокортикоидного рецептора, радиации, например, промотор VEGF. Для получения желаемой экспрессии гена, представляющего интерес, также может быть использована комбинация промоторов. Обычный специалист в данной области техники сможет выбрать промотор на основе желаемой модели экспрессии гена в организме или клетке-мишени, представляющей интерес.

Вирусный геном может содержать по меньшей мере один промотор, чувствительный к РНК-полимеразе II или III. Этот промотор может быть функционально связан с последовательностью, представляющей интерес, а также может быть связан с терминирующей последовательностью. Дополнительно, может быть включен более чем один промотор РНК-полимеразы II или III. Промоторы РНК-полимеразы II и III хорошо известны специалистам в данной области техники. Подходящий ряд промоторов РНК-полимеразы III может быть найден, например, в публикации Paule and White, *Nucleic Acids Research*, том 28, стр. 1283-1298 (2000), которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Промоторы РНК-полимеразы II или III также включают любой синтетический или сконструированный фрагмент ДНК, который может направлять РНК-полимеразу II или III, чтобы транскрибировать нижерасположенные РНК-кодирующие последовательности. Кроме того, промотор или промоторы РНК-полимеразы II или III (Pol II или III), используемые как часть генома вирусного вектора, могут быть индуцируемыми. Любой подходящий промотор Pol II или III можно использовать со способами настоящего раскрытия. Особенно подходящие промоторы Pol II или III включают промоторы, чувствительные к тетрациклину, представленные в публикации Ohkawa and Taira, *Human Gene Therapy*, том 11, стр. 577-585 (2000) и в публикации Meissner et al. *Nucleic Acids Research*, том 29, стр. 1672-1682 (2001), каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Внутренний энхансер может также присутствовать в вирусном конструкте для увеличения экспрессии гена, представляющего интерес. Например, может быть использован энхансер CMV (публикация Boshart et al. *Cell*, 41:521, 1985; которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Были идентифицированы и охарактеризованы многие энхансеры в вирусных геномах, например HIV, CMV, и в геномах млекопитающих (см GenBank). Энхансер может быть использован в комбинации с гетерологичным промотором. Обычный специалист в данной области техники сможет выбрать подходящий энхансер на основе желаемой модели экспрессии.

Геном вирусного вектора, как правило, содержит промотор, который распознается клеткой-мишенью, и который функционально связан с последовательностью, представляющей интерес, вирусными компонентами и другими последовательностями, обсуждаемыми в настоящем документе. Промотор является элементом контроля экспрессии, образованным последовательностью нуклеиновых кислот, который позволяет происходить связыванию РНК-полимеразы и транскрипции. Промоторы могут быть индуцируемыми, конститутивными, временно активными или тканеспецифическими. Активность индуцируемых промоторов индуцируется в присутствии или при отсутствии биотических и абиотических факторов. Индуцируемые промоторы могут быть полезным инструментом в области генной инженерии, поскольку экспрессия генов, с которыми они функционально связаны, может быть включена или исключена на определенных этапах развития организма, их выработки, или в определенной ткани. Индуцируемые промоторы можно разделить на группы химически регулируемых промоторов, и физически регулируемых промоторов. Типичные химически регулируемые промоторы включают, но, не ограничиваясь перечисленным, промоторы, регулируемые алкоголем (например, промотор гена алкогольдегидрогеназы I (alcA)), промоторы, регулируемые тетрациклином (например, промотор, чувствительный к тетрацикли-

ну), промотор, регулируемый стероидами (например, промотор на основе глюкокортикоидного рецептора (GR) крысы, промотор на основе рецептора эстрогена (ER) человека, промотор на основе рецептора экдизона мотылька и промоторы на основе суперсемейства стероидных/ретиноидных/тироидных рецепторов), промоторы, регулируемые металлами (например, промоторы на основе гена металлотионеина), и промоторы, связанные с патогенезом (например, промоторы на основе белков, связанных с патогенными микроорганизмами (PR) *Arabidopsis* и кукурузы). Типичные физически регулируемые промоторы включают, но, не ограничиваясь перечисленным, промоторы, регулируемые температурой (например, промоторы теплового шока) и промоторы, регулируемые светом (например, промотор SSU сои).

Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящий промотор на основе конкретных обстоятельств. Многие различные промоторы хорошо известны в данной области техники, также как и способы функционального связывания промотора с геном, подлежащим экспрессии. Как последовательности нативных промоторов, так и многие гетерологичные промоторы могут быть использованы для направления экспрессии в упаковывающей клетке и клетке-мишени. Однако предпочтительными являются гетерологичные промоторы поскольку они, как правило, разрешают большую транскрипцию и более высокие выходы целевого белка по сравнению с нативным промотором.

Промотор может быть получен, например, из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, аденовирус, вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус птичьей саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). Промотор может быть также, например, гетерологичным промотором млекопитающих, например, промотором актина или промотором иммуноглобулина, промотором теплового шока или промотором, который обычно связан с нативной последовательностью, при условии, что такие промоторы совместимы с клеткой-мишенью. В одном варианте реализации промотор представляет собой встречающийся в природе вирусный промотор в вирусной системе экспрессии. В некоторых вариантах реализации промотор представляет собой промотор, специфичный для дендритных клеток. Промотор, специфичный для дендритных клеток может представлять собой, например, промотор CD11c.

Транскрипция может быть увеличена путем вставки последовательности энхансера в вектор(ы). Энхансеры, как правило, представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно длиной от около 10 до 300 п.о., которые действуют на промотор, чтобы увеличить его транскрипцию. Известны многие последовательности энхансеров из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, альфа-фетопrotein и инсулин) и из вирусов эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на отдаленной стороне источника репликации (п.о.100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на отдаленной стороне источника репликации и аденовирусные энхансеры. Энхансер может подвергаться сплайсингу в векторе в положении 5' или 3' относительно антиген-специфической полинуклеотидной последовательности, но, предпочтительно, расположен на сайте 5' от промотора.

Векторы экспрессии могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Эти последовательности часто встречаются в 5' и иногда в 3'-нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК и хорошо известны в данной области техники.

Геном вирусного вектора может также содержать дополнительные генетические элементы. Типы элементов, которые могут быть включены в конструкторы, никоим образом не ограничены, и могут быть выбраны для достижения конкретного результата. Например, может быть включен сигнал, который облегчает ядерное проникновение вирусного генома в клетку-мишень. Примером такого сигнала является флэп-сигнал HIV-1. Кроме того, могут быть включены элементы для облегчения характеристики сайта интеграции провируса в клетку-мишени. Например, в конструкцию может быть включена последовательность амбер-супрессорной тРНК. Изолирующая последовательность, например, из куриного β -глобина также может быть включена в конструктор вирусного генома. Этот элемент уменьшает вероятность сайленсинга интегрированного провируса в клетку-мишени за счет эффектов метилирования и гетерохроматинизации. Кроме того, изолятор может защитить внутренний энхансер, промотор и экзогенный ген от положительных или отрицательных позиционных эффектов окружающей ДНК в сайте интеграции на хромосоме. Кроме того, векторный геном может содержать один или более генетических элементов, предназначенных для усиления экспрессии гена, представляющего интерес. Например, чувствительный элемент вируса гепатита сурка (WRE) может быть помещен в конструктор (публикации Zufferey et al. 1999. *J. Virol.* 74:3668-3681; Deglon et al. 2000. *Hum. Gene Ther.* 11: 179-190, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Геном вирусного вектора, как правило, сконструирован в форме плазмиды, которая может быть трансфицирована в упаковывающую или продуцирующую клеточную линию. Плазида обычно содержит последовательности, пригодные для репликации плазмиды в бактериях. Такие плазмиды хорошо известны в данной области техники. Кроме того, векторы, которые включают прокариотическое начало репликации, могут также включать ген, экспрессия которого дает детектируемый или селективируемый маркер, такой как лекарственная устойчивость. Типичные бактериальные продукты лекарственной устойчивости представляют собой те, которые придают устойчивость к ампициллину или тетрациклину.

Плазмиды, содержащие один или более из компонентов, описанных в настоящем документе, могут быть легко сконструированы с использованием стандартных способов, хорошо известных в данной области техники. Для анализа, чтобы подтвердить правильные последовательности в сконструированных плазидах, плазмиды могут быть реплицированы в *E. coli*, очищены и проанализированы с помощью расщепления рестрикционной эндонуклеазой или определением их ДНК-последовательности с помощью обычных способов.

Также могут быть использованы векторы, сконструированные для кратковременной экспрессии в клетках млекопитающих. Кратковременная экспрессия включает в себя использование вектора экспрессии, который способен эффективно реплицироваться в клетке-хозяине таким образом, что клетка-хозяин накапливает большое количество копий вектора экспрессии и, в свою очередь, синтезирует высокие уровни полипептида, кодируемого антигенспецифическим полинуклеотидом в векторе экспрессии. См. публикацию Sambrook et al., выше, стр. 16.17-16.22. Другие векторы и способы, пригодные для адаптации к экспрессии полипептидов хорошо известны в данной области техники и могут быть легко адаптированы к конкретным обстоятельствам.

Используя идею изобретения, представленного в настоящем документе, специалист в данной области техники будет понимать, что эффективность конкретной системы экспрессии может быть исследована путем трансфекции упаковывающих клеток вектором, содержащим ген, кодирующий репортерный белок, и измерения уровня экспрессии с использованием подходящего способа, например, измерения флуоресценции конъюгата зеленого флуоресцентного белка. Подходящие гены-репортеры, хорошо известны в данной области техники.

Типы последовательностей, представляющих интерес

Последовательность, представляющая интерес, не ограничивается любым способом и включает в себя любую нуклеиновую кислоту, которую обычный специалист в данной области техники хочет интегрировать, транскрибировать и экспрессировать в клетке-мишени. Продукт может представлять собой белок или нуклеиновую кислоту. Последовательность, представляющая интерес, может кодировать белок или молекулу нуклеиновой кислоты, включая миРНК, микроРНК, самокомплементарную двухцепочечную РНК, в которой комплементарная область имеет в длину более чем около 20 рибонуклеотидов, или РНК, комплементарную информационной РНК, при этом связывание указанной комплементарной (антисмысловой) РНК с информационной РНК блокирует ее способность быть транслированной в белок. В некоторых случаях последовательность, представляющая интерес, может кодировать антиген, против которого желателен иммунный ответ. В частности, желательны опухолевые антигены и антигены инфекционных заболеваний из таких агентов, как HIV, HSV, HCV, HPV, малярия или туберкулез. Кроме того, в один вектор может быть включено множество последовательностей, представляющих интерес.

В некоторых случаях последовательность, представляющая интерес, может быть геном, кодирующим малую ингибирующую РНК (миРНК) или микроРНК (микроРНК), представляющие интерес, которые подавляют экспрессию молекулы. Например, ген, кодирующий миРНК или микроРНК может быть использован для подавления экспрессии отрицательных регуляторов в клетке, включая те, которые ингибируют активацию или созревание дендритных клеток. миРНК и микроРНК хорошо известны в данной области техники (Fire et al., *Nature* 391:806, 1998; см. также публикацию "The RNA Interference Resource" of Applied Biosystems, Trang et al., *Oncogene Suppl* 2:S52, 2008; Taganov, K., et al. 2007. *Immunity* 26:133-137; Dahlberg, J. E. and E. Lund. 2007. *Sci. STKE* 387:pe25; Tiemann and Rossi, *EMBO Mol Med* 1: 142, 2009). В качестве альтернативы, последовательность, представляющая интерес, может кодировать самокомплементарную двухцепочечную РНК, в которой комплементарная область имеет в длину более чем около 20 рибонуклеотидов или антисмысловую РНК, имеющую в длину более чем около 20 рибонуклеотидов. Специалистам в данной области техники будет понятно, что миРНК, микроРНК, дцРНК и антисмысловые молекулы РНК могут быть экспрессированы из промотора РНК-полимеразы III или, в качестве альтернативы, могут быть компонентом некодирующей РНК, которая транскрибируется с промотора РНК-полимеразы II.

Кроме того, последовательность, представляющая интерес, может кодировать более одного продукта. В некоторых конфигурациях последовательность для доставки может содержать множество генов, кодирующих по меньшей мере один белок, по меньшей мере одну миРНК, по меньшей мере одну микроРНК, по меньшей мере одну дцРНК или по меньшей мере одну молекулу антисмысловой РНК или любые их комбинации. Например, последовательность для доставки может содержать один или более генов, которые кодируют один или больше антигенов, против которых желателен иммунный ответ. Один или более антигенов могут быть связаны с одним заболеванием или расстройством, или они могут быть связаны с множеством заболеваний и/или расстройств. В некоторых случаях ген, кодирующий иммунный регуляторный белок, может быть включен вместе с геном, кодирующим антиген, против которого желателен иммунный ответ, и указанная комбинация может вызывать и регулировать иммунный ответ к желаемому направлению и величине. В других случаях последовательность, кодирующая миРНК, микроРНК, дцРНК или молекулу антисмысловой РНК, может быть сконструирована с геном, кодирующим антиген, против которого желателен иммунный ответ, и указанная комбинация может регулировать диапазон иммунного ответа. Продукты могут быть получены как продукт первоначального слияния, в кото-

ром кодирующая последовательность находится в функциональной связи с одним промотором. В качестве альтернативы, продукты могут быть закодированы по отдельности, и каждая кодирующая последовательность находится в функциональной связи с промотором. Промоторы могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых конфигурациях векторы содержат полинуклеотидные последовательности, которые кодируют факторы созревания/стимуляции дендритных клеток. Иллюстративные стимулирующие молекулы включают GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, CD40 лиганд (CD40L), индуцируемый лекарственными средствами CD40 (iCD40) и т.п. Эти полинуклеотиды, как правило, находятся под контролем одного или более регуляторных элементов, которые направляют экспрессию кодирующих последовательностей в дендритных клетках. Созревание дендритных клеток способствует успешной вакцинации (Banchereau, J and Palucka, A. K. *Nat. Rev. Immunol.* 5:296-306 (2005); Schuler, G. et al. *Curr. Opin. Immunol.* 15:138-147 (2003); Figdor, C. G. et al. *Nat. Med.* 10:475-480 (2004)). Созревание может трансформировать ДК из клеток, активно участвующих в захвате антигена, в клетки, специализированные для примирования Т-клеток. Например, вовлечение CD40 посредством CD40L на CD4-хелперных Т-клетках является критическим сигналом для созревания ДК, в результате чего происходит мощная активация Т-клеток CD8. Такие стимулирующие молекулы также называются факторами созревания или факторами, стимулирующими созревание. Иммунные контрольные точки представляют серьезные препятствия для активации функционального клеточного иммунитета при раке, и антагонистические антитела, специфичные к ингибирующим лигандам на Т-клетках, включая белки CTLA4 и запрограммированной смерти-1 (PD-1), являются примерами целевых веществ, которые подвергаются оценке в клиниках. Важным механизмом устойчивости при хронических инфекциях и раковом заболевании является функциональное истощение Ag-специфических Т-клеток, которые экспрессируют высокие уровни PD-1. Поскольку было продемонстрировано, что активность терапевтической иммунизации значительно увеличивается посредством комбинации с иммунной контрольной точкой, в качестве не ограничивающего примера, специалистам с обычной квалификацией в данной области техники может быть очевидно, что альтернативный подход к ингибированию иммунной контрольной точки представляет собой ингибирование экспрессии лигандов запрограммированной смерти (PD) один и два (PD-L1/L2). Одним из способов выполнения ингибирования является экспрессия молекул РНК, таких как те, что описаны в настоящем документе, которые подавляют экспрессию PD-L1/L2 в ДК, трансдуцированных лентивирусным вектором, кодирующим одну или более молекул РНК. Созревание ДК или экспрессия отдельных элементов, таких как иммунные контрольные точки, например лиганды PD-1, могут быть охарактеризованы с помощью анализа проточной цитометрии активации поверхностного маркера, такого как МНС II и профили экспрессированных хемокинов и цитокинов.

Последовательность, кодирующая детектируемый продукт, обычно белок, может быть включена для обеспечения идентификации клеток, которые экспрессируют заданный продукт. Например, флуоресцентный маркерный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), включен в конструктор вместе с последовательностью, представляющей интерес (например, кодирующей антиген). В других случаях, белок может быть детектируемым с помощью антитела или белок может представлять собой фермент, который действует на подложке с получением детектируемого продукта или продукта, который представляет возможность селекции трансфицированной или трансдуцированной клетки-мишени, например придает лекарственную устойчивость, такую как устойчивость к гиромизину. Типичные гены селекции кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, пригодным для использования в эукариотических клетках, например неомицину, метотрексату, бластицидину, среди прочих, известных в данной области техники, или пополняют ауксотрофные дефициты, или снабжают необходимыми питательными веществами из питательных сред. Селектируемый маркер может необязательно присутствовать на отдельной плазмиде и вводиться путем котрансфекции.

Могут быть использованы одна или более мультицистронных единиц экспрессии, которые включают два или более элементов (например, последовательность(и), представляющую интерес, молекулу оболочки, факторы созревания ДК), необходимых для производства желаемого вируса в упаковывающих клетках. Использование мультицистронных векторов уменьшает общее количество необходимых молекул нуклеиновых кислот и, таким образом, позволяет избежать возможных трудностей, связанных с координацией экспрессии во множестве векторных геномов. В мультицистронном векторе различные элементы, подлежащие экспрессии, являются функционально связанными с одним или более промоторами (и, при необходимости, с другими контрольными элементами). В некоторых конфигурациях мультицистронный вектор содержит последовательность, представляющую интерес, последовательность, кодирующую репортерный продукт и вирусные элементы. Последовательность, представляющая интерес, обычно кодирует антиген и, необязательно, фактор созревания ДК. Иногда мультицистронный вектор содержит ген, кодирующий антиген, ген, кодирующий фактор созревания ДК и вирусные элементы.

Раскрытые псевдотипированные лентивирусные векторы могут быть сконструированы для экспрессии более одного, например, двух, трех или четырех антигенов одновременно. В данной области техники известно несколько способов одновременной экспрессии более одного гена из одного вектора. Например, векторы могут содержать множество промоторов, слитых с открытыми рамками считывания генов

(ORF), инсерцию между генами сигналов сплайсинга, слияние генов, экспрессия которых управляется одним промотором, инсерцию между генами сайтов протеолитического расщепления, инсерцию между генами сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES), инсерцию между генами двунаправленных промоторов, и/или "саморасщепляющихся" 2А пептидов. Каждый компонент, подлежащий экспрессии в мультицистронном векторе экспрессии, может быть отделен, например, с помощью элемента сайта внутренней посадки рибосомы (IRES) или вирусного 2А элемента, чтобы предоставить возможность раздельной экспрессии различных белков из одного и того же промотора. Элементы IRES и элементы 2А известны в данной области техники (патент США № 4937190; публикация de Felipe et al. 2004. *Traffic* 5: 616-626, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В одном варианте реализации олигонуклеотиды, кодирующие последовательности сайта расщепления фурином (RAKR) (публикация Fang et al. 2005. *Nat. Biotech* 23: 584-590, включенная в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме) связанные с 2А-подобными последовательностями вируса ящура (FMDV; F2A), вируса-1 болезни Тешена (энцефаломиелита) свиней (P2A), вируса ринита А лошадей (ERAV; E2A) и вируса *thosa asigna* (TaV; T2A) (публикация Szymczak et al. 2004. *Nat. Biotechnol.* 22: 589-594, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме) используются для разделения генетических элементов в мультицистронном векторе. Консенсусная последовательность 2А пептида представляет собой D(V/I)EXNPGP (SEQ ID NO: 56). В некоторых вариантах реализации лентивирусный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий T2A (SEQ ID NO: 57). В некоторых вариантах реализации пептид 2А кодируется полинуклеотидом SEQ ID NO: 52. Эффективность конкретного мультицистронного вектора может быть легко исследована путем детектирования экспрессии каждого из генов с использованием стандартных протоколов.

Также может быть выполнена экспрессия двух или более антигенов с использованием сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES позволяет эукариотическим рибосомам входить и сканировать мРНК в положении, отличном от структуры 5' м⁷ G-кэп. При расположении внутри, например, 3' первой кодирующей области (или цистрона), IRES позволяет трансляцию второй кодирующей области в пределах того же транскрипта. Вторая кодирующая область идентифицируется первым ATG, который встречается после IRES. Иллюстративные элементы IRES включают элементы вирусного IRES, такого как, например, IRES пикорнавирусов и IRES кардиовирусов (см., например, патент США №. 4937190) и элементы невирусного IRES, находящиеся в 5' UTR (например, те элементы транскриптов, которые кодируют белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP) (Macejak et al., *Nature*, 35390-4, 1991); *Drosophila Antennapedia* (Oh et al., *Genes Dev.* 6:1643-53, 1992) и *Ultrabithorax* (Ye et al., *Mol. Cell Biol.*, 17:1714-21, 1997); фактор роста фибробластов 2 (Vagner et al., *Mol. Cell Biol.*, 15:35-44, 1995); фактор инициации eIF4G (Gan et al., *J. Biol. Chem.* 273:5006-12, 1998); протоонкоген c-мус (Nanbru et al., *J. Biol. Chem.*, 272:32061-6, 1995; Stoneley, *Oncogene*, 16:423-8, 1998); и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Stein et al., *Mol. Cell Biol.*, 18:3112-9, 1998).

Экспрессия двух или более антигенов также может быть осуществлена с использованием двунаправленных промоторов, т.е. области промотора или двух последовательно клонированных промоторов, точки направлений считывания которых находятся на расстоянии друг от друга, и из которых транскрибируются две открытые рамки считывания, фланкирующие область промотора. Примеры таких промоторов включают промоторы PDGF-A, нейротропного вируса JC, BRCA1, транскобаламина II и дипептидилпептидазы IV.

В конкретном иллюстративном примере геном вирусного вектора содержит последовательность энхансера/промотора цитомегаловируса (CMV); последовательности R и U5 из HIV 5' LTR; упаковывающую последовательность (ψ); флэп сигнал HIV-1; внутренний энхансер; внутренний промотор; ген, представляющий интерес; чувствительный элемент вируса гепатита сурка; последовательность амбер-супрессорной тРНК; элемент U3 с делецией его энхансерной последовательности; изолирующую последовательность куриного β -глобина; и последовательности R и U5 из 3' HIV LTR. В некоторых иллюстративных примерах векторный геном содержит интактный лентивирусный 5' LTR и самоинактивирующийся 3' LTR (публикация Iwakuma et al. *Virology* 15:120, 1999, включена посредством ссылки в полном объеме).

Конструирование векторного генома может быть выполнено с использованием любых подходящих способов генной инженерии, известных в данной области техники, включая, без ограничения, стандартные способы расщепления рестрикционной эндонуклеазой, лигирования, трансформации, очистки плазмиды и секвенирования ДНК, например, как описано в публикациях Sambrook et al. (1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.), Coffin et al. (*Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) и "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000), каждая из вышеизложенных включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых вариантах реализации последовательность, представляющая интерес, кодирует по меньшей мере один антиген. Любой антиген, связанный с заболеванием или расстройством, может быть доставлен в дендритные клетки с использованием вирусных частиц, как описано в настоящем документе.

Антиген, связанный с заболеванием или расстройством, идентифицируется для приготовления вирусной частицы, которая нацелена на дендритные клетки. Антигены, связанные с множеством заболеваний и расстройств, хорошо известны в данной области техники. Антиген может быть ранее известен как связанный с заболеванием или расстройством, или может быть идентифицирован любым способом, известным в данной области техники. Например, антиген к типу рака, от которого страдает пациент, может быть известным, например опухолеспецифическим антигеном, или может быть идентифицирован из самой опухоли с помощью любого из множества способов, известных в данной области техники.

Опухолеспецифические антигены известны для различных видов рака, включая, например, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы, меланому и рак молочной железы. При некоторых видах рака молочной железы, например, на поверхности раковых клеток избыточно экспрессируется рецептор Her-2. Иллюстративные опухолевые антигены включают, но не ограничиваются перечисленным, MAGE, например, MAGE-A3 и MAGE-A1, BAGE, RAGE, и NY-ESO-1, которые представляют собой не мутированные антигены, экспрессируемые в иммунно-привилегированных областях яичек и в различных опухолевых клетках; линиеспецифические опухолевые антигены, такие как антигены линии меланомы-цитомеланомы, MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, тирозиназа и белок, связанный с тирозиназой, например, TRP2; почечно-клеточную карциному - 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I и IX (также известные как G250), факторы, индуцируемые гипоксией (например, HIF-1альфа and HIF-2альфа), VEGF или простатический специфический мембранный антиген (PSMA), простатический специфический антиген (PSA), простатические кислые фосфатазы и шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы (STEAP), NKX3.1, которые представляют собой антигены, экспрессируемые в нормальных и опухолевых клетках, полученных из одной и той же ткани; белки/пептиды эпитопов, полученные из генов мутированных в опухолевых клетках или генов транскрибированных на различных уровнях в опухоли по сравнению с нормальными клетками, например, фермент теломеразы, сурвивин, мезотелин, мутированный gas, реаранжировка bcr/abl, Her2/neu, мутированный или дикого типа p53, цитохром P450 1B1 и аномально экспрессируемые последовательности интрона, например N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-V; клональные реаранжировки генов иммуноглобулинов, образующие уникальные идиотипы миеломы и В-клеточных лимфом; белки/пептиды эпитопов, полученные из онковирусных процессов, например белки E6 и E7 папилломавируса человека; не мутированные онкофетальные белки с опухолеселективной экспрессией, например раково-эмбриональный антиген и альфа-фетопротеин. Был рассмотрен ряд опухолеспецифических антигенов (см., например, публикации "Tumor-Antigens Recognized By T-Lymphocytes," Boon T, Cerottini J C, Vandeneijnde B, Vanderbruggen P, Vanpel A, Annual Review Of Immunology 12: 337-365, 1994; "A listing of human tumor antigens recognized by T cells," Renkvist N, Castelli C, Robbins P F, Parmiani G. Cancer Immunology Immunotherapy 50: (1) 3-15 MAR 2001, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

В некоторых или любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, псевдотипированный лентивирусный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий MAGE-A3 (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах реализации MAGE-A3 кодируется полинуклеотидом SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах реализации MAGE-A3 кодируется полинуклеотидом, который по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% идентичен SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах реализации псевдотипированный лентивирусный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий фрагмент MAGE-A3 из по меньшей мере 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 или 310 аминокислот SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует вариант MAGE-A3, который, по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 процентов идентичен SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах реализации псевдотипированный

лентивирусный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 59). В некоторых вариантах реализации NY-ESO-1 кодируется полинуклеотидом SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах реализации MAGE-A3 кодируется полинуклеотидом, который, по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 процентов идентичен SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах реализации псевдотипированный лентивирусный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий фрагмент NY-ESO-1 из по меньшей мере 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 или 170 аминокислот SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид кодирует вариант NY-ESO-1, который, по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 процентов идентичен SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах реализации псевдотипированный лентивирусный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий MAGE-A3 (SEQ ID NO: 58) и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 59). В некоторых или любом из вариантов реализации NY-ESO-1 и MAGE-A3 экспрессируются из того же транскрипта, что и гибридный белок, содержащий NY-ESO-1 и MAGE-A3 и саморасщепляющийся пептид A2 между двумя антигенами, например, SEQ ID NO: 56 или 57. Антигены могут располагаться в любом порядке (например, NY-ESO-1 первый, а MAGE-A3 второй или MAGE-A3 первый, а NY-ESO-1 второй).

Антиген может представлять собой также антиген, связанный инфекционным заболеванием, таким как, например, HIV/AIDS. Антиген может представлять собой, например, gp120 (публикации Klimstra, W. B., et al. 2003. J Virol 77:12022-12032; Bernard, K. A., et al. 2000. Virology 276:93-103; Byrnes, A. P., et al. 1998. J Virol 72: 7349-7356, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в

полном объеме). Другие примеры антигенов включают, но не ограничиваются перечисленным: gag, pol, env, tat, nef and rev (публикации Lieberman, J. et al. 1997. AIDS Res Hum Retroviruses 13(5): 383-392; Mendez-Arias, L. et al. 1998. Viral Immunol 11(4): 167-181, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

Примеры вирусных антигенов включают, но не ограничиваются перечисленным, полипептиды аденовирусов, полипептиды альфавирусов, полипептиды калицивирусов, например, калицивирусный капсидный антиген, полипептиды коронавирусов, полипептиды вируса чумы плотоядных, полипептиды вируса Эбола, полипептиды энтеровирусов, полипептиды флавивирусов, полипептиды вирусов гепатита (AE), например, ядерный или поверхностный антиген вируса гепатита В или гликопротеины E1 или E2 вируса гепатита С, ядерные или неструктурные белки, полипептиды вирусов герпеса, например, гликопротеин вируса простого герпеса или вируса ветряной оспы, полипептиды вируса иммунодефицита, например, оболочка или протеаза вируса иммунодефицита человека, полипептиды вируса инфекционного перитонита, полипептиды вирусов гриппа, например гемагглютинин, нейраминидаза или нуклеопротеин вируса гриппа А, полипептиды вирусов лейкемии, полипептиды вируса Марбург, полипептиды ортомиксовирусов, полипептиды вирусов папилломы, полипептиды вирусов парагриппа, например, гемагглютинин/нейраминидаза, полипептиды парамиксовирусов, полипептиды парвовирусов, полипептиды пестивирусов, полипептиды пикорнавирусов, например капсидный полипептид вируса полиомиелита, полипептиды вируса оспы, например, полипептид вируса осповакцины, полипептиды вируса бешенства, например, гликопротеин G вируса бешенства, полипептиды реовирусов, полипептиды ретровирусов и полипептиды ротавирусов.

Примеры бактериальных антигенов включают, но не ограничиваются перечисленным, полипептиды *Actinomyces*, полипептиды *Bacillus*, полипептиды *Bacteroides*, полипептиды *Bordetella*, полипептиды *Bartonella*, полипептиды *Borrelia*, например, *B. burgdorferi* OspA, полипептиды *Brucella*, полипептиды *Campylobacter*, полипептиды *Carnocytophaga*, полипептиды *Chlamydia*, полипептиды *Clostridium*, полипептиды *Corynebacterium*, полипептиды *Coxiella*, полипептиды *Dermatophilus*, полипептиды *Enterococcus*, полипептиды *Ehrlichia*, полипептиды *Escherichia*, полипептиды *Francisella*, полипептиды *Fusobacterium*, полипептиды *Haemobartonella*, полипептиды *Haemophilus*, например наружный мембранный белок H. influenzae типа b, полипептиды *Helicobacter*, полипептиды *Klebsiella*, полипептиды бактерий L-формы, *Leptospira* полипептиды, *Listeria* полипептиды, полипептиды *Mycobacteria*, полипептиды *Mycoplasma*, полипептиды *Neisseria*, полипептиды *Neorickettsia*, полипептиды *Nocardia*, полипептиды *Pasteurella*, полипептиды *Peptococcus*, полипептиды *Peptostreptococcus*, полипептиды *Pneumococcus*, полипептиды *Proteus*, полипептиды *Pseudomonas*, полипептиды *Rickettsia*, полипептиды *Rochalimaea*, полипептиды *Salmonella*, полипептиды *Shigella*, полипептиды *Staphylococcus*, полипептиды *Streptococcus*, например, M белки *S. pyogenes*, полипептиды *Treponema* и полипептиды *Yersinia*, например, антигены F1 и V Y. *pestis*.

Примеры грибковых антигенов включают, но не ограничиваются перечисленным, полипептиды *Abisidia*, полипептиды *Acremonium*, полипептиды *Alternaria*, полипептиды *Aspergillus*, полипептиды *Basidiobolus*, полипептиды *Bipolaris*, полипептиды *Blastomyces*, полипептиды *Candida*, полипептиды *Coccidioides*, полипептиды *Conidiobolus*, полипептиды *Cryptococcus*, полипептиды *Curvalaria*, полипептиды *Epidermophyton*, полипептиды *Exophiala*, полипептиды *Geotrichum*, полипептиды *Histoplasma*, полипептиды *Madurella*, полипептиды *Malassezia*, полипептиды *Microsporum*, полипептиды *Moniliella*, полипептиды *Mortierella*, полипептиды *Mucor*, полипептиды *Paecilomyces*, полипептиды *Penicillium*, полипептиды *Phialemonium*, полипептиды *Phialophora*, полипептиды *Prototheca*, полипептиды *Pseudallescheria*, полипептиды *Pseudomicrodochium*, полипептиды *Pythium*, полипептиды *Rhinosporidium*, полипептиды *Rhizopus*, полипептиды *Scolecobasidium*, полипептиды *Sporothrix*, полипептиды *Stemphylium*, полипептиды *Trichophyton*, полипептиды *Trichosporon* и полипептиды *Xylohypha*.

Примеры антигенов простейших паразитов включают, но не ограничиваются перечисленным, полипептиды *Babesia*, полипептиды *Balantidium*, полипептиды *Besnoitia*, полипептиды *Cryptosporidium*, полипептиды *Eimeria*, полипептиды *Encephalitozoon*, полипептиды *Entamoeba*, полипептиды *Giardia*, полипептиды *Hammondia*, полипептиды *Hepatozoon*, полипептиды *Isospora*, полипептиды *Leishmania*, полипептиды *Microsporidia*, полипептиды *Neospora*, полипептиды *Nosema*, полипептиды *Pentatrichomonas*, полипептиды *Plasmodium*, например циркумспорозоит *P. falciparum* (PfCSP), поверхностный белок 2 спорозоитов (PfSSP2), карбоксильный конец антигена печеночной стадии 1 (PfLSA1 с-конец) и экспортированный белок 1 (PfExp-1), полипептиды *Pneumocystis*, полипептиды *Sarcocystis*, полипептиды *Schistosoma*, полипептиды *Theileria*, полипептиды *Toxoplasma* и полипептиды *Trypanosoma*.

Примеры антигенов паразитов-гельминтов включают, но не ограничиваются перечисленным, полипептиды *Acanthocheilonema*, полипептиды *Aelurostrongylus*, полипептиды *Ancylostoma*, полипептиды *Angiostrongylus*, полипептиды *Ascaris*, полипептиды *Brugia*, полипептиды *Bunostomum*, полипептиды *Capillaria*, полипептиды *Chabertia*, полипептиды *Cooperia*, полипептиды *Crenosoma*, полипептиды *Dictyocaulus*, полипептиды *Diocetophyme*, полипептиды *Dipetalonema*, полипептиды *Diphyllbothrium*, полипептиды *Dipylidium*, полипептиды *Dirofilaria*, полипептиды *Dracunculus*, полипептиды *Enterobius*, полипептиды *Filaroides*, полипептиды *Haemonchus*, полипептиды *Lagochilascaris*, полипептиды *Loa*, полипептиды *Mansonella*, полипептиды *Muellerius*, полипептиды *Nanophyetus*, полипептиды *Necator*, полипептиды

Nematodirus, полипептиды Oesophagostomum, полипептиды Onchocerca, полипептиды Opisthorchis, полипептиды Ostertagia, полипептиды Parafilaria, полипептиды Paragonimus, полипептиды Parascaris, полипептиды Physaloptera, полипептиды Protostrongylus, полипептиды Setaria, полипептиды Spirocera, полипептиды Spirometra, полипептиды Stephanofilaria, полипептиды Strongyloides, полипептиды Strongylus, полипептиды Thelazia, полипептиды Toxascaris, полипептиды Toxocara, полипептиды Trichinella, полипептиды Trichostrongylus, полипептиды Trichuris, полипептиды Uncinaria и полипептиды Wuchereria.

Примеры антигенов эктопаразитов включают, но не ограничиваются перечисленным, полипептиды (включая защитные антигены, а также аллергены) от блох; клещей, в том числе жестких клещей и мягких клещей; двукрылых, таких как мошки, комары, москиты, гнус, слепни, жигалки коровьи малые, олени слепни, мухи цеце, жигалки обыкновенные, мухи, вызывающие миазис, кусающие комары; муравьи; пауки, вши; клещи; и клопы, такие как постельные клопы и триатомовые клопы.

После идентификации и отбора антигена последовательность, которая кодирует желаемый антиген, является идентифицированной. Предпочтительно последовательность содержит кДНК. После инфицирования вирусом, последовательность, представляющая интерес (например, кодирующая антиген), экспрессируется целевыми дендритными клетками. При контактировании *ex vivo* целевые дендритные клетки затем переносят обратно пациенту, например, путем инъекции, где они взаимодействуют с иммунными клетками, способными генерировать иммунный ответ против заданного антигена. В предпочтительных вариантах реализации рекомбинантный вирус вводят посредством инъекции в организм пациента, где он трансдуцирует целевые дендритные клетки *in situ*. Затем дендритные клетки экспрессируют конкретный антиген, связанный с заболеванием или расстройством, подлежащим лечению, и пациент может установить эффективный иммунный ответ против заболевания или расстройства.

Геном вирусного вектора может содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую более чем один антиген, и после трансдукции целевой дендритной клетки создает иммунные ответы на множество антигенов, доставленных в клетку. В некоторых вариантах реализации антигены связаны с одним заболеванием или расстройством. В других вариантах реализации антигены связаны со многими заболеваниями или расстройствами. В некоторых вариантах реализации геном вирусного вектора содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую MART-1/Melan-A, NY-ESO-1 и MAGE.

Получение вирусных частиц

Любой из множества способов, уже известных в данной области техники, может быть использован для получения инфекционных вирусных, например лентивирусных частиц, геном которых содержит РНК копию генома вирусного вектора. В одном способе геном вирусного вектора вводится в упаковывающей клеточной линии, которая содержит все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с генома вирусного вектора, в вирусные частицы. В качестве альтернативы, геном вирусного вектора может содержать один или более генов, кодирующих вирусные компоненты в дополнение к одной или более последовательностям, представляющим интерес. Однако, для того чтобы предотвратить репликацию генома в клетке-мишени, необходимые для репликации эндогенные вирусные гены, как правило, должны быть удалены и предоставлены в упаковывающей клеточной линии отдельно.

В общем, лентивирусные векторные частицы получают при помощи клеточной линии, которую трансфецируют одним или более плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для создания частиц. Эти лентивирусные векторные частицы, как правило, не являются репликационно-компетентными, то есть, они способны только на один раунд инфекции. Чаще всего, для разделения различных генетических компонентов, которые генерируют лентивирусные векторные частицы, используется множество плазмидных векторов, в основном, чтобы уменьшить вероятность событий рекомбинации, которые могли бы генерировать репликационно-компетентные вирусы. Однако при желании может быть использован один плазмидный вектор, имеющий все компоненты лентивирусов. В качестве одного примера системы, в которой используется множество плазмидных векторов, клеточную линию трансфецировали по меньшей мере одной плазмидой, содержащей геном вирусного вектора (т.е. плазмидой с векторным геномом), включая LTR, цис-действующие упаковывающие последовательности и последовательность(и), представляющую интерес, которая часто функционально связана с гетерологичным промотором по меньшей мере одной плазмидой, кодирующей ферментативные и структурные компоненты вирусов (например, упаковывающей плазмидой, кодирующей такие компоненты, как, Gag и Pol), и по меньшей мере одной оболочечной плазмидой, кодирующей гликопротеин оболочки арбовирусов. Для повышения производства ретровирусной частицы могут быть использованы дополнительные плазмиды, например плазмиды Rev-экспрессии, как описано в настоящем документе и известно в данной области техники. Вирусные частицы "прорастают" через клеточную мембрану и содержат ядро, которое включает геном, содержащий последовательность, представляющую интерес и гликопротеин арбовирусной оболочки, нацеленный на дендритные клетки. Если арбовирусный гликопротеин представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис, то указанный гликопротеин сконструирован для уменьшения связывания с гепарансульфатом по сравнению с эталонным штаммом HR гликопротеина E2 (SEQ ID NO: 18).

Трансфекция упаковывающих клеток плазмидными векторами по настоящему раскрытию может быть выполнена с помощью хорошо известных способов, и способ, который будет использоваться, нико-

им образом не ограничен. Ряд невирусных систем доставки известен в данной области техники, в том числе, например, электропорация, системы доставки на основе липидов, включая липосомы, доставка "голой" ДНК, и доставка с помощью соединений полициклодекстрина, таких как те, которые описаны в публикации Schatzlein AG. (2001. Non-Viral Vectors in Cancer Gene Therapy: Principles and Progresses. Anticancer Drugs, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Обычно используют способы обработки катионным липидом или солью, см., например, публикации Graham et al. (1973. Virol. 52:456; Wigler et al. (1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-76), каждая из вышеизложенных включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Чаще всего используется способ осаждения фосфатом кальция. Тем не менее, также могут быть использованы другие способы введения вектора в клетки, включая нуклеарную микроинъекцию и слияние протопластов бактерий.

Упаковывающая клеточная линия предоставляет компоненты, в том числе вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы для преобразования для упаковки вирусной геномной РНК в лентивирусные векторные частицы. Упаковывающая клеточная линия может представлять собой любую клеточную линию, которая способна экспрессировать лентивирусные белки и производить функциональные лентивирусные векторные частицы. Некоторые подходящие упаковывающие клеточные линии включают клетки 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430). Упаковывающая клеточная линия может стабильно экспрессировать необходимые вирусные белки. Такая упаковывающая клеточная линия описана, например, в патенте США № 6218181, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В качестве альтернативы упаковывающая клеточная линия может быть временно трансфицирована молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или более необходимых вирусных белков вместе с геномом вирусного вектора. Полученные в результате вирусные частицы собирают и используют для инфицирования клетки-мишени. Ген(ы), кодирующий(ие) гликопротеин(ы) оболочки обычно клонируют в вектор экспрессии, такой как pcDNA3 (Invitrogen, CA USA). Экспрессирующие векторы эукариотических клеток хорошо известны в данной области техники и доступны из ряда коммерческих источников. Упаковывающие клетки, такие как клетки 293T, затем совместно трансфицируют геномом вирусного вектора, кодирующего последовательность, представляющую интерес (как правило, кодирующего антиген), по меньшей мере одной плазмидой, кодирующей компоненты упаковки вируса и вектором для экспрессии целевых молекул. Оболочка экспрессируется на мембране упаковывающей клетки и встраивается в вирусный вектор.

Производство вируса измеряется, как описано в настоящем документе, и выражается в ИЕ на объем. ИЕ представляет собой инфекционную единицу или, альтернативно, единицы трансдукции (ТЕ); ИЕ и ТЕ могут использоваться взаимозаменяемо в качестве количественной меры титра препарата вирусной векторной частицы. Как описано в настоящем документе, получают вирус, в котором геном может экспрессировать легко измеримый продукт. Предпочтительным является флуоресцентный белок, зеленый флуоресцентный белок. Лентивирусный вектор обычно является неинтегрирующим. Затем вирус вводят в клетки-мишени, и определяют количество клеток-мишеней, экспрессирующих GFP, например, с помощью проточной цитометрии. После этого рассчитывают титр. Титр предпочтительно является как можно более высоким, но составляет, по меньшей мере 1×10^5 ИЕ/мл, по меньшей мере 3×10^5 ИЕ/мл, по меньшей мере 1×10^6 ИЕ/мл, по меньшей мере 3×10^6 ИЕ/мл или по меньшей мере 1×10^7 ИЕ/мл клеточного супернатанта (до любого концентрирования). В качестве альтернативы, титр составляет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 100% от титра того же лентивирусного вектора, псевдотипированного в тех же клетках с оболочкой VSV-G.

Получение высокоманнозилированных вирусных частиц

Белок оболочки вируса Синдбис содержит четыре N-связанных гликана - два на белке E2 и два на белке E1. Два N-гликана вируса, полученного в клетках млекопитающих в отсутствие ингибитора маннозидазы I, имеют высокоманнозную структуру (один N-связанный гликан E2 и один N-связанный гликан E1), в то время как остальные два имеют сложную структуру. Два N-гликана со сложной структурой экспонированы на поверхности белка оболочки, в то время как два N-гликана с высокоманнозной структурой залегают в центре тримера оболочечных белков. Частицы вируса Синдбис со сложными N-связанными гликанами не связывают DC-SIGN также эффективно, как частицы с менее сложными, высокоманнозилированными гликопротеинами.

В настоящем описании авторы показывают, что вирусные частицы, полученные в клетках млекопитающих в присутствии ингибитора маннозидазы I кифунензина, неожиданно демонстрируют значительно повышенное связывание с DC-SIGN по сравнению с частицами, полученными в присутствии DMNJ.

В некоторых или любом из вариантов реализации упаковывающую вирусную клетку культивируют в присутствии ингибитора маннозидазы I. В некоторых или любом из вариантов реализации ингибитор маннозидазы I представляет собой кифунензин. В некоторых вариантах реализации кифунензин присутствует в среде в концентрации от около 0,01 мкг/мл до около 1 мкг/мл, от около 0,1 до около 10 мкг/мл, около 0,1 до около 9 мкг/мл, около 0,1 до около 8 мкг/мл, около 0,1 до около 7 мкг/мл, около 0,1 до около 6 мкг/мл, около 0,1 до около 5 мкг/мл, около 0,1 до около 4 мкг/мл, около 0,1 до около 3 мкг/мл, около

0,1 до около 2 мкг/мл, около 0,1 до около 1 мкг/мл, около 0,25 до около 10 мкг/мл, около 0,25 до около 9 мкг/мл, около 0,25 до около 8 мкг/мл, около 0,25 до около 7 мкг/мл, около 0,25 до около 6 мкг/мл, около 0,25 до около 5 мкг/мл, около 0,25 до около 4 мкг/мл, около 0,25 до около 3 мкг/мл, около 0,25 до около 2 мкг/мл или около 0,25 до около 1 мкг/мл.

В некоторых или любом из вариантов реализации, в котором псевдотипированная лентивирусная векторная частица содержит гликопротеин E2 вируса Синдбис и белок Vprx, лентивирусные частицы получены в присутствии ингибитора маннозидазы I. В некоторых вариантах реализации ингибитор маннозидазы представляет собой дезоксиманноджиримицин (DMNJ). В предпочтительных вариантах реализации ингибитор маннозидазы представляет собой кифунензин. В некоторых вариантах реализации DMNJ присутствует в среде в концентрации от около 1,0 мкг/мл до около 1,0 мг/мл, около 1,0 до около 900 мкг/мл, около 1,0 до около 800 мкг/мл, около 1,0 до около 700 мкг/мл, около 1,0 до около 600 мкг/мл, около 1,0 до около 500 мкг/мл, около 1,0 до около 400 мкг/мл, около 1,0 до около 300 мкг/мл, около 1,0 до около 200 мкг/мл, около 1,0 до около 100 мкг/мл, около 50 до около 500 мкг/мл, около 50 до около 400 мкг/мл, около 50 до около 300 мкг/мл, около 100 до около 500 мкг/мл, около 100 до около 400 мкг/мл, около 100 до около 300 мкг/мл, около 100 до около 200 мкг/мл, около 200 до около 500 мкг/мл или около 200 до около 400 мкг/мл.

В некоторых или любом из вариантов реализации псевдотипированная лентивирусная векторная частица, полученная в присутствии ингибитора маннозидазы I (например, кифунензина) содержит гликопротеин оболочки (например, E2 вируса Синдбис), при этом по меньшей мере 60% N-связанных гликанов содержат структуру Манноза₅ (Man₅), Man₆, Man₇, Man₈ и/или Man₉. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% N-связанных гликанов содержат структуру Man₅, Man₆, Man₇, Man₈ и/или Man₉ +.

В одном из сценариев один или несколько векторов используются для введения полинуклеотидных последовательностей в упаковывающую клеточную линию для приготовления лентивирусной векторной частицы, псевдотипированной с гликопротеином оболочки вируса Синдбис, например, E2, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации лентивирусная векторная частица является высокоманнозилированной. В некоторых вариантах реализации лентивирусная векторная частица также содержит белок Vprx или его вариант. В еще одном варианте реализации лентивирусная векторная частица является высокоманнозилированной и содержит белок Vprx или его вариант. Векторы могут содержать полинуклеотидные последовательности, кодирующие различные компоненты вируса, включая оболочку вируса Синдбис, последовательность(и), представляющую(ие) интерес (как правило, кодирующую антиген), а также любые компоненты, необходимые для производства вируса, которые не предоставляются упаковывающей клеткой.

Профиль гликозилирования белка вирусной оболочки может быть определен с помощью любого способа, известного в данной области техники. Например, можно сравнить анализы изменения подвижности в геле вирусных гликопротеинов, обработанных гликозидазами (например, ЭндоН или PNGазой F) или оставшихся не обработанными. Другие способы включают расщепление гликанов из вирусных гликопротеинов и разделение и идентификацию компонентов с помощью способов ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Доставка вируса

Вирус может быть доставлен в клетку-мишень любым путем, который позволяет вирусу контактировать с клеткой-мишенью, например дендритной клеткой (ДК), в которую желательна доставка полинуклеотида, представляющего интерес. Иногда подходящее количество вируса будут вводить человеку или другому животному непосредственно (in vivo), например, посредством инъекции в организм. Подходящие животные включают, без ограничения, лошадей, собак, кошек, крупный рогатый скот, свиней, овец, кроликов, кур и других птиц. Вирусные частицы могут быть введены посредством инъекции при помощи ряда путей введения, таких как внутривенный, внутрикожный, подкожный, интранодальный, внутрь брюшной полости или через слизистую оболочку. Вирус может быть доставлен с использованием устройства для подкожных инъекций, например устройств, описанных в патентах США под номерами 7241275, 7115108, 7108679, 7083599, 7083592, 7047070, 6971999, 6808506, 6780171, 6776776, 6689118, 6670349, 6569143, 6494865, 5997501, 5848991, 5328483, 5279552, 4886499, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Также подходят другие места инъекции, например, непосредственно в органы, содержащие клетки-мишени. Например, инъекция в лимфатический узел, инъекция в селезенку или инъекция в костный мозг могут быть использованы для доставки вируса в лимфатический узел, селезенку и костный мозг, соответственно. В зависимости от конкретных обстоятельств и природы клеток-мишеней, введение может осуществляться с помощью других средств, включая, например, ингаляцию или непосредственный контакт с эпителиальными тканями, например, в глазу, полости рта или на коже.

В качестве альтернативы представлены клетки-мишени, контактирующие с вирусом in vitro, например, в планшетах для культивирования. Клетки-мишени обычно представляют собой популяции клеток,

содержащие дендритные клетки, полученные от здорового субъекта или субъекта, нуждающегося в лечении, или у которого желательно стимулировать иммунный ответ на антиген. Способы получения клеток у субъекта хорошо известны в данной области техники и включают флеботомию, хирургическое иссечение и биопсию. ДК человека также можно создавать путем получения гемопоэтических клеток-предшественников человека CD34 α^+ и с использованием способа культивирования *in vitro*, как описано в других публикациях (например, в публикации Banchereau et al. Cell 106, 271-274 (2001) включенной посредством ссылки в полном объеме).

Вирус может быть суспендирован в питательной среде и добавлен в лунки планшета для культивирования, пробирку или другой контейнер. Среда, содержащая вирус, могут быть добавлены перед посевом клеток или после посева клеток. Клетки обычно инкубируют в соответствующем количестве среды для обеспечения жизнеспособности и для обеспечения подходящих концентраций вируса в средах, чтобы произошла трансдукция клетки-хозяина. Клетки предпочтительно инкубируют с вирусом в течение достаточного количества времени, чтобы предоставить возможность вирусу инфицировать клетки. Предпочтительно клетки инкубируют с вирусом в течение по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 5 ч или по меньшей мере 10 ч.

Как при доставке *in vivo* так и *in vitro*, может быть использована аликвота вирусных частиц, содержащая достаточное количество для инфицирования клеток-мишеней. При культивировании клетки-мишени концентрация вирусных частиц, как правило, составляет по меньшей мере 1 ИЕ/мкл, более предпочтительно, по меньшей мере 10 ИЕ/мкл, еще более предпочтительно, по меньшей мере 300 ИЕ/мкл, еще более предпочтительно, по меньшей мере 1×10^4 ИЕ/мкл, еще более предпочтительно, по меньшей мере 1×10^5 ИЕ/мкл, еще более предпочтительно, по меньшей мере 1×10^6 ИЕ/мкл или еще более предпочтительно, по меньшей мере 1×10^7 ИЕ/мкл.

После инфицирования вирусом *in vitro*, клетки-мишени могут быть введены (или повторно введены) в организм человека или другого животного. Указанные клетки могут быть введены в кожу, под кожу или в периферическую ток крови. Для того, чтобы избежать нежелательный иммунный ответ, клетки, которые вводят в организм животного, предпочтительно представляют собой клетки, полученные от этого животного. Также могут быть использованы клетки, полученные от донора, имеющего схожий иммунный фон. Другие клетки, которые также могут быть использованы, включают те, которые предназначены для предотвращения нежелательного иммунологического ответа.

Клетки-мишени могут быть проанализированы, например, в отношении интеграции, транскрипции и/или экспрессии последовательности или гена(ов), представляющих интерес, числа копий интегрированного гена и расположения интеграции. Такой анализ может быть выполнен в любой момент времени и может быть выполнен посредством любого способа, известного в данной области техники.

Субъектам, которым вводят вирус или инфицированные вирусом дендритные клетки, могут быть проведены анализы для определения местоположения инфицированных клеток, экспрессии полученного из вируса полинуклеотида или гена, представляющего интерес, стимуляции иммунного ответа, а также наблюдение за симптомами, связанными с заболеванием или расстройством посредством любых способов, известных в данной области техники.

Методы инфицирования клеток, описанные выше, не зависят от индивидуальных специфических характеристик клеток. В результате, они могут легко распространяться различным видам животных. В некоторых случаях вирусные частицы доставляют в организм в человека или дендритные клетки человека, а в других случаях их доставляют в организм животного, такого как мышь, лошадь, собака, кошка или мышь или птицы. Как обсуждалось в настоящем документе, геном вирусного вектора является псевдотипированным, чтобы предоставить специфичность широкого круга растений-хозяев, а также клеток-мишеней. Специалисту в данной области техники также будет известно о соответствующих внутренних промоторах и других элементах для достижения желаемой экспрессии последовательности, представляющей интерес, у определенных видов животных. Таким образом, специалист в данной области техники сможет модифицировать способ инфицирования дендритных клеток от любых видов.

Терапевтическая и профилактическая иммунизация

Дендритные клетки могут быть инфицированы лентивирусной векторной частицей, как описано в настоящем документе, для профилактики или лечения заболевания или расстройства, а именно тех, для которых будет полезна активация иммунного ответа у пациента. Многие из таких заболеваний хорошо известны. Например, заболевания или расстройства, которые поддаются лечению или профилактике с помощью способов по настоящему изобретению включают, без ограничения, раковые заболевания ауто-иммунные заболевания и инфекции, в том числе вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные инфекции. В одном способе заболевание лечат вирусными частицами (например, высокоманнозилированными вирусными частицами, содержащими белок Vprx) описанными в настоящем документе, для того, чтобы доставить последовательность, представляющую интерес в дендритные клетки, при этом экспрессия последовательности, представляющей интерес, производит антиген, специфический для заболевания и приводит к стимуляции антиген-специфических клеточных иммунных ответов и гуморальных иммунных ответов. Как правило, последовательность, представляющая интерес, кодирует антиген про-

тив которого желателен иммунный ответ, но обычно не экспрессируется в дендритной клетке. Антиген экспрессируется и представлен дендритной клеткой. Геном вирусного вектора может дополнительно кодировать фактор созревания ДК.

При типичном применении вирусные частицы доставляют в дендритные клетки последовательно, кодирующие антиген, против которого желателен иммунный ответ. Доставка может быть достигнута посредством контакта дендритных клеток с вирусом *in vitro*, после чего инфицированные дендритные клетки предоставляются пациенту. В других случаях доставка может быть достигнута путем доставки вируса субъекту для инфицирования дендритных клеток *in vivo*. Дендритные клетки затем стимулируют у пациента антиген-специфические Т-клетки или В-клетки, чтобы вызвать клеточные и гуморальные иммунные ответы на экспрессированный антиген. В таких способах пациента, который страдает от заболевания или расстройства, лечат путем создания иммунных клеток с желаемой специфичностью.

В некоторых из вирусов факторы созревания ДК, которые активируют и/или стимулируют созревание ДК, доставляются в сочетании с последовательностью, представляющей интерес. В альтернативных вариантах ДК активируются посредством дотавки факторов созревания ДК перед, одновременно или после доставки вируса. Факторы созревания ДК могут быть предоставлены отдельно от введения вируса.

Как описано в настоящем документе, один или больше факторов иммунной модуляции или созревания ДК могут быть закодированы с помощью одной или более последовательностей, которые содержатся в вирусном геноме и экспрессируются после того, как вирус инфицирует дендритную клетку.

Последовательности, кодирующие факторы иммунной модуляции, также могут быть предоставлены в отдельном векторе, который трансфецируют совместно с вирусным вектором, кодирующим один или более антигенов в упаковывающей клеточной линии.

Способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для адаптивной иммунотерапии у пациентов. Как описано выше, идентифицирован антиген против которого желателен иммунный ответ. Полинуклеотид, кодирующий заданный антиген получают и упаковывают в рекомбинантный вирус. Целевые дендритные клетки получают от пациента и трансдуцируют рекомбинантным вирусом, содержащим полинуклеотид, который кодирует желаемый антиген. Дендритные клетки затем переносят обратно в организм пациента.

Вирусные частицы могут быть введены посредством инъекции *in vivo*, где они инфицируют ДК и доставляют последовательность, представляющую интерес, кодирующую антиген. Количество вирусных частиц составляет, по меньшей мере 3×10^6 ИЕ и может составлять, по меньшей мере 1×10^7 ИЕ, по меньшей мере 3×10^7 ИЕ, по меньшей мере 1×10^8 ИЕ, по меньшей мере 3×10^8 ИЕ, по меньшей мере 1×10^9 ИЕ или по меньшей мере 3×10^9 ИЕ. Через определенные промежутки времени, ДК из лимфоидных органов реципиента могут быть использованы для измерения экспрессии, например, посредством наблюдения маркера экспрессии, такого как GFP или люцифераза. Способы наблюдения за нуклеиновыми кислотами и измерений активности обратной транскриптазы (ОТ) также могут быть использованы для анализа биораспределения вирусных частиц. Т-клетки от мононуклеаров периферической крови, лимфатических узлов, селезенки или злокачественной или целевой инфицированной патогенным микроорганизмом ткани реципиентов, пролеченных лентивирусной векторной частицей, могут быть измерены в отношении величины и длительности ответа на антигенную стимуляцию. Тканевые клетки, кроме ДК, такие как эпителиальные клетки и лимфоидные клетки могут быть проанализированы в отношении специфичности доставки генов *in vivo*.

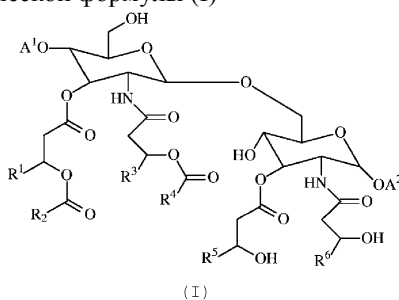
Вакцины часто включают адъювант. Лентивирусные векторные частицы, описанные в настоящем документе, можно также вводить вместе с адъювантом. Адъювант можно вводить одновременно с рекомбинантными вирусными частицами, перед введением рекомбинантных вирусных частиц или после введения рекомбинантных вирусных частиц. При введении с вирусными частицами, желательные адъюванты не вызывают существенного нарушения целостности вирусной частицы, например, нарушения вирусной мембраны, содержащей гликопротеины оболочки.

Различные адъюванты могут быть использованы в комбинации с вирусом, чтобы вызвать иммунный ответ на антиген, закодированный в геноме вирусного вектора. Предпочтительные адъюванты увеличивают внутренний ответ на антиген, не вызывая конформационные изменения в антигене, которые влияют на качественную форму ответа. Предпочтительные адъюванты включают квасцы, 3-де-О-ацилированный монофосфорилипид А (MPL) (см. GB 2220211). QS21 представляет собой тритерпеновый гликозид или сапонин, выделенный из коры дерева *Quillaja Saponaria Molina*, найденного в Южной Америке (см. публикацию Kensil et al., в Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (изд. Powell and Newman, Plenum Press, NY, 1995); патент США № 5057540). Другие адъюванты представляют собой эмульсии типа "масло в воде" (например, сквален или арахисовое масло), необязательно, в комбинации с иммунными стимуляторами, такими как, монофосфорилипид А (см. публикацию Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)). Другой адъювант представляет собой CpG (Bioworld Today, Nov. 15, 1998). Адъюванты могут быть введены как компонент терапевтической композиции с активным средством или могут быть введены отдельно, перед, одновременно с или после введения терапевтического средства.

Один класс адъювантов представляет собой соли алюминия (квасцы), такие как гидроксид алюми-

ния, фосфат алюминия, сульфат алюминия. Такие адъюванты могут быть использованы с другими специфическими иммуностимулирующими средствами, такими как MPL или 3-DMP, QS21, полимерными или мономерными аминокислотами, такими как полиглутаминовая кислота или полилизин или без них. Другой класс адъювантов представляет собой композиции эмульсий типа "масло в воде". Такие адъюванты могут быть использованы с другими специфическими иммуностимулирующими средствами или без них, например такими как мурамилпептиды (например N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нормурамил-L-аланин-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (MTP-PE), N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Ala-D-изоглю-L-Ala-дипальмитоксипропиламид (DTP-DPP) терамид.ТМ.) или другими компонентами клеточной стенки бактерий. Эмульсии типа "масло в воде" включают (а) MF59 (WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% твин 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий различные количества MTP-PE), составленный в субмикронные частицы с помощью микрофлуидизатора, такого как микрофлуидизатор модели 110Y (Microfluidics, Ньютон, Массачусетс), (b) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% твин 80, 5% блок-сополимера типа плюроник L121 и thr-MDP, либо распыленный микрофлуидизатором в субмикронную эмульсию, либо перемешанный для получения эмульсии с частицами большего размера, и (с) адъювантная система Ribi (RAS) (Ribi Immunochem, Гамильтон, Монтана), содержащая 2% сквалена, 0,2% твин 80 и один или более компонентов стенки бактериальной клетки из группы, состоящей из монофосфолипидов А (MPL), димиколата трегалозы (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detox™). Другой класс предпочтительных адъювантов представляет собой сапониновые адъюванты, такие как Stimulon.ТМ. (QS21, Aquila, Бустер, Массачусетс) или полученные из них частицы, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы) и ISCOMATRIX. Другие адъюванты включают полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA). Другие адъюванты включают цитокины, такие как интерлейкины, такие как (IL-1, IL-2 и IL-12), колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF), фактор некроза опухолей (TNF).

Еще один адъювант, который может быть использован с композициями, описанными в данном документе, определен с помощью химической формулы (I)



где фрагменты A1 и A2 независимо выбраны из группы, включающей водород, фосфат и фосфатные соли. Натрий и калий являются иллюстративными противоионами для фосфатных солей. Фрагменты R¹, R², R³, R⁴, R⁵ и R⁶ независимо выбраны из группы, включающей гидрокарбил, имеющий от 3 до 23 атомов углерода, представленный C₃-C₂₃. Для большей ясности будет объяснено, что когда фрагмент "независимо выбран из" указанной группы, включающей множество представителей, следует понимать, что представитель, выбранный как первый фрагмент, ни в коей мере не влияет или не ограничивает выбор представителя, выбранного в качестве второго фрагмента. Атомы углерода, к которым присоединяются R¹, R³, R⁵ и R⁶ асимметричны и, таким образом, могут существовать в стереохимической конфигурации R или S. В одном варианте реализации все эти атомы углерода находятся в R стереохимической конфигурации, в то время как в другом варианте реализации все эти атомы углерода находятся в S стереохимической конфигурации.

Термин "гидрокарбил" относится к химическому фрагменту, образованному только атомами водорода и углерода, при этом расположение атомов углерода может представлять собой прямую или разветвленную цепь, быть нециклическим или циклическим, и связывание между соседними атомами углерода может представлять собой только одинарные связи, т.е. для того, чтобы предоставить насыщенный гидрокарбил, или может представлять собой двойные или тройные связи, присутствующие между любыми двумя соседними атомами углерода, то есть, чтобы предоставить ненасыщенный гидрокарбил, а количество атомов углерода в углеводородной группе составляет от 3 до 24 атомов углерода. Гидрокарбил может представлять собой алкил, при этом представители алкилов с прямой цепью включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п., включая ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил, пентадецил, гексадецил, гептадецил, октадецил и т.п.; в то время как алкилы с разветвленной цепью включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Типичные насыщенные циклические гидрокарбилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; в то время как ненасыщенные циклические гидрокарбилы включают циклопентенил и циклогексенил и т.п. Ненасыщенные гидрокарбилы содержат, по меньшей мере одну двойную или тройную связь между соседни-

ми атомами углерода (называются "алкенил" или "алкинил", соответственно, если гидрокарбил не является циклическим, и циклоалкенил и циклоалкинил, соответственно, если гидрокарбил является, по меньшей мере, частично циклическим). Репрезентативные алкенилы с прямой и разветвленной цепью включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.; в то время как репрезентативные алкинилы с прямой и разветвленной цепью включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

Адьювант формулы (I) может быть получен синтетическими способами, известными в данной области техники, например, при помощи способов синтеза, раскрытых в международной публикации РСТ WO 2009/035528, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, а также в публикациях, указанных в заявке WO 2009/035528, при этом каждая из указанных публикаций также включена в настоящий документ посредством ссылки. Некоторые из адьювантов также могут быть получены коммерческим путем. Предпочтительным адьювантом является продукт No. 699800 указанный в каталоге Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, см. E1 в комбинации с E10, ниже.

В различных вариантах реализации настоящего

раскрытия, адьювант имеет химическую структуру формулы (I), но фрагменты A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 и R6 выбраны из подмножеств вариантов, представленных для этих фрагментов ранее, где эти подмножества определены ниже посредством E1, E2 и т.д.

E1: A₁ представляет собой фосфат или фосфатную соль и A₂ представляет собой водород.

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

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

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

E5: R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой C₉-C₁₃-алкил и R² и R⁴ представляют собой C₁₁-C₁₅-гидрокарбил.

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

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

E8: R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой C₁₁-C₂₀-алкил и R² и R⁴ представляют собой C₁₂-C₂₀-гидрокарбил.

E9: R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой C₁₁ алкил и R² и R⁴ представляют собой C₁₃ гидрокарбил.

E10: R¹, R³, R⁵ и R⁶ представляют собой ундецил и R² и R⁴ представляют собой тридецил.

В некоторых вариантах реализации каждый из E2-E10 объединен с вариантом реализации E1, и/или гидрокарбильные группы E2-E9 представляют собой алкильные группы, предпочтительно алкильные группы с прямой цепью.

Адьювант формулы (I) может быть введен в состав

фармацевтической композиции необязательно с со-адьювантом, каждый описан ниже. В этой связи делается ссылка на патентную публикацию США № 2008/0131466, в которой представлены композиции, например, водная композиция (AF) и стабильные эмульсионные композиции (SE) для адьюванта GLA, при этом указанные композиции могут быть использованы для любого из адьювантов формулы (I).

Адьювант можно вводить с вирусом по настоящему раскрытию в виде одной композиции или можно вводить перед, одновременно с или после введения рекомбинантного вируса по настоящему раскрытию. Иммуноген и адьювант могут быть упакованы и поставяться в одном флаконе, или могут быть упакованы в отдельные флаконы, которые смешивают перед применением. Иммуноген и адьювант обычно упаковывают с этикеткой, указывающей, предназначенное терапевтическое применение. Если иммуноген и адьювант упакованы отдельно, упаковка обычно содержит инструкции по смешиванию перед использованием. Выбор адьюванта и/или носителя зависит от стабильности вакцины, содержащей адьювант, пути введения, схемы дозирования, эффективности адьюванта для видов, подлежащих вакцинации, и у людей фармацевтически приемлемым адьювантом является тот, который был одобрен или является одобряемым для введения человеку соответствующими регулирующими органами. Например, полный адьювант Фрейнда не подходит для введения человеку. Предпочтительными являются квасцы, MPL и QS21. Необязательно, два или более различных адьювантов могут быть использованы одновременно, например, квасцы с MPL, квасцы с QS21, MPL с QS21 и квасцы, QS21 и MPL вместе. Также может использоваться неполный адьювант Фрейнда (Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1998)), необязательно в комбинации с любым из квасцов, QS21 и MPL и всеми их комбинациями.

Фармацевтические композиции и наборы

Также в настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции и наборы, содержащие вирус, представленный в настоящем документе, и один или несколько компонентов. Фармацевтические композиции могут включать частицы вирусного вектора, как представлено в настоящем документе,

и фармацевтический носитель. Наборы могут включать фармацевтические композиции и/или их комбинации, представленные в настоящем документе, и один или несколько компонентов, таких как инструкции по применению, устройство для введения соединения субъекту и устройство для введения соединения субъекту.

В настоящем документе представлены фармацевтические композиции, содержащие вирусные частицы, как представлено здесь, и подходящий фармацевтический носитель. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут быть в различных формах, например, в твердой, жидкой, в форме порошка, водной или лиофилизированной форме. Примеры подходящих фармацевтических носителей известны в данной области техники. Такие носители и/или добавки могут быть введены в состав обычными способами и могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Стабилизирующие средства, такие как липиды, ингибиторы нуклеазы, полимеры и хелатирующие средства могут защищать композицию от разрушения в организме.

Частицы вирусного вектора, представленные в настоящем документе, могут быть упакованы в виде наборов. Наборы могут необязательно включать один или несколько компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты и компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы для применения способов на практике. Типичные наборы могут включать вирусы, представленные в настоящем документе и, необязательно, могут включать инструкции по применению, устройство для обнаружения вируса у субъекта, устройство для введения вируса субъекту и устройство для введения соединения субъекту.

В настоящем документе также рассматриваются наборы, которые содержат полинуклеотиды, кодирующие ген, представляющий интерес (обычно антиген). Набор может включать в себя по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую компоненты упаковки вируса и вектор, кодирующий вариант гликопротеина E2 вируса Синдбис. Некоторые наборы будут содержать по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую компоненты упаковки вируса, вектор, кодирующий вариант гликопротеина E2 вируса Синдбис и вектор, кодирующий по меньшей мере один фактор созревания ДК.

В настоящем документе также рассматриваются наборы, которые содержат вирусный вектор, кодирующий последовательность, представляющую интерес (обычно антиген) и, необязательно, полинуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания ДК. В некоторых наборах, набор содержит по меньшей мере одну плазмиду, кодирующую компоненты упаковки вируса и вектор, кодирующий вариант гликопротеина E2 вируса Синдбис.

Набор также может содержать инструкции.

Инструкции обычно включают ясное выражение, описывающее вирус и, необязательно, другие компоненты, входящие в комплект, и способы введения, в том числе способы определения свойственного субъекту состояния, соответствующего количества дозировки и соответствующего способа введения для введения вируса. Инструкции могут также включать указания для наблюдения субъекта в течение длительности периода лечения.

Представленные в настоящем документе наборы также могут включать устройство для введения вируса субъекту. Любое из множества устройств, известных в данной области техники для введения лекарственных средств или вакцин может быть включено в наборы, представленные в настоящем документе. Примеры устройств включают в себя, но не ограничиваются перечисленным, подкожную иглу, внутривенную иглу, катетер, безыгльное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор для жидкостей, такой как пипетка. Как правило, устройство для введения вируса из набора будет совместимым с вирусом из набора; например, безыгльное инъекционное устройство, такое как устройство введения инъекции под высоким давлением, может быть включено в наборы вместе с вирусами, которые не повреждаются при инъекции под высоким давлением, но, как правило, не включается в наборы вместе с вирусами, которые повреждаются при инъекции под высоким давлением.

Представленные в настоящем документе наборы также могут включать устройство для введения субъекту соединения, такого как активатор или стимулятор ДК. Любое из множества устройств, известных в данной области техники для введения лекарственных средств субъекту, может быть включено в наборы, представленные в настоящем документе. Примеры устройств включают подкожную иглу, внутривенную иглу, катетер, безыгльное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор для жидкостей, такой как пипетка. Как правило, устройство для введения соединения из набора будет совместимым с желаемым способом введения соединения.

Иллюстративные варианты реализации

Способы создания псевдотипированных лентивирусных векторных частиц

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы включает:

(а) культивирование в питательной среде, содержащей ингибитор маннозидазы I, упаковывающей вирус клетки, включающей

геном лентивирусного вектора, содержащий полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген, полинуклеотид, кодирующий гликопротеин альфа-вируса, который преимущественно связывает

дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, и полинуклеотид, кодирующий ингибитор SAMHD1; и
(b) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

В конкретных аспектах ингибитор маннозидазы представляет собой кифунензин или DMNJ.

В конкретных аспектах гликопротеин альфа-вируса представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис.

В конкретных аспектах ингибитор SAMHD1 представляет собой белок Vpx, например белок Vpx SIVmac, белок SIVsm, белок SIVrcm или белок Vpx HIV-2. В конкретных аспектах ингибитор SAMHD1 представляет собой антитело или его фрагмент. В конкретных аспектах ингибитор SAMHD1 представляет собой белок Vpr с SAMHD1-ингибирующей способностью, например белок Vpr SIVdeb или белок Vpr SIVmus.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы включает:

(a) культивирование в питательной среде, содержащей кифунензин, упаковывающей вирус клетки, включающей:

- (1) геном лентивирусного вектора, содержащий полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген,
- (2) полинуклеотид, кодирующий гликопротеин E2 вируса Синдбис, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, и
- (3) полинуклеотид, кодирующий белок Vpx или белок Vpr, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1; и

(b) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

В конкретных аспектах гликопротеин E2 на 90% идентичен SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1]. В некоторых аспектах (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком, и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис. В некоторых аспектах гликопротеин E2 представляет собой SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].

В конкретных аспектах белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере на 80% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44).

В конкретных аспектах белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая является, по меньшей мере на 80% идентичной SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47). В конкретных аспектах белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере на 90% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47).

В конкретных аспектах белок Vpr псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49). В конкретных аспектах белок Vpr псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).

В конкретных аспектах антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или вирус-специфический антиген. В некоторых аспектах опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE, например, MAGE-A3 и MAGE-A1, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100, gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, например, TRP2, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного gas, реаранжировки bcr/abl, Her2/neu, мутированного p53, p53 дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена, онкобелков Т-антигена вируса клеток Меркеля и альфа-фетопротеина. В некоторых аспектах вирус-специфический антиген представляет собой антиген HIV, антиген SIV, антиген аденовирусов, антиген энтеровирусов, антиген коронавирусов, антиген калицивирусов, антиген вируса чумы плотоядных, антиген вируса Эбола, антиген флавивирусов, антиген вирусов гепатита, антиген вирусов герпеса, антиген вирусов инфекционного перитонита, антиген вирусов гриппа, антиген вирусов лейкемии, антиген вируса Марбург, антиген ортомиксовирусов, антиген вирусов папилломы, антиген вирусов парагриппа, антиген парамиксовирусов, антиген парвовирусов, антиген пестивирусов, антиген пикорнавирусов, антиген вируса полиомиелита, антиген вируса оспы, антиген вируса бешенства, антиген реовирусов, антиген ретровирусов или антиген

ротавирусов.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген. В конкретных аспектах первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который между двумя антигенами содержит саморасщепляющийся пептид A2. В некоторых аспектах саморасщепляющийся пептид A2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57. В некоторых аспектах первый антиген представляет собой NY-ESO-1, а второй антиген представляет собой MAGE-A3.

В конкретных аспектах кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,1 до около 10 мкг/мл. В некоторых аспектах кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,25 до около 2 мкг/мл. В некоторых аспектах кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,01 мкг/мл до около 1 мг/мл.

В конкретных аспектах упаковывающая вирус клетка дополнительно содержит:

(i) полинуклеотид, который содержит гены gag и pol; и

(ii) полинуклеотид, который кодирует белок rev. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий белок Vpx, находится на той же или другой плазмиде, что и полинуклеотид, кодирующий белок rev, или полинуклеотид, содержащий гены gag и pol. В некоторых аспектах гены gag и pol оптимизированы для кодона человека и содержат неоптимизированное окно около позиции 1228 - 1509 SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах полинуклеотид, содержащий гены gag и pol не имеет функционального элемента, чувствительного к rev (RRE). В некоторых аспектах ген pol кодирует неактивный фермент интегразу. В некоторых аспектах фермент интегразы имеет мутацию D64V.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора получен из HIV-1.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является способным к интеграции.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является интеграционно-дефектным или интеграционно-дефицитным. Например, лентивирусный вектор может интегрировать с частотой, по меньшей мере 10-кратно (например, по меньшей мере 20-кратно, по меньшей мере 30-кратно, по меньшей мере 40-кратно, по меньшей мере 50-кратно, по меньшей мере 60-кратно, по меньшей мере 70-кратно, по меньшей мере 80-кратно, по меньшей мере 90-кратно, по меньшей мере 100-кратно, по меньшей мере 150-кратно, по меньшей мере 200-кратно, по меньшей мере 250-кратно, по меньшей мере 300-кратно, по меньшей мере 350-кратно, по меньшей мере 400-кратно, по меньшей мере 450-кратно, по меньшей мере 500-кратно, по меньшей мере 550-кратно, по меньшей мере 600-кратно, по меньшей мере 650-кратно, по меньшей мере 700-кратно, по меньшей мере 750-кратно, по меньшей мере 800-кратно, по меньшей мере 850-кратно, по меньшей мере 900-кратно, по меньшей мере 950-кратно или по меньшей мере 1000-кратно) менее эффективной при интеграции, чем интеграционно-компетентный вирусный вектор. В иллюстративных вариантах реализации лентивирусный вектор может быть, по меньшей мере, от около 20-кратно до около 100-кратно менее эффективным при интеграции.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора имеет инактивированный 3' длинный концевой повтор (LTR) или самоинактивирующийся 3' длинный концевой повтор (LTR). В некоторых аспектах геном лентивирусного вектора содержит элемент U3 у которого отсутствует по меньшей мере одно из следующих: энхансерная последовательность, TATA-бокс, сайт Sp1, сайт NK-каппа В или полипуриновый тракт (PPT). В некоторых аспектах ген pol кодирует неактивный фермент интегразу, а геном лентивирусного вектора не имеет функционального полипуринового тракта (PPT).

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21 [SIN вектор], 22 [703 вектор] или 23 [704 вектор].

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания/стимуляции дендритных клеток. В некоторых аспектах фактор созревания/стимуляции дендритных клеток выбран из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNFD, B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

В конкретных аспектах нуклеотидная последовательность, кодирующая антиген, функционально связана с промотором, выбранным из группы, состоящей из промотора убиквитина-С человека (UbiC), немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV) и промотора, чувствительного к тетрациклину. В некоторых аспектах промотор представляет собой интрон-дефицитный промотор. В некоторых аспектах указанный интрон-дефицитный промотор представляет собой UbiC.

В конкретных аспектах представлена лентивирусная векторная частица, полученная по способу из параграфа [0206], [0210] или [0218].

В конкретных аспектах представлена лентивирусная векторная частица, полученная по способу из параграфа [0216].

Композиции, содержащие псевдотипированные лентивирусные векторные частицы

В некоторых или любом из вариантов реализации настоящего раскрытия, представлена композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, которые содержат (а) белок Vpr или белок Vprg, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1, (b) экзогенный полинуклеотид, кодирующий антиген, и (с) множество гликопротеинов оболочки, которые предпочтительно связывают клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом композиция является более высокоманнозильированной по сравнению с контрольной композицией тех же псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы. Например, такая высокоманнозильированная композиция характеризуется тем, что содержит гликопротеины оболочки, которые являются более чувствительными к ЭндоН по сравнению с гликопротеинами оболочки контрольной композиции, полученной при отсутствии ингибитора маннозидазы. В другом примере такая высокоманнозильированная композиция характеризуется тем, что содержит гликопротеины оболочки, демонстрирующие повышенное количество чувствительного к ЭндоН гликана по сравнению с гликопротеинами оболочки контрольной композиции, полученной при отсутствии ингибитора маннозидазы. Следует понимать, что контрольная композиция будет содержать приблизительно такое же количество псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, содержащих гликопротеины оболочки, имеющие ту же аминокислотную последовательность(и).

Также следует понимать, что в то время как раскрытие прежде всего сфокусировано на гликопротеине E2 альфавируса, который отвечает за распознавание и связывание с дендритными клетками, и его высокоманнозильированной версии, оболочка альфавируса также содержит гликопротеины E1, которые чувствительны к высокому маннозильированию. Таким образом, ссылки на гликопротеины оболочки и высокоманнозильированные гликопротеины оболочки включают ссылки на высокоманнозильированные гликопротеины E2 и/или E1 альфавируса, конкретно высокоманнозильированные гликопротеины E2 и/или E1 вируса Синдбис. Высокое маннозильирование других типов вирусных оболочек, в частности ретровирусных оболочек, также улучшает распознавание дендритных клеток.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия, представлена композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, которые содержат (а) белок Vpr или белок Vprg, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1, (b) экзогенный полинуклеотид, кодирующий антиген, и (с) множество гликопротеинов E2 вируса Синдбис, которые предпочтительно связывают клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом композиция является более высокоманнозильированной по сравнению с контрольной композицией псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы. Значительное количество гликопротеинов E2 в таких композициях является более высокоманнозильированными, например, более чувствительным к ЭндоН, по сравнению с гликопротеином E2 в контрольных композициях, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы.

ЭндоН является специализированной эндогликозидазой которая будет расщеплять только высокоманнозное N-связанное гликозильирование (см. фиг. 3А), например, гликаны Man5-9; гликаны Man3-4 являются устойчивыми к ЭндоН. В отличие от этого PNGase F будет расщеплять все виды гликозильирования, в том числе низкоманнозные гликаны <Man5. При получении вирусных частиц в присутствии ингибитора маннозидазы I, такого как кифунензин, гликопротеины в вирусной оболочке будут содержать более высокоманнозные гликаны, чувствительные к расщеплению ЭндоН (т.е., будут более "ЭндоН-чувствительными"). Один из способов обнаружения присутствия высокоманнозных гликанов в композиции вирусных частиц представляет собой определение молекулярной массы гликопротеинов оболочки с помощью электрофореза посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН ПААГЭ) после обработки ЭндоН. Этот анализ изменения "подвижности в геле" проиллюстрирован в Примере 3. Образцы вирусных частиц и контрольные композиции тех же вирусных частиц, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы, могут подвергаться электрофорезу в 10% ДСН ПААГЭ геле и иммуноблоттингу с антителом против гликопротеинов Синдбис. Вирусная оболочка, полученная в присутствии ингибиторов маннозидазы I, является более чувствительной к ЭндоН и, следовательно, ее подвижность в геле более быстрая (более дальние расстояния) после обработки ЭндоН по сравнению с контрольным вирусом. Таким образом, наличие высокоманнозного гликопротеина может быть измерена с помощью анализа изменения подвижности в геле после обработки ЭндоН.

Контрольный вирус может быть частично чувствительным к обработке ЭндоН в связи с наличием сайтов гликозильирования в гликопротеинах Синдбис, которые обычно являются высокоманнозными, вследствие того, что они являются внутренними и не подвергается воздействию маннозидазы I в процессе производства. Таким образом при движении на 10% ДСН ПААГЭ, контрольный вирус может проявлять некоторые изменения молекулярной массы после обработки ЭндоН, в связи с тем, что ЭндоН расщепляет такие внутренние высокоманнозные гликаны. Это изменение, тем не менее, может составлять только около 35% от изменения, которое наблюдается при обработке контрольного вируса PNGазой F, которая расщепляет все гликаны.

Таким образом, в конкретных аспектах, количество ЭндоН-чувствительного гликана детектируют путем определения молекулярной массы гликопротеинов вируса Синдбис посредством электрофореза в

полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН ПААГЭ) после обработки ЭндоН. Повышенное количество ЭндоН-чувствительного гликана в композиции, которое указывает, что композиция вирусных частиц является высокоманнозилированной, детектируется тогда, когда результаты обработки ЭндоН на полосе, соответствующей гликопротеинам оболочки (Е2 и/или Е1) на 10% ДСН ПААГЭ геле изменяются на более низкую молекулярную массу по сравнению с контрольными гликопротеинами оболочки, как это определено путем визуального контроля.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации молекулярная масса указанных гликопротеинов оболочки после обработки ЭндоН изменяется полностью и, по существу является такой же, как молекулярная масса указанных гликопротеинов оболочки после обработки PNGазой F. В других иллюстративных вариантах реализации молекулярная масса указанных гликопротеинов оболочки после обработки ЭндоН изменяется приблизительно на 90% или более от диапазона между (а) гликопротеинами оболочки, не обработанными эндогликозидазой, и (b) гликопротеинами оболочки, обработанными PNGазой F. В других иллюстративных вариантах реализации молекулярная масса указанных гликопротеинов оболочки после обработки ЭндоН изменяется приблизительно на 90% или более от диапазона между (а) гликопротеинами оболочки, не обработанными эндогликозидазой, и (b) гликопротеинами оболочки, обработанными PNGазой F. В еще других иллюстративных вариантах реализации молекулярная масса указанных гликопротеинов оболочки изменяется на около 40% или более, или предпочтительно около 45% или более, или около 50% или более, или около 55% или более, или около 60% или более, или около 65% или более, или около 70% или более, или около 75% или более, или около 80% или более, или около 85% или более от диапазона между (а) гликопротеинами оболочки не обработанными эндогликозидазой, и (b) гликопротеинами оболочки обработанными PNGазой F. Как отмечалось выше, ссылка на гликопротеины оболочки конкретно включает ссылку на гликопротеины Е2 и/или Е1 Синдбис. В конкретных аспектах по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% гликопротеинов оболочки в указанной композиции, например, гликопротеинов Е2 и/или Е1 Синдбис в указанной композиции, имеют повышенное количество чувствительного к ЭндоН гликана по сравнению с контрольными гликопротеинами оболочки, имеющими ту же аминокислотную последовательность(и) в контрольной композиции псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия композиция, содержит псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, содержащие (а) ингибитор SAMHD1, (b) лентивирусный ген, который содержит последовательность, представляющую интерес, и (с) гликопротеин оболочки, который преимущественно связывает клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом, по меньшей мере 80% N-связанных гликанов в указанной композиции содержат структуру Man₉.

В конкретных аспектах ингибитор SAMHD1 представляет собой белок Vpx, например белок Vpx SIVmac, белок Vpx SIVsm, белок Vpx SIVrcm или белок Vpx HIV-2. В конкретных аспектах ингибитор SAMHD1 представляет собой анти тело или его фрагмент. В конкретных аспектах ингибитор SAMHD1 представляет собой белок Vpr с SAMHD1-ингибирующей способностью, например, белок Vpr SIVdeb или белок Vpr SIVmus.

В конкретных аспектах последовательность, представляющая интерес, кодирует белок или молекулу нуклеиновой кислоты, например мРНК, микроРНК, само-комплементарную двухцепочечную РНК, в которой комплементарная область имеет в длину более чем около 20 рибонуклеотидов, или РНК, комплементарную информационной РНК, при этом связывание указанной комплементарной (антисмысловой) РНК с информационной РНК блокирует ее способность быть транслированной в белок. В некоторых случаях последовательность, представляющая интерес кодирует антиген, против которого желателен иммунный ответ. В конкретных аспектах последовательность, представляющая интерес, кодирует опухолевый антиген или антигены инфекционных заболеваний (например, от таких агентов, как HIV, HSV, HCV, HPV, малярия или туберкулез). В конкретных аспектах в один вектор включено множество последовательностей, представляющих интерес.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия композиция содержит псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, содержащие (а) белок Vpx, (b) экзогенный полинуклеотид, кодирующий антиген, и (с) гликопротеин оболочки, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом, по меньшей мере 80% N-связанных гликанов в указанной композиции содержат структуру Man₉.

В конкретных аспектах белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80% идентичной белку Vpx SIVmac (SEQ ID NO: 44).

В конкретных аспектах белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая является, по меньшей мере на 80% идентичной SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47). В конкретных аспектах белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47).

В конкретных аспектах белок Vpr псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49). В конкретных аспектах белок Vpr псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).

В конкретных аспектах псевдотипированная лентивирусная векторная частица инфицирует дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, с эффективностью трансдукции *in vitro*, составляющей по меньшей мере 1%, или по меньшей мере 5%, или по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 20%.

В конкретных аспектах гликопротеин представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис. В некоторых аспектах гликопротеин E2 обладает по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1]. В некоторых аспектах (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком, и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис.

В конкретных аспектах антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или вирус-специфический антиген. В некоторых аспектах опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE, MAGE-A3 и MAGE-A1, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100, gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, например, TRP2, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного *gas*, реаранжировки *bcr/abl*, *Her2/neu*, мутированного p53, p53 дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена, онкобелков Т-антигена вируса клеток Меркеля и альфа-фетопропротеина. В некоторых аспектах вирус-специфический антиген представляет собой антиген HIV, антиген SIV, антиген аденовирусов, антиген энтеровирусов, антиген коронавируса, антиген калицивирусов, антиген вируса чумы плотоядных, антиген вируса Эбола, антиген флавивирусов, антиген вирусов гепатита, антиген вирусов герпеса, антиген вирусов инфекционного перитонита, антиген вирусов гриппа, антиген вирусов лейкемии, антиген вируса Марбург, антиген ортомиксовирусов, антиген вирусов папилломы, антиген вирусов парагриппа, антиген парамиксовирусов, антиген парвовирусов, антиген пестивирусов, антиген пикорнавирусов, антиген вируса полиомиелита, антиген вируса оспы, антиген вируса бешенства, антиген реовирусов, антиген ретровирусов или антиген ротавирусов.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген. В конкретных аспектах первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который между двумя антигенами содержит саморасщепляющийся пептид A2. В некоторых аспектах саморасщепляющийся пептид A2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57. В некоторых аспектах первый антиген представляет собой MAGE-A3, а второй антиген представляет собой NY-ESO-1.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора получен из HIV-1.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является способным к интеграции.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является интеграционно-дефицитным или интеграционно-дефектным.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора имеет инактивированный 3' длинный концевой повтор (LTR) или самоинактивирующийся 3' длинный концевой повтор (LTR). В некоторых аспектах геном лентивирусного вектора содержит элемент U3 у которого отсутствует по меньшей мере одно из следующих: энхансерная последовательность, TATA-бокс, сайт Sp1, сайт NK-каппа В или полипуриновый тракт (PPT).

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21 [SIN вектор], 22 [703 вектор] или 23 [704 вектор].

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания/стимуляции дендритных клеток. В некоторых аспектах фактор созревания/стимуляции дендритных клеток выбран из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

В конкретных аспектах нуклеотидная последовательность, кодирующая антиген, функционально связана с промотором, выбранным из группы, состоящей из промотора убиквитина-С человека (UbiC),

немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV) и промотора, чувствительного к тетрациклину. В некоторых аспектах промотор модифицируют, чтобы он был интрон-дефицитным.

В некоторых аспектах псевдотипированные лентивирусные векторные частицы содержат белок Rev.

В конкретных аспектах псевдотипированные лентивирусные векторные частицы имеют ИЕ, по меньшей мере 10^5 /мл.

В конкретных аспектах композиция дополнительно содержит иммуностимулирующее средство.

В конкретных аспектах композиция дополнительно содержит адъювант. Например, как отмечено выше, адъюванты включают квасцы или 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (MPL). Классы адъювантов, раскрытые в настоящем документе, включают (a) соли алюминия, (b) эмульсионные композиции по типу масло-в-воде, необязательно с другими специфическими иммуностимулирующими средствами, такими как мурамиловые пептиды или другие компоненты стенки бактериальной клетки или без них, (c) сапониновые адъюванты, в том числе ISCOM (иммуностимулирующие комплексы) и ISCOMA-TRIX; (D) полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (IFA); (e) цитокины и (f) адъюванты формулы (I). В формуле (I) предпочтительным адъювантом является продукт No. 699800, указанный в каталоге Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, см. E1 в комбинации с E10, при этом (i) A_1 представляет собой фосфат или фосфатную соль и A_2 представляет собой водород, и (ii) R^1 , R^3 , R^5 и R^6 представляют собой ундецил, а R^2 и R^4 представляют собой тридецил. В конкретных аспектах гликопротеины оболочки также связывают клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1.

В конкретных аспектах псевдотипированные лентивирусные векторные частицы также более эффективно трансдуцируют клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1 по сравнению с клетками, не экспрессирующими мышинный SIGNR1.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия, вышеупомянутые псевдотипированные лентивирусные векторные частицы предназначены для применения в способе лечения или предупреждения заболевания или расстройства у пациента. В конкретных аспектах заболевание или расстройство представляет собой рак, аутоиммунное заболевание или инфекцию, например вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

Вирусные векторные частицы, содержащие белок Vpx

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлена псевдотипированная лентивирусная векторная частица способная к нацеливанию на экспрессирующую клетку, которая содержит:

- (a) не нативный гликопротеин оболочки;
- (b) геном лентивирусного вектора, содержащий экзогенный полинуклеотид, представляющий интерес; и
- (c) белок Vpx или другой ингибитор SAMHD1.

В некоторых аспектах псевдотипированная лентивирусная векторная частица дополнительно содержит белок Rev.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлена упаковывающая система лентивирусного вектора для получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая содержит:

- (i) первый полинуклеотид, кодирующий не нативный гликопротеин оболочки;
- (ii) второй полинуклеотид, который содержит гены gag и pol;
- (iii) третий полинуклеотид, который кодирует белок rev;
- (iv) четвертый полинуклеотид, кодирующий белок Vpx или другой ингибитор SAMHD1; и
- (v) геном лентивирусного вектора, содержащий экзогенный полинуклеотид, представляющий интерес;

при этом два или более полинуклеотидов находятся на той же плазмиде или на различных плаزمиде. В конкретных аспектах полинуклеотид по п. (iv) находится на той же плазмиде, что и любой один или более из полинуклеотидов по п. (i), (ii), (iii) или (v).

В конкретных аспектах упаковывающая клетка выбрана из группы, состоящей из клеток 293, 293T, HeLa, D17, MDCK, BHK и Cf2Th.

В конкретных аспектах белок Vpx псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 44 (SIVmac), необязательно белку Vpx SIVmac (SEQ ID NO: 44), белку Vpx SIVsm (SEQ ID NO: 45), белку Vpx SIVrcm (SEQ ID NO: 46) или белку VPX HIV-2 (SEQ ID NO: 47). В конкретных аспектах белок Vpx псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 44 (SIVmac), необязательно белку Vpx SIVmac (SEQ ID NO: 44), белку Vpx SIVsm (SEQ ID NO: 45), белку Vpx SIVrcm (SEQ ID NO: 46) или белку VPX HIV-2 (SEQ ID NO: 47).

В конкретных аспектах белок Vpr псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упа-

ковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49). В конкретных аспектах белок Vpr псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из предыдущих вариантов реализации содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы лентивирусного вектора по любому из вышеупомянутых вариантов реализации получен из HIV-1 или MLV.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является способным к интеграции.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является неинтегрирующим.

В конкретных аспектах не нативный гликопротеин оболочки псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации выбран из группы, состоящей из гликопротеина альфавируса, включая гликопротеин E2 Синдбис, гликопротеин E2 VEE, гликопротеина рабдовируса или везикуловируса, включая гликопротеин VSV-G, гликопротеина ареновируса, гликопротеина коронавируса, гликопротеина парамиксовируса, гликопротеина флавивируса, гликопротеина ортомиксовируса, и гликопротеина бакуловируса, предпочтительно альфавируса, такого как вирус Синдбис.

В конкретных аспектах не нативный гликопротеин оболочки псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 30 [SINVar1].

В конкретных аспектах не нативный гликопротеин оболочки псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации преимущественно связывает клетки, экспрессирующие SAMHD1. В некоторых аспектах клетка, экспрессирующая SAMHD1 представляет собой миелоидную клетку, необязательно, дендритную клетку, моноцит или макрофаг.

В конкретных аспектах не нативный гликопротеин оболочки псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

В конкретных аспектах полинуклеотид, представляющий интерес, кодирует (i) антиген, (ii) терапевтический полипептид или (iii) ингибирующий олигонуклеотид. В некоторых аспектах полинуклеотид, представляющий интерес, кодирует мРНК.

В конкретных аспектах полинуклеотид, представляющий интерес, кодирует вирусный, бактериальный, грибковый, протозойный или раковый антиген.

В конкретных аспектах гликопротеины оболочки также связывают клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1.

В конкретных аспектах псевдотипированные лентивирусные векторные частицы также более эффективно трансдуцируют клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1 по сравнению с клетками, не экспрессирующими мышинный SIGNR1.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлен способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы по любому из предыдущих вариантов реализации, включающий культивирование упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации в питательной среде. В некоторых аспектах питательная среда содержит ингибитор маннозидазы I, необязательно кифуназин или DMNJ.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлена композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы по любому из предыдущих вариантов реализации, при этом векторные частицы являются высокоманнозилированными.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлена композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы по любому из предыдущих вариантов реализации, при этом по меньшей мере 80% N-связанных гликанов в указанной композиции содержат структуру Man₉.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлен способ доставки генома лентивирусного вектора в клетку, экспрессирующую SAMHD1, *in vitro* или *in vivo*, включающий контакт клетки с векторной частицей по любому из вышеупомянутых вариантов реализации. В некоторых аспектах клетка, экспрессирующая SAMHD1, представляет собой дендритную клетку, моноцит или макрофаг.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлен способ, вызывающий иммунный ответ или способ иммунизации индивидуума, включающий введение векторной частицы по лю-

бому из вышеупомянутых вариантов реализации индивидууму, предпочтительно векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия, вышеупомянутые псевдотипированные лентивирусные векторные частицы предназначены для применения в способе лечения или предупреждения заболевания или расстройства у пациента. В конкретных аспектах заболевание или расстройство представляет собой рак, аутоиммунное заболевание или инфекцию, например, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

Способы создания вирусных векторных частиц с высокоманнозилированными гликопротеинами оболочки

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлен способ получения вирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом способ включает

культивирование упаковывающей вирус клетки, содержащей компоненты вирусной частицы, в питательной среде, при этом указанные компоненты содержат полинуклеотид, кодирующий гликопротеин оболочки, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, и где питательная среда содержит кифуензин в концентрации от около 0,01 мкг/мл до около 1 мг/мл, предпочтительно, от около 0,1 до около 10 мкг/мл.

В конкретных аспектах кифуензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,25 до около 2 мкг/мл.

В конкретных аспектах кифуензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,1 до около 10 мкг/мл или около 0,25 до около 2 мкг/мл или около 0,5 до около 5 мкг/мл.

В конкретных аспектах компоненты вирусной частицы содержат геном лентивирусного вектора.

В конкретных аспектах вирусная частица инфицирует клетки, экспрессирующие DC-SIGN, с эффективностью трансдукции, по меньшей мере 5-кратно выше в сравнении с вирусной частицей, полученной в питательной среде без кифуензина.

В конкретных аспектах упаковывающая вирус клетка содержит:

- (i) первый полинуклеотид, кодирующий гликопротеин оболочки;
- (ii) второй полинуклеотид, который содержит гены gag и pol;
- (iii) третий полинуклеотид, который кодирует белок rev; и
- (iv) геном лентивирусного вектора, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий антиген.

В конкретных аспектах гликопротеин оболочки представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис. В некоторых аспектах гликопротеин E2 содержит [SINVar1] или его вариант, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью аминокислотной последовательности. В некоторых аспектах гликопротеин E2 на 90% идентичен SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1]. В некоторых аспектах (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком, и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис. В некоторых аспектах гликопротеин E2 представляет собой SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора получен из HIV-1.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является способным к интеграции.

В конкретных аспектах геном лентивирусного вектора псевдотипированной лентивирусной векторной частицы или упаковывающей системы по любому из предыдущих вариантов реализации является интеграционно-дефицитным или интеграционно-дефектным. В некоторых аспектах ген pol кодирует неактивный фермент интегразу, а геном лентивирусного вектора не имеет функционального полипуринового тракта (PPT).

В конкретных аспектах упаковывающая вирус клетка дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий белок Vpx, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1, который необязательно содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44).

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлена композиция, содержащая вирусные частицы, демонстрирующие гликопротеин E2 альфавируса, при этом по меньшей мере 80% N-связанных гликанов в указанной композиции содержат структуру Man₉.

В конкретных аспектах гликопротеин E2 альфа-вируса представляет собой гликопротеин E2 вируса Синдбис, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

В некоторых вариантах реализации настоящего раскрытия представлен способ доставки генома вирусного вектора в клетку, экспрессирующую DC-SIGN, включающий введение вирусной частицы или композиции по любому из предыдущих вариантов реализации.

Дополнительные варианты реализации

1. Способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, включающий:

- (a) культивирование в питательной среде, содержащей кифуензин, упаковывающей вирус клетки,

включающей:

- (1) геном лентивирусного вектора, содержащий полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген,
- (2) полинуклеотид, кодирующий гликопротеин E2 вируса Синдбис, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN, и
- (3) полинуклеотид, кодирующий белок Vpx или белок Vpr, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1; и
- (b) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.
2. Способ согласно варианту реализации 1, отличающийся тем, что гликопротеин E2 на 90% идентичен SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].
3. Способ согласно варианту реализации 1 или 2, отличающийся тем, что (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком, и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис.
4. Способ согласно варианту реализации 2, отличающийся тем, что гликопротеин E2 представляет собой SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].
5. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SIVmac Vpx [SEQ ID NO: 44].
6. Способ по любому из вариантов реализации 1-4, отличающийся тем, что белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrcm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47).
7. Способ по любому из вариантов реализации 1-4, отличающийся тем, что белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).
8. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или вирус-специфический антиген.
9. Способ согласно варианту реализации 8, отличающийся тем, что опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100, gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного gas, реаранжировки bcr/abl, Her2/neu, мутированного p53, p53 дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена и альфа-фетопротеина.
10. Способ согласно варианту реализации 8, отличающийся тем, что вирусспецифический антиген представляет собой антиген HIV, антиген SIV, антиген аденовирусов, антиген энтеровирусов, антиген коронавирусов, антиген калицивирусов, антиген вируса чумы плотоядных, антиген вируса Эбола, антиген флавивирусов, антиген вирусов гепатита, антиген вирусов герпеса, антиген вирусов инфекционного перитонита, антиген вирусов гриппа, антиген вирусов лейкемии, антиген вируса Марбург, антиген ортомиксовирусов, антиген вирусов папилломы, антиген вирусов парагриппа, антиген парамиксовирусов, антиген парвовирусов, антиген пестивирусов, антиген пикорнавирусов, антиген вируса полиомиелита, антиген вируса оспы, антиген вируса бешенства, антиген реовирусов, антиген ретровирусов или антиген ротавирусов.
11. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген.
12. Способ согласно варианту реализации 11 отличающийся тем, что первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который между двумя антигенами содержит саморасщепляющийся пептид A2.
13. Способ согласно варианту реализации 12, отличающийся тем, что саморасщепляющийся пептид A2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57.
14. Способ по любому из вариантов реализации 11-13, отличающийся тем, что первый антиген представляет собой NY-ESO-1, а второй антиген представляет собой MAGE-A3.
15. Способ согласно варианту реализации 11, отличающийся тем, что первый и второй антиген экспрессируются из двунаправленного промотора.
16. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от около 0,1 до около 10 мкг/мл.
17. Способ согласно варианту реализации 16, отличающийся тем, что кифунензин присутствует в

питательной среде в концентрации от около 0,25 до около 2 мкг/мл.

18. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что упаковывающая вирус клетка дополнительно содержит:

- (i) полинуклеотид, который содержит гены gag и pol; и
- (ii) полинуклеотид, который кодирует белок rev.

19. Способ согласно варианту реализации 18, отличающийся тем, что гены gag и pol оптимизированы для кодона человека и содержат неоптимизированное окно около позиции 1228-1509 SEQ ID NO: 54.

20. Способ согласно варианту реализации 18 или 19, отличающийся тем, что полинуклеотид, содержащий гены gag и pol не имеет функционального элемента, чувствительного к rev (RRE).

21. Способ по любому из вариантов реализации 18-20, отличающийся тем, что ген pol кодирует неактивный фермент интегразу.

22. Способ согласно варианту реализации 21, отличающийся тем, что фермент интегразы имеет мутацию D64V.

23. Способ по любому из вариантов реализации 18-

22, отличающийся тем, что полинуклеотид, кодирующий белок Vpr, находится на той же или другой плазмиде, что и полинуклеотид, кодирующий белок rev, или полинуклеотид, содержащий гены gag и pol.

24. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что геном лентивирусного вектора получен из HIV-1.

25. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что геном лентивирусного вектора имеет инактивированный 3' длинный концевой повтор (LTR) или самоинактивирующийся 3' длинный концевой повтор (LTR).

26. Способ согласно варианту реализации 25, отличающийся тем, что геном лентивирусного вектора содержит элемент U3, у которого отсутствует по меньшей мере одно из следующих: энхансерная последовательность, TATA-бокс, сайт Sp1, сайт NK-каппа В или полипуриновый тракт (PPT).

27. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что геном лентивирусного вектора содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21, 22 или 2 3.

28. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор созревания/стимуляции дендритных клеток.

29. Способ согласно варианту реализации 28, отличающийся тем, что фактор созревания/стимуляции дендритных клеток выбран из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

30. Способ по любому из предыдущих вариантов реализации, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая антиген, функционально связана с промотором, выбранным из группы, состоящей из промотора убиквитина-С человека (UbiC), немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV) и промотора, чувствительного к тетрациклину.

31. Способ согласно варианту реализации 30, отличающийся тем, что промотор представляет собой интрон-дефицитный промотор.

32. Способ согласно варианту реализации 31, отличающийся тем, что указанный интрон-дефицитный промотор представляет собой промотор UbiC.

33. Лентивирусная векторная частица, полученная согласно варианту реализации по п.1.

34. Лентивирусная векторная частица, полученная согласно варианту реализации по п.18.

35. Способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, включающий:

(а) культивирование в питательной среде, содержащей кифуназин, упаковывающей вирус клетки, включающей:

(1) геном лентивирусного вектора, который содержит полинуклеотид, кодирующий MAGE-A3 и NY-ESO-1, при этом полинуклеотид, кодирующий саморасщепляющийся пептид TA2 расположен между полинуклеотидами, кодирующими MAGE-A3 и NY-ESO-1, при этом лентивирусный геном не имеет полипуринового тракта (PPT) и при этом экспрессия MAGE-A3 и NY-ESO-1 находится под контролем промотора UbiC, не имеющего интрона,

(2) полинуклеотид, кодирующий гликопротеин E2 вируса Синдбис, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN,

(3) полинуклеотид, содержащий гены gag и pol, оптимизированные для кодона человека, при этом полинуклеотид не имеет функционального элемента, чувствительного к rev (RRE), и при этом ген pol кодирует неактивный фермент интегразу,

(4) полинуклеотид, кодирующий белок Vpr или белок Vpr, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1; и

(b) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

36. Композиция, содержащая псевдотипированные лентивирусные векторные частицы, которые со-

держат (а) белок V_{pr} или белок V_{pr}, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1, (b) экзогенный полинуклеотид, кодирующий антиген, и (с) множество гликопротеинов оболочки, которые предпочтительно связывают клетки, экспрессирующие DC-SIGN, при этом указанная композиция является более высокоманнозилированной по сравнению с контрольной композицией тех же псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы.

37. Композиция согласно варианту реализации 36, отличающаяся тем, что гликопротеины оболочки представляют собой гликопротеины альфа-вируса.

38. Композиция согласно варианту реализации 37, отличающаяся тем, что гликопротеины оболочки представляют собой гликопротеины вируса Синдбис.

39. Композиция по любому из вариантов реализации 36-38, отличающаяся тем, что высокое маннозилирование характеризуется тем, что является более чувствительным к ЭндоН по сравнению с контрольной композицией, полученной при отсутствии ингибитора маннозидазы.

40. Композиция по любому из вариантов реализации 36-38, отличающаяся тем, что чувствительность к ЭндоН определяют путем определения молекулярной массы гликопротеинов оболочки посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН ПААГЭ) после обработки ЭндоН.

41. Композиция по любому из вариантов реализации 36-38, отличающаяся тем, что молекулярная масса гликопротеинов оболочки после обработки ЭндоН изменилась на около 45% или более от диапазона между (а) гликопротеинами оболочки, не обработанными эндогликозидазой, и (b) гликопротеинами оболочки, обработанными PNGазой F.

42. Композиция согласно варианту реализации 41, отличающаяся тем, что молекулярная масса гликопротеинов оболочки после обработки ЭндоН изменилась на около 70% или более от диапазона между (а) гликопротеинами оболочки, не обработанными эндогликозидазой, и (b) гликопротеинами оболочки, обработанными PNGазой F.

43. Композиция согласно варианту реализации 41, отличающаяся тем, что молекулярная масса гликопротеинов оболочки после обработки ЭндоН изменилась на около 90% или более от диапазона между (а) гликопротеинами оболочки, не обработанными эндогликозидазой, и (b) гликопротеинами оболочки, обработанными PNGазой F.

44. Композиция по любому из вариантов реализации 36-43, отличающаяся тем, что по меньшей мере 30% гликопротеинов оболочки в указанной композиции имеют повышенное количество чувствительного к ЭндоН гликана по сравнению с контрольными гликопротеинами, имеющими ту же аминокислотную последовательность(и) в контрольной композиции псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных при отсутствии ингибитора маннозидазы.

45. Композиция по любому из вариантов реализации 36-44, отличающаяся тем, что большая часть гликопротеинов оболочки являются высокоманнозилированными.

46. Композиция по любому из вариантов реализации 36-45, отличающаяся тем, что псевдотипированные лентивирусные векторные частицы являются интеграционно-дефицитными.

47. Композиция по любому из вариантов реализации 36-46, отличающаяся тем, что композиция содержит гликопротеин E2 вируса Синдбис.

48. Композиция согласно варианту реализации 47, отличающаяся тем, что гликопротеин E2 на 90% идентичен SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].

49. Композиция согласно варианту реализации 47 или 48, отличающаяся тем, что (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты, (ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком, и (iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис.

50. Композиция согласно варианту реализации 49, отличающаяся тем, что гликопротеин E2 представляет собой SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1].

51. Композиция по любому из вариантов реализации 36-50, отличающаяся тем, что белок V_{pr} содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80% идентичной SIVmac V_{pr} [SEQ ID NO: 44].

52. Композиция по любому из вариантов реализации 36-50, отличающаяся тем, что белок V_{pr} содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SIVmac V_{pr} (SEQ ID NO: 44), SIVsm V_{pr} (SEQ ID NO: 45), SIVrcm V_{pr} (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 V_{pr} (SEQ ID NO: 47).

53. Композиция по любому из вариантов реализации 36-49, отличающаяся тем, что белок V_{pr} содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 90% идентичной SIVdeb V_{pr} (SEQ ID NO: 48) или SIVmus V_{pr} (SEQ ID NO: 49).

54. Композиция по любому из вариантов реализации 36-53, отличающаяся тем, что антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или вирусспецифический антиген.

55. Композиция согласно варианту реализации 54, отличающаяся тем, что опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100,

gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного gas, реаранжировки bcr/abl, Her2/neu, мутированного p53, p53 дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена и альфа-фетопротеина.

56. Композиция согласно варианту реализации 54, отличающаяся тем, что вирусспецифический антиген представляет собой антиген HIV, антиген SIV, антиген аденовирусов, антиген энтеровирусов, антиген коронавирусов, антиген калицивирусов, антиген вируса чумы плотоядных, антиген вируса Эбола, антиген флавивирусов, антиген вирусов гепатита, антиген вирусов герпеса, антиген вирусов инфекционного перитонита, антиген вирусов гриппа, антиген вирусов лейкемии, антиген вируса Марбург, антиген ортомиксовирусов, антиген вирусов папилломы, антиген вирусов парагриппа, антиген парамиксовирусов, антиген парвовирусов, антиген пестивирусов, антиген пикорнавирусов, антиген вируса полиомиелита, антиген вируса оспы, антиген вируса бешенства, антиген реовирусов, антиген ретровирусов или антиген ротавирусов.

57. Композиция по любому из вариантов реализации 36-56, отличающаяся тем, что геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген.

58. Композиция согласно варианту реализации 57, отличающаяся тем, что первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который между двумя антигенами содержит саморасщепляющийся пептид A2.

59. Композиция согласно варианту реализации 58, отличающаяся тем, что саморасщепляющийся пептид A2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57.

60. Композиция по любому из вариантов реализации 57-59, отличающаяся тем, что первый антиген представляет собой NY-ESO-1, а второй антиген представляет собой MAGE-A3.

61. Композиция согласно варианту реализации 57, отличающаяся тем, что первый и второй антиген экспрессируются из двунаправленного промотора.

Примеры

Следующие примеры представлены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия.

Пример 1. Лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с гликопротеинами вируса Синдбис, полученные в присутствии кифуензина, эффективно инфицируют клетки, экспрессирующие DC-SIGN

Целью следующих экспериментов была попытка произвести и охарактеризовать псевдотипированные лентивирусные векторы с маннозилированными гликопротеинами оболочки. При этом авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что кифуензин был гораздо более эффективным при производстве псевдотипированных лентивирусных векторов с возможностью эффективно инфицировать клетки, экспрессирующие DC-SIGN (например, дендритные клетки) при использовании значительно меньших концентраций по сравнению с другими ингибиторами маннозидазы I, включая DMNJ.

Клетки 293T трансфецировали четырьмя отдельными плазмидами, кодирующими лентивирусный геном, Gag/Pol, Rev и Envelope, соответственно, используя полиэтиленмин (ПЭИ). Через пять часов после трансфекции смесь + среду удаляли. В сосуд снова добавляли среду вместе с указанным количеством ингибитора маннозидазы (т.е. DMNJ, кифуензина и свайнсоина). Через 48 ч супернатант (содержащий вектор) собирали и фильтровали через фильтр 0,45 мкм. Затем клетки HT1080, стабильно экспрессирующие рецептор DC-SIGN человека, трансдуцировали указанными объемами вектора. Родительские клетки HT1080 (без DC-SIGN) использовали в качестве контролей, и их не подвергали трансдукции каким-либо вектором. Через 48 ч после трансдукции клетки подвергали анализу на экспрессию GFP (gfp%). Результаты продемонстрированы на фиг. 1A (HT1080, экспрессирующие DC-SIGN) и 1B (родительские HT1080).

Лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с гликопротеинами вируса Синдбис и полученные в присутствии низких концентраций кифуензина (1 мкг/мл), неожиданно трансфецировали клетки, экспрессирующие DC-SIGN, значительно лучше, чем полученные в присутствии более высоких концентраций DMNJ (400 мкг/мл) или свайнсоина (10 мкг/мл). Соответственно, получение лентивирусных векторных частиц, псевдотипированных с гликопротеинами вируса Синдбис в присутствии ингибитора маннозидазы I кифуензина приводит в результате к значительно усиленному инфицированию клеток, экспрессирующих DC-SIGN по сравнению с частицами, полученными в присутствии других ингибиторов маннозидазы I.

Пример 2. Для создания псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, которые эффективно инфицируют клетки, экспрессирующие DC-SIGN, требуются низкие количества кифуензина

Целью этого эксперимента было определение наиболее эффективной концентрации кифуензина

для получения псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, обладающих способностью инфицировать клетки, экспрессирующие DC-SIGN.

Клетки 293Т трансфецировали плазмидами, описанными в примере 1 с использованием ПЭИ. Через 5 ч после трансфекции смесь + среду удаляли. В сосуд снова добавляли среду вместе с указанным количеством кифунензина (мкг/мл) или с 400 мкг/мл DMNJ. Через 48 ч супернатант (содержащий лентивирусные векторные частицы) собирали и фильтровали через фильтр 45 мкм. Затем клетки HT1080, стабильно экспрессирующие рецептор DC-SIGN человека, трансдуцировали указанными объемами супернатанта, содержащего вектор.

Родительские клетки HT1080, которые не подвергали трансдукции вектором, использовали в качестве контролей. Через 48 ч после трансдукции клетки подвергали анализу на экспрессию gfp (gfp+%). Результаты продемонстрированы на фиг. 2А (клетки HT1080, экспрессирующие DC-SIGN) и 2В (родительские клетки HT1080).

Частицы, полученные в присутствии 0,125 мкг/мл кифунензина, соответствуют способности частиц, полученных в присутствии 400 мкг/мл DMNJ, инфицировать клетки, экспрессирующие DC-SIGN (фиг. 2А). Частицы, полученные в присутствии всех концентраций кифунензина превышающих 0,125 мкг/мл, инфицировали клетки, экспрессирующие DC-SIGN, гораздо более эффективно по сравнению с частицами, полученными в присутствии 400 мкг/мл DMNJ. Титрование кифунензина показало, что способность лентивирусных векторных частиц, псевдотипированных с гликопротеинами вируса Синдбис, инфицировать клетки, экспрессирующие DC-SIGN, достигает пика у частиц, полученных в присутствии 0,25 мкг/мл.

Пример 3.

Целью этого эксперимента было охарактеризовать профиль гликозилирования псевдотипированных лентивирусных частиц, полученных в присутствии DMNJ или кифунензина.

Лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с гликопротеинами вируса Синдбис, получали согласно примеру 1 в присутствии 1 мкг/мл кифунензина, DMNJ или без ингибитора маннозидазы I. Частицы инкубировали с PNGазой F или ЭндоН в течение 1 ч. PNGаза F представляет собой общую эндогликозидазу, которая будет расщеплять все N-связанное гликозилирование независимо от профиля гликозилирования (см. фиг. 3А). ЭндоН является специализированной эндогликозидазой, которая будет расщеплять только высокоманнозное N-связанное гликозилирование (см. фиг. 3А). Когда вирусные частицы получены в присутствии ингибитора маннозидазы I, можно ожидать, что вирусная оболочка имеет гликопротеины с высоким содержанием Man₉ и чувствительные к расщеплению посредством ЭндоН. Образцы анализировали с помощью анализа изменения подвижности в геле при проведении ДСН ПАА-ГЭ и иммуноблоттинга с антителами против вирусной оболочки Синдбис. Результаты проиллюстрированы на фиг. 3В.

Степень подвижности вирусной оболочки (SIN-Var1) вируса, полученного в присутствии или при отсутствии кифунензина или DMNJ, в сочетании с обработкой PNGазой F или ЭндоН, свидетельствует о степени гликозилирования Var1. Контрольный вирус (дорожка 1) является гликозилированным (следовательно, перемещается в геле медленнее), и это гликозилирование может быть полностью удалено с помощью PNGазы F (о чем свидетельствует более быстрая подвижность, наблюдаемая на дорожке 2). Как и ожидалось, в связи со способностью PNGазы F расщеплять любое N-связанное гликозилирование, вирус, полученный в присутствии DMNJ или кифунензина, является чувствительным к обработке PNGазой F (дорожки 5 и 8). Тем не менее, только вирусы, полученные в присутствии ингибиторов маннозидазы I (Var1+ DMNJ или + кифунензин), чувствительны к обработке ЭндоН (дорожки 6 и 9), в то время как контрольный вирус (Var1) только частично чувствителен к ЭндоН. Частичная чувствительность, вероятно, происходит от сайтов в E2-Var1, которые, как правило, не подвергаются воздействию маннозидазы I в процессе производства и не вносят вклад в связывание с дендритными клетками. Эти результаты показывают, что эффективность ингибитора маннозидазы I кифунензина при получении вирусных частиц с высокоманнозными гликопротеинами может быть измерена с помощью анализа изменения подвижности в геле после обработки ЭндоН и сравнения его эффективности с частицами, полученными в присутствии DMNJ.

Пример 4. Содержание маннозы в гликопротеинах оболочки коррелирует с концентрацией кифунензина в среде, используемой для получения вирусных частиц

Целью этого эксперимента было охарактеризовать профиль гликозилирования псевдотипированных лентивирусных частиц, полученных в присутствии различных концентраций кифунензина.

Лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с гликопротеинами вируса Синдбис, получали согласно примеру 1 с различными концентрациями кифунензина или 400 мкг/мл DMNJ. Частицы инкубировали с ЭндоН в течение 1 ч. Затем образцы анализировали с помощью анализа изменения подвижности в геле и иммуноблоттинга с антителом к оболочке вируса Синдбис. Параллельно клетки HT1080, стабильно экспрессирующие рецептор DC-SIGN человека, трансдуцировали указанными объемами псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных с кифунензином или DMNJ или без них. Через 48 ч после трансдукции клетки подвергали анализу на экспрессию GFP (показана на оси у как процент GFP положительных клеток) для создания графиков. Результаты проиллюстрированы

на фиг. 4.

Степень содержания маннозы коррелирует со степенью трансдукции клеток HT1080 DC-SIGN, как показано степенью изменения подвижности в геле образцов, обработанных ЭндоН (фиг. 4А) и графиками процента GFP трансдукции (фиг. 4В). Т.е. все более высокие концентрации кифунензина в питательных средах, используемые для получения вирусных частиц, приводили в результате к более высокоманнозному содержанию гликопротеинов оболочки, как показано посредством больших изменений подвижности при обработке ЭндоН и более высокой экспрессии GFP (т.е. инфицирования) в клетках HT1080, экспрессирующих DC-SIGN. Эти результаты показывают, что кифунензин непосредственно влияет на степень маннозного содержания вирусной оболочки, и это непосредственно коррелирует со способностью к трансдукции клеток HT1080, экспрессирующих человеческий рецептор DC-SIGN.

Пример 5. Подтверждение экспрессии Vpx в псевдотипированных лентивирусных векторных частицах

Целью этого эксперимента было определение того, может ли Vpx SIVmac быть экспрессирован и определен в псевдотипированных лентивирусных векторных частицах.

SIVmac Vpx с N-концевой меткой HA клонировали в вектор экспрессии млекопитающих под контролем промотора CMV (конструкт с названием pENV-SIVmacVpx). Чтобы подтвердить, что происходила экспрессия белка Vpx, клетки 293Т трансфецировали этим конструктом и лизировали через 24 ч после трансфекции. Лизаты анализировали посредством иммуноблоттинга с использованием антитела к HA (фиг. 5А). Для подтверждения того, что Vpx был упакован в лентивирусные частицы, лентивирусы были получены с использованием четырех плазмид, трансфецированных в упаковывающие клетки 293Т. Эти четыре плазмиды кодируют лентивирусный геном, Gag/Pol (либо интеграционно-компетентный [Инт+] или интеграционно-дефектный [Инт-]), Rev и Envelope. Пятую плазмиду либо включали для VPX или не включали. Вирус собирали через два дня после трансфекции и концентрировали при помощи центрифугирования. Загружали 100 нг р24 на лунку на гель для иммуноблоттинга с антителом к HA (фиг. 5В). В качестве контроля загрузки использовали антитело к р24.

В клетках 293Т, трансфецированных плазмидой, кодирующей ген Vpx, белок Vpx эффективно экспрессируется (фиг. 5А). Подобным образом, Vpx упаковывается как в интеграционно-компетентные (Инт+), так и в интеграционно-дефектные (Инт-) лентивирусные частицы (фиг. 5В).

Пример 6.

Vpx необходим для эффективной трансдукции дендритных клеток человека VSV-G-псевдотипированными интеграционно-дефицитными лентивирусными векторными частицами.

Целью этого эксперимента было определить, является ли Vpx необходимым для продуктивного инфицирования дендритных клеток VSV-G-псевдотипированными интеграционно-дефицитными лентивирусными векторными частицами.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) были обогащены моноцитами CD14+, с последующим обогащением дендритными клетками с использованием GMCSF и IL-4.

Эти дендритные клетки человека, полученные из МКПК, трансдуцировали увеличенный количествами конструктов VSV-G-псевдотипированной интеграционно-дефицитной лентивирусной векторной частицы (0,2, 2, 20 или 200 нг р24), которые содержали или не содержали Vpx. Через пять дней после инфицирования события трансдукции измеряли посредством селекции на клетках, которые были положительны в отношении CD11c, и оценивали процент клеток, положительных в отношении GFP (ось x) с DC-SIGN на оси y. AZT (ингибитор обратной транскриптазы) использовали в лентивирусных векторных частицах в самой высокой дозе (200 нг).

Результаты проиллюстрированы на фиг. 6. Vpx был необходим для интеграционно-дефицитных VSV-G-псевдотипированных лентивирусных частиц, чтобы трансдуцировать дендритные клетки человека, полученные из МКПК. Эффективная трансдукция зависит от обратной транскрипции, потому что она ингибируется AZT.

Пример 7. Vpx улучшает трансдукцию дендритных клеток человека VSV-G-псевдотипированными интеграционно-компетентными лентивирусными векторными частицами

Целью этого эксперимента было определить, является ли Vpx необходимым для продуктивного инфицирования дендритных клеток VSV-G-псевдотипированными интеграционно-компетентными лентивирусными векторными частицами.

МКПК человека были обогащены моноцитами CD14+, с последующим обогащением дендритными клетками с использованием GMCSF и IL-4. Эти дендритные клетки человека, полученные из МКПК, трансдуцировали увеличенными количествами конструктов VSV-G-псевдотипированной интеграционно-компетентной лентивирусной векторной частицы (0,2, 2 или 20 нг р24), которые содержали или не содержали Vpx. Через пять дней после инфицирования события трансдукции измеряли посредством селекции на клетках, которые были положительны в отношении CD11c, и оценивали процент клеток, положительных в отношении GFP (ось x) с CD11c на оси y. Невирапин (Nev, ингибитор обратной транскриптазы) использовали в лентивирусных векторных частицах в самой высокой дозе (20 нг).

Результаты проиллюстрированы на фиг. 7. Vpx усиливал способность интеграционно-компетентных лентивирусных векторных частиц трансдуцировать дендритные клетки человека, полу-

ченные из МКПК. Улучшенная трансдукция зависит от обратной транскрипции, потому что она ингибируется невирапином.

Пример 8. Vpx и высокоманнозилированные гликопротеины оболочки необходимы для эффективной трансдукции дендритных клеток человека лентивирусными векторными частицами, псевдотипированными с гликопротеинами оболочки вируса Синдбис

Целью этого эксперимента было исследование способности псевдотипированных с гликопротеином E2 вируса Синдбис лентивирусных векторных частиц, содержащих белок Vpx и полученных в присутствии кифуензина, продуктивно инфицировать дендритные клетки.

МКПК человека были обогащены моноцитами CD14+, с последующим обогащением дендритными клетками с использованием GMCSF и IL-4. Эти дендритные клетки человека, полученные из МКПК, трансдуцировали различными количествами конструкторов SINvar1-псевдотипированной интеграционно-дефектной лентивирусной векторной частицы (0,2, 2 или 20 нг р24), которые содержали или не содержали Vpx или были получены в присутствии или при отсутствии ингибитора маннозидазы I, кифуензина. Через пять дней после инфицирования события трансдукции измеряли посредством селекции на клетках, которые были положительны в отношении CD11c, и оценивали процент клеток, положительных в отношении GFP (ось x) с DC-SIGN или CD11c на оси y. Невирапин (Nev, ингибитор обратной транскриптазы) использовали в лентивирусных векторных частицах в самой высокой дозе (20 нг).

Как показано на фиг. 8, неожиданно оказалось, что для эффективной трансдукции дендритных клеток человека с использованием лентивируса, псевдотипированного с гликопротеинами вируса Синдбис, необходим как Vpx, так и получение вирусных частиц в присутствии кифуензина. Соответственно эти результаты показывают, что частицы, содержащие комбинацию высокоманнозилированных гликопротеинов (в результате образования частиц в присутствии кифуензина) и Vpx, действуют синергически, чтобы эффективно инфицировать и экспрессировать белки, которые кодируются лентивирусным геномом. То есть, если любой из Vpx или высокоманнозилированных гликопротеинов отсутствуют в интеграционно-дефектных лентивирусных частицах, псевдотипированных с гликопротеином оболочки вируса Синдбис, дендритные клетки не трансдуцируются эффективно.

Пример 9. Количественное определение маннозилирования оболочек лентивирусных векторных частиц

Лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с гликопротеинами вируса Синдбис, получали согласно примеру 1 без обработки (фиг. 9А, дорожки 1-3), 400 мкг/мл DMNJ (фиг. 9А, дорожки 4-6) или 1 мкг/мл кифуензина (фиг. 9А, дорожки 7-9). Частицы не обрабатывали (дорожки 1, 4, 7), инкубировали с ЭндоН в течение 1 ч (дорожки 2, 5, 8) или инкубировали с PNGазой F в течение 1 ч (дорожки 3, 6, 9). Затем образцы анализировали с помощью анализа изменения подвижности в геле и иммуноблоттинга с антителом к оболочке вируса Синдбис.

Анализ данных изменения подвижности в геле проводили с использованием программного обеспечения Quantity One от компании Biorad. Коротко, с помощью функции "дорожка", были нарисованы вертикальные линии через каждую из 9 дорожек, показанных на фиг. 9А. Это определяет область для анализа с помощью программы. Далее, с помощью функции "свойства полосы" определяли пик интенсивности для каждой полосы. Эти значения также проиллюстрированы на фиг. 9А. Это дает нам значение пика интенсивности каждой полосы на геле через ранее указанную "дорожку".

Далее были составлены графики профиля интенсивности каждой полосы и его положение на дорожке. Результаты продемонстрированы на фиг. 9В (без обработки маннозидазой), на фиг. 9С (обработка DMNJ и на фиг. 9D (обработка кифуензином).

На каждом графике изображен каждый из типов оболочки, не расщепленных ферментом, расщепленных Эндо Н или PNGазой F, как указано. На оси y представлена интенсивность полосы, а на оси x представлено положение полосы вместе с описанной дорожкой (т.е. значение "относительно фронта"; значение "оф" представляет собой расстояние полосы от верхушки геля по сравнению с общей длиной дорожки).

Для количественной оценки изменения подвижности пиковую интенсивность полосы, которая не была обрезана расщепляющим ферментом (т.е. полное гликозилирование) сравнивали с полосой, которая была обрезана ферментом PNGазой F (т.е. все сайты гликозилирования удалены). Таким образом, пик интенсивности, равный полосе, которая не была расщеплена каким-либо ферментом будет иметь 0% сдвига, а пик интенсивности, равный полосе, которая была расщеплена с помощью PNGаза F, будет расцениваться как 100% сдвиг. Без добавления кифуензина (дорожка 2) изменение подвижности в геле (сдвиг) ЭндоН составляет 36% от сдвига PNGаза F. Важно отметить, что образец, обработанный кифуензином и расщепляемый ЭндоН (т.е. высокоманнозное специфическое расщепление), сдвигается на 90% от расстояния сдвига PNGаза F. Соответственно почти все из гликозилированных сайтов в оболочке вирусного вектора находятся в высокоманнозном состоянии после обработки 1 мкг/мл кифуензина.

Все количественные анализы приведены в таблице.

Оболочка	Расщепляющий фермент	Пиковое значение интенсивности	Значение интенсивности спектра	% сдвига
вар1	Отсутствует	0,387	0	0
вар1	Эндо Н	0,5	0,113	36,10224
вар1	PNGаза F	0,7	0,313	100
вар1+DMNJ	Отсутствует	0,338		
вар1+DMNJ	Эндо Н	.412, .6, .712		
вар1+DMNJ	PNGаза F	0,65		
вар1+киф	Отсутствует	0,425	0	0
вар1+киф	Эндо Н	0,663	0,238	90,4943
вар1+киф	PNGаза F	0,688	0,263	100

Значение интенсивности спектра представляет собой пиковое значение интенсивности минус пиковое значение интенсивности оболочки, расщепленной без фермента. Это выполняют для нормализации значений в спектре от 0% сдвига к 100% сдвига, как описано выше. % сдвига представляет собой значение интенсивности спектра, разделенное на значение интенсивности спектра образцов, обработанных PNGазой F, умноженное на 100. Это создает процент, при помощи которого количественно оценивают сдвиг полосы, обрезанной с помощью ЭндоН по сравнению с полосами, не обработанными ферментом или PNGазой F. Оболочки, обработанные DMNJ, были исключены из этого анализа, потому что они имели гетерогенные N-связанные модели гликозилирования.

Пример 10. Вирусные векторы с интеграционно-дефицитными элементами дизайна

Для клинических применений, которые требуют непосредственного введения вирусных векторов, но не требуют устойчивой экспрессии гена, который доставляется вектором, например, для вакцин и антиген-направленной иммунотерапии, интеграционно-дефицитные лентивирусные векторы представляют собой подходящую и жизнеспособную альтернативу полностью интеграционно-компетентным лентивирусным векторам для доставки их генетической полезной нагрузки. Мутация интегразы D64V в гене gag/pol и делеция cPPT в геноме вектора были исследованы в отношении их влияния на скорость интеграции вирусного вектора отдельно и в комбинации.

Материалы и способы

Количественная оценка интеграции с помощью анализа Alu-ПЦР

Клетки 293T huDC-SIGN, которые высевали 5E5 клеток/лунку в 6-луночные планшеты трансдуцировали в трех повторностях с 2E9 геномов на лунку вектора. Через 48 ч после трансдукции клетки собирали, и геномную ДНК экстрагировали с использованием набора DNeasy Kit (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Геномную ДНК анализировали с использованием основанного на Alu-LTR гнездового ПЦР анализа, который амплифицирует только последовательности провируса, интегрированные в геномную ДНК хозяина. Следующие модификации были внесены в ранее опубликованный способ Brussel et al., Methods Mol. Biol. 304, 139 (2005). Полимеразу Platinum Taq (Life Technologies, Гранд Айленд, Нью Йорк) использовали для первого раунда амплификации в конечном объеме реакционной смеси 25 мкл. Условия первого раунда ПЦР цикла были следующими: этап денатурации составлял 2 мин при 95°C, с последующими 20 циклами амплификации (95°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с, 72°C в течение 90 с). Гнездовую ПЦР проводили с использованием EXPRESS qPCR Supermix Universal (Life Technologies) и 100 нМ зонда MH60310 в конечном объеме 25 мкл. Протокол гнездовой ПЦР начинается с 2-минутной выдержки при 50°C и 10-минутного этапа денатурации при 95°C, с последующими 40 циклами амплификации (95°C в течение 15 с, 60°C в течение 30 с). Все реакции амплификации проводили с использованием амплификатора Bio-Rad CFX (-96 или -384 модель, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Рассчитывали количество копий интегрированного провируса со ссылкой на стандартную кривую, полученную путем параллельной гнездовой Alu-ПЦР эталонной клеточной линии 293T, содержащей интегрированный провирус с известным количеством копий, разведенным сверх 5-кратного логарифмического диапазона. Общая геномная ДНК в стандартной кривой была нормализована путем смешивания с геномной ДНК от не-трансдуцированных клеток; каждый стандарт и неизвестный образец содержали 100 нг суммарной геномной ДНК. Этот анализ позволил обнаружить 58 провирусов (эксперимент 1) или 4 провируса (эксперимент 2) в 100 нг геномной ДНК.

Количественная оценка интеграции с помощью устойчивости к неомицину

Векторы, кодирующие антиген GFP-T2A-NeoR, были независимо проанализированы в отношении уровня интеграции посредством образования колоний, устойчивых к неомицину. Клетки HT1080 huDC-SIGN трансдуцировали в 6-луночных планшетах с 0,5 мл серийно разведенного вектора (нормализованного геномами) в течение 2 ч, после чего добавляли 2 мл полной среды. Через 24 ч после трансдукции клетки снабжали средой, содержащей 800 мкг/мл G418 (Life Technologies, Гранд Айленд, Нью Йорк). Затем клетки выращивали без пассажа в течение 11-13 дней при селекции G418, после чего колонии визуализировали окрашиванием кристаллическим фиолетовым (BD Biosciences, Роквилл, Мэриленд). Суммар-

ные события интеграции рассчитывали следующим образом: (# колоний) × (коэффициент разведения) = события интеграции.

Количественная оценка интеграции с помощью экспрессии GFP

Для векторов, кодирующих антиген GFP-T2A-NeoR,

уровень относительной интеграции измеряли посредством экспрессии GFP с течением времени в смешанной культуре. Клетки HT1080 huDC-SIGN трансдуцировали в 6-луночных планшетах с равным количеством вектора WT/703 или D64V/704 (нормализованного геномами) в 0,5 мл в течение 2 ч, после чего добавляли 2 мл полной среды. Трансдуцированные клетки поддерживали в среде без селекции лекарственного средства в течение периода вплоть до 30 дней, с пассажами через постоянные промежутки времени. Во время этого периода, клетки периодически анализировали в отношении экспрессии GFP посредством проточной цитометрии (Guava EasyCyte Plus, Millipore, Биллерика, Массачусетс).

Результаты

Клетки 293T huDC-SIGN трансдуцировали WT-или D64V-интеграза VSV-G псевдотипированными векторами, упаковывающими WT ("703") или CPPT-удаленные геномы ("704"). Через 48 часов после трансдукции клетки подвергали анализу на наличие интегрированного провируса при помощи анализа гнездовой Alu-ПЦР. Как проиллюстрировано на фиг. 10A, каждый из векторов WT/704 и D64V/703 имел уровни интеграции, сниженные приблизительно 2-кратно логарифмически по сравнению с вектором WT/703. Для сравнения, уровень интеграции вектора D64V/704 был снижен более чем 2-кратно логарифмически. Эти результаты демонстрируют, что геном ID-VP02 (лентивирусные векторные частицы псевдотипированные с гликопротеином E2 вируса Синдбис с SIVmac Vpx и высокоманнозилированными гликопротеинами оболочки и полученные с помощью упаковывающих клеток, содержащих гев-независимую систему gag/pol, описанную в примере 12) значительно снижал потенциал интеграции, и что элементы D64V и 704 независимо друг от друга вносят свой вклад в этот фенотип.

В дополнение к анализу гнездовой Alu-PCR, были использованы два дополнительных способа исследования уровня интеграции генома вирусного вектора. В обоих способах клетки HT1080 huDC-SIGN трансдуцировали вектором WT/703 или D64V/704, кодирующим GFP и устойчивость к неомицину (NeoR), разделенным саморасщепляющимся линкером T2A (GFP-T2A-NeoR). Трансдукция любым из этих векторов приводила в результате к экспрессии как GFP, так и NeoR. Уровень интеграции измеряли как функцию экспрессии антигена, либо по росту колоний, устойчивых к неомицину с последующей селекцией G418 или посредством экспрессии GFP с течением времени в смешанной культуре.

В первом способе измерение уровня интеграции (т.е. устойчивости к неомицину) клетки HT1080 huDC-SIGN трансдуцировали серийными разведениями вектора и выращивали без пассажа в присутствии селекции G418. Вводимый вектор нормализовали посредством количества копий генома. Клетки, которые экспрессировали NeoR и выдерживали длительное воздействие G418, образуя колонии, предположительно имели интегрированный провирус. Эти колонии подсчитывали и рассчитывали суммарные события интеграции. В двух независимых экспериментах с использованием этого экспериментального подхода, уровень интеграции вектора D64V/704 был снижен более чем 3-кратно логарифмически по сравнению с WT/703 (фиг. 10B).

Во втором способе (т.е. экспрессии GFP), трансдуцированные клетки серийно пассировали в отсутствие селекции и анализировали с помощью проточной цитометрии в различные периоды времени после трансдукции. На 2 день после трансдукции приблизительно 40% клеток, трансдуцированных вектором WT/703, были GFP-положительными (фиг. 10C). Эта популяция оставалась неизменной в течение всего периода эксперимента, давая возможность предположить, что экспрессия GFP была в основном из интегрированного провируса. В отличие от этого, процент GFP-положительных клеток, трансдуцированных вектором D64V/704, снизился приблизительно 100-кратно к 6 дню после трансдукции, и оставался низким в течение остатка эксперимента, хотя и был выше, чем в контроле с имитацией трансдукции. Эти результаты свидетельствуют о том, что большая часть событий трансдукции D64V/704 дает неинтегрированный вектор ДНК, экспрессирующий GFP в ранних периодах времени после трансдукции, но утерянный во время последующих делений клеток. Небольшой процент клеток, экспрессирующих GFP оставшихся на 9 день после трансдукции, вероятно, представляет собой меньшинство событий трансдукции, которые дали интегрированный провирус. По завершению эксперимента (30-й день) было рассчитано, что способность к интеграции вектора D64V/704 уменьшились 386-кратно по сравнению с вектором WT/703. Эти данные сопоставимы с результатами анализа гнездовой Alu-ПЦР.

Взятые вместе результаты всех трех способов измерения уровня интеграции (гнездовая Alu-ПЦР, рост NeoR колоний и % экспрессии GFP) показывают, что уровень интеграции генома вирусного вектора снижается 2-3-кратно логарифмически по сравнению со стандартным, интеграционно-компетентным лентивирусным вектором 3-го поколения (WT/703).

Пример 11.

Псевдотипированные лентивирусные векторные частицы специфически трансдуцируют дендритные клетки в гомогенной популяции клеток.

Специфичность вирусного вектора в отношении дендритных клеток оценивали в контексте гетерогенной популяции потенциальных клеток-мишеней. МКИК человека помещали в культуру в присутствии

GM-CSF и IL-4 на период продолжительностью три дня, чтобы сформировать пул первичных клеток, включающий достаточное количество ДК, полученных из моноцитов, экспрессирующих DC-SIGN. На третий день к культуре добавляли 20 нг р24 псевдотипированного лентивирусного вектора, кодирующего GFP, полученного в присутствии кифуназина и содержащего Vpr. Через три дня после введения вектора в культуру, клетки подвергали анализу на экспрессию GFP в качестве меры трансдукции в основных популяциях клеток, присутствующих в момент анализа: ДК (CD11c^{полож}) 6%, В-клетки (CD11c^{отр}, CD19^{полож}) 10% и Т-клетки (CD11c^{отр}, CD3ε^{полож}) 80%. Как проиллюстрировано на фиг. 11, были трансдуцированы 42% клеток в популяции CD11c^{hi}, DC-SIGN⁺ по сравнению с 0,1% для популяций как В-, так и Т-клеток, присутствующих в культуре. Трансдукция полностью удалялась во всех популяциях клеток, когда в культуру включали ингибитор обратной транскриптазы невирапин (ингибитор ОТ). Эти результаты показывают, что в гетерогенной популяции клеток человека, в которых ДК составляют меньшинство, псевдотипированный лентивирусный вектор специфически трансдуцирует ДК, экспрессирующие DC-SIGN.

Пример 12. Дизайн Rev-независимой плазмиды gag/pol

Из четырех систем плазмид, типичных для псевдотипированных ЛВ третьего поколения, две плазмиды содержат в своих транскриптах последовательности, имеющие потенциал для рекомбинации. А именно, вектор переноса (называемый здесь геном ЛВ), а также плазмиду gag/pol. Между транскриптами генома ЛВ и gag/pol есть две области гомологии (фиг. 12). Во-первых, геном ЛВ имеет частичную последовательность gag с последующим упаковывающим сигналом пси, который состоит из 354 пар оснований (п.о.), идентичных концу 5' последовательности gag в плазмиде gag/pol. События рекомбинации, которые имеют место из этого перекрытия последовательности, называют событиями рекомбинации psi-gag. Во-вторых, как геном ЛВ, так и gag/pol содержат Rev-чувствительный элемент (RRE), состоящий из 234 п.о., образующих вторичную структуру РНК, позволяющую Rev-зависимый ядерный экспорт всех транскриптов, содержащих RRE, в цитоплазму. Эти две гомологичные последовательности были удалены посредством делеции RRE из плазмиды gag/pol и посредством кодон-оптимизации gag/pol открытой рамки считывания (ОРС), за исключением области сдвига рамки между gag и pol, необходимой для трансляции белковых продуктов pol (фиг. 12). Область сдвига рамки образует вторичную структуру РНК в участке соединения gag и pol, что вызывает сдвиг рибосомы на -1 регистр во время трансляции, необходимый для трансляции продуктов гена pol. Watts et al., Nature, 460:711-716 (2009). Для этих экспериментов, область из 282 п.о. между парами оснований 1228 и 1509 gag/pol ОРС не была кодон-оптимизированной. Эта область начинается у 1563 п.о. последовательности pNL4-3 HIV-1 дикого типа, которая кодирует лизин 409 белка Gag и расширяется для включения стоп-кодона Gag. Оставшиеся области (п.о. 1-1228 и п.о. 1510-4307 gag/pol) были с оптимизированным кодоном на основе таблицы кодонов человека. Nakamura et al., Nucleic Acids Res, 28:292 (2000). Полную ОРС RI gag/pol синтезировали в Genscript и клонировали вместо ОРС, состоящей из WT gag/pol и RRE.

Известно, что делеция RRE устраняет Rev-зависимый экспорт транскриптов gag/pol из ядра, так как вторичная структура РНК gag/pol сохраняет транскрипты в ядре. Banchereau and Steinman, Nature, 392(6673), 245 (1998). Поэтому кодон-оптимизация служит как для устранения этих сохраняющихся вторичных структур, так и для того, чтобы свести к минимуму гомологию последовательности с частичной-дад в геноме ЛВ. В связи с тем фактом, что эти модификации гипотетически облегчают транскриптаж/pol из требуемой Rev, схема называется Rev-независимый gag/pol (RI gag/pol), хотя Rev по-прежнему требуется во время производства вектора.

Пример 13. Для ядерного экспорта RI gag/pol не требуется Rev

Для того чтобы продемонстрировать, что транскрипт RI gag/pol действительно является Rev-независимым, клетки 293Т трансфецировали плазмидами дикого типа (WT gag/pol) или RI gag/pol в присутствии или при отсутствии плазмиды, кодирующей Rev.

Материалы и способы

Экспрессия белка Gag

Клетки 293Т высевали в 6-луночный планшет в концентрации 1×10^6 клеток/луночка. Через 24 ч клетки трансфецировали 0,5 мкг плазмид WT gag/pol или RI gag/pol в присутствии или 0,5 мкг плазмиды Rev или 0,5 мкг плазмиды с пустым остовом с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). Через двадцать четыре часа клетки лизировали буфером для экстракции клеток (Invitrogen, номер по каталогу FNN0011) и анализировали с помощью ДСН ПААГЭ, с использованием готовых 4-12% NuPAGE бис-трис гелей (Invitrogen, номер по каталогу NP0321PK2) с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Затем блоты зондировали либо антителом к р24 (Abcam, номер по каталогу ab9071) или антителом к актину (Santa Cruz Biotech, номер по каталогу sc-130656).

Результаты

Клеточные лизаты анализировали на экспрессию белковых продуктов gag с использованием ДСН ПААГЭ и вестерн-блоттинга с антителом к р24. Плазмида RI gag/pol обладала способностью экспрессировать р24 и его предшественники, независимо от присутствия Rev, тогда как транскрипту WT gag/pol был необходим Rev для экспрессии белка (фиг. 13). Процессинг белка р55 Gag показал различия между

транскриптами RI и WT gag/pol на основе соотношения белка p55: p24, давая возможность предположить влияния кодон-оптимизации на экспрессию и/или процессинг белка. Эти результаты показывают, что транскрипты могут подвергаться ядерному экспорту в отсутствие Rev, подтверждая то, что изменения дизайна конструктора RI gag/pol уменьшают потребность в требовании Rev.

Пример 14. RI gag/pol производит инфекционный вектор с сопоставимыми титрами с WT gag/pol

В предыдущих исследованиях описано снижение титров векторов, полученных при отсутствии Rev. См. Gasmi et al., J.Virol. 73:1828-1834(1999); Lucke et al., J.Virol. 79:9359-9362 (2005). Вектор, сделанный с "rev-независимым" gag/pol конструктором был исследован для определения того, будет ли он генерировать инфекционные частицы с титрами, сопоставимыми с титрами WT gag/pol.

Материалы и способы

Получение вектора

Вектор получали в крупном масштабе (CF10) или в небольшом масштабе (чашка 10 см). Для получения в крупном масштабе, клетки 293T высевали в количестве 5E8 клеток/1л в 10-слойную клеточную фабрику (Nunc, номер по каталогу 140400) в среду DMEM, содержащую 5% сыворотку, L-глутамин и антибиотики. Через три дня клетки трансфицировали с использованием ПЭИ (исходный продукт 1 мг/мл) и общей плазмидной ДНК в соотношении 3:1 (мл ПЭИ:мг ДНК). Использовали 1 мг плазмиды векторного генома и 0,5 мг оставшихся плазмид (gag/pol, Rev и VSV-G) на 10-слойную клеточную фабрику. Пять часов спустя среду заменили на 1 л безсывороточной среды (среда Transfx-293, Hyclone, номер по каталогу SH30860.LS). Вектор собирали через 2 и 3 дня после трансфекции. Собранное очищали с помощью фильтра stericup для предварительной очистки 0,45 мкм (Millipore). Вектор концентрировали путем вращения в 1 л бутылке для центрифугирования при 16000g в течение 5 часов. Осадок из каждого собранного литра ресуспендировали в 1 мл HBSS и аликвотировали для хранения при -80°C или ресуспендировали в 1 мл буфера для обработки бензоназой (50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 5% об/об сахарозы). Нуклеазу бензоназу добавляли в конце в концентрации 250 Ед/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C для того, чтобы вызвать распад оставшихся от трансфекции плазмид. Векторные препараты, обработанные бензоназой, повторно концентрировали с использованием сахарозной подушки (30% сахарозы, сверху, 5% сахарозы снизу) и центрифугировали при 116000g в ультрацентрифуге в течение 1,5 ч при 4°C. Осадок вектора ресуспендировали в 1 мл HBSS, аликвотировали и хранили при температуре -80°C. Для небольших масштабов производства вектора клетки 293T высевали в 10 см планшеты в концентрации 2,5E5 клеток/планшет и трансфицировали на следующий день с помощью ПЭИ, аналогично тому, как описано выше, но с 6 мкг плазмиды векторного генома и 3 мкг остальных плазмид, за исключением различных количеств плазмид gag/pol по сравнению с получением вектора. Трансфекции небольших масштабов выполняли в трех повторностях для точности. Пять часов спустя среду заменили на 4 мл среды DMEM, содержащей 5% сыворотку, L-глутамин и антибиотики. Вектор собирали через 2 и 3 дня после трансфекции очищали с помощью 0,45 мкм фильтра. Вектор хранили при температуре -80°C.

Количественное определение вектора - анализ p24

Количественное определение p24 выполняли с использованием набора для анализа HIV-1 p24 ELISA от компании Advanced Bioscience Laboratories (Роквилл, Мэриленд), следуя инструкциям производителя.

Количественное определение вектора - анализ GFU

Клетки 293T высевали в количестве 2E5 клеток/лунку в 12-луночный планшет в 1 мл среды DMEM, содержащей 5% сыворотку, L-глутамин и антибиотики. Через 24 ч клетки в каждой лунке трансдуцировали с 2-кратными разведениями вектора, кодирующего GFP. Каждое количество вектора получают в конечном объеме 1 мл в полной среде DMEM. Пять 2-кратных серийных разведений супернатанта, содержащего вектор, были получены, начиная с 200 мкл вектора на лунку. В качестве контроля, чтобы исключить псевдо-трансдукцию, в параллельной лунке использовали 10 мкм ингибитора обратной транскриптазы невирапина с наибольшим объемом вектора. Через 48 ч после трансдукции клетки подвергали анализу на экспрессию GFP на аппарате Guava (Guava technologies, в настоящее время Millipore). Единицы зеленой флуоресценции (GFU) на мл рассчитывали с помощью наилучшего соответствия (наименьших квадратов) линейной регрессионной модели на основе объемов вектора и результирующих значений процентов GFP, чтобы предсказать количество GFP-положительных клеток на мл вектора с помощью функции FORECAST в программе EXCEL. События, которые приводили к менее 1% GFP-положительных клеток были установлены в качестве предела количественного определения (ПКО).

Результаты

Два параллельных векторных препарата, псевдотипированных с VSV-G, были созданы с использованием векторного генома, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP) в качестве маркера, и с двумя входными количествами ДНК из конструкторов WT gag/pol или RI gag/pol. Оба векторных препарата были исследованы в отношении p24 и продемонстрировали, что они имеют сопоставимые титры физических частиц, независимо от того, какую плазмиду gag/pol использовали для их производства (фиг. 14А). Эти препараты затем анализировали на их способность трансдуцировать клетки-мишени. При нормализации по объему вектор RI gag/pol приводил к событиям трансдукции, сравнимым с WT gag/pol для обоих вводимых количеств плазмиды gag/pol (3 или 6 мкг) используемых во время производства вектора

(фиг. 14В). Эти результаты показывают, что элементы дизайна, введенные для создания гетерозимного конструкта gag/pol не снижали выход физических частиц или инфекционности лентивирусного вектора.

Пример 15. Векторы RI и WT gag/pol вызывают эквивалентные иммунные ответы

ЛВ обычно используются для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих белок, в различные типы клеток *in vitro* для исследовательских целей и в клинических условиях. Тем не менее, как для генной терапии, так и для и антиген-направленной иммунотерапии также разрабатываются ЛВ непосредственно для инъекций. Для исследования того, будет ли вектор RI gag/pol служить в качестве подходящего ЛВ для иммунотерапевтических видов применения, оценивали иммунные реакции, вызываемые против антигенного трансгена, кодируемого вектором RI gag/pol.

Материалы и способы

Количественное определение вектора - анализ ТЕ

Единицы трансдукции (ТЕ) определяли с использованием анализа, в котором события трансдукции в линии клеток-мишеней определяли с помощью количественного ПЦР-анализа, в котором амплифицируются обратно транскрибированные последовательности РНК вектора. Серийные разведения исследуемых образцов и эталонного материала инкубировали в двух повторностях в 96-луночных планшетах с тканевой культурой в присутствии целевых клеток 293Т. Этап трансдукции выполняли как в присутствии, так и при отсутствии ингибитора обратной транскриптазы невирапина в качестве средства для оценки фонового сигнала, который может быть внесен ДНК остаточной плазмиды. Через один день после трансдукции, клетки с имитацией трансдукции или трансдуцированные вектором, лизировали добавлением буфера, содержащего дезоксихолат натрия, твин-20, додецилсульфат натрия (ДСН) и протеиназу К. Затем клеточные лизаты инкубировали последовательно при температуре 37, 55 и 95°C, чтобы обеспечить протеолиз и денатурацию ДНК. Денатурированные клеточные лизаты анализировали с помощью количественной ПЦР с использованием набора праймеров/зондов, который был разработан для амплификации последовательности генома вектора из около 400 п.о., расположенной выше промотора антигена (EX-PRESS qPCR Supermix Universal, Life technologies). Титр инфективности рассчитывали со ссылкой на стандартную кривую, состоящую из линеаризованной плазмидной ДНК, содержащей целевые последовательности разведенные сверх 7-кратного логарифмического диапазона (5,3 копий - $5,3 \times 10^6$ копий)

Иммунизации

Мышей линии C57BL/6 иммунизировали подкожно в основание хвоста на 0 день 2×10^7 , 1×10^8 или 5×10^8 ТЕ ЛВ, кодирующего LV1b, полиэпитопным конструктом, содержащим OVA257 (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 24) H-2Kb-ограниченный эпитоп или носителем HBSS. Аликвоты ЛВ, хранящиеся при -80°C, оттаивали при комнатной температуре, а затем хранили на льду. Вектор серийно разводили в холодном стерильном HBSS и транспортировали в виварий для инъекции. Мышей помещали в обычный щелевой фиксатор с доступом к основанию хвоста. Вектор вводили с помощью инъекции 50 мкл посредством инсулинового шприца 29-калибра 0,3 мл (Becton Dickinson [BD]), введенного подкожно на правой стороне основания хвоста, приблизительно на 1 см каудально относительно ануса, что приводило к незначительному, но заметному растяжению кожи вокруг основания хвоста.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ВОЦ)

Селезенки гомогенизировали путем отжимания через нейлоновый фильтр 70 мкм. Эритроциты лизировали с помощью гипотонического шока посредством короткой инкубации в ледяной ультрафильтрованной воде с последующим немедленным изотоническим восстановлением с 10-кратным PBS. Для анализа цитокинов клетки стимулировали в 96-лунках с пептидами в концентрации 1 мкг/мл на пептид в полной среде RPMI (10% FCS, 10 mM HEPES, 2 мкМ β-меркаптоэтанол и L-глутамин) в течение 5 ч при 37°C, 5% CO₂. Пептид OVA257 (SIINFEKL) произведен с 95% чистотой компанией AnaSpec (Фримонт, Калифорния). После стимуляции окрашивание поверхности проводили в буфере FACS (PBS, 1% FCS, 2 mM EDTA, 0,01% азид натрия) в присутствии антитела 2.4G2, блокирующего FcR, и набора для окрашивания LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (L/D NIR, Invitrogen). Антитела, используемые для окрашивания поверхности в экспериментах *in vivo* включали антимышиное CD4-PerCP-Cy5.5 (eBioscience) или CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience), CD8-Pacific Blue (eBioscience) и B220-V500 (BD). После окрашивания поверхности, клетки фиксировали Cytofix® (BD) и хранили при температуре 4°C в течение ночи в буфере FACS. Затем клетки пермеабелизовали буфером Perm/Wash™ (BD), содержащим 5% крысиную сыворотку (Sigma Aldrich). Антитела для внутриклеточного окрашивания разводили буфером Perm/Wash™, содержащим 5% крысиную сыворотку и добавляли в пермеабелизованные клетки. Антитела включали антимышиное TNF-α-FITC (eBioscience), IFN-γ-PE (eBioscience) и IL-2-APC (eBioscience). Клетки дважды промывали буфером Perm/Wash™ и ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с помощью 3-лазерного проточного цитометра LSRFortessa с пробоотборником с высокой пропускной способностью (BD). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Ашленд, Орегон). Жизнеспособные Т-клетки CD8 подвергали селекции следующим образом: лимфоциты (FSC^{int}, SSC^{lo}), единичные клетки (SSC-A=SSC-H), живые (L/D NIR^{lo}), B220⁻ CD4⁻ CD8⁺. Селекции цитокинов были основаны на 99,9 процентиле (0,1% положительных событий в нестимулированных клетках).

Результаты

Мышей иммунизировали диапазоном доз векторов WT или RI gag/pol, содержащих либо дикого типа (ИНТ(+)) или D64V мутантную интегразу (ИНТ(-)), кодирующих полиэпитопный конструкт, называемый LV1b, содержащий OVA₂₅₇ (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 24) H-2Kb-ограниченный эпитоп Т-клеток CD8. На 12 день после иммунизации измеряли ответы OVA₂₅₇-специфических Т-клеток CD8 в селезенке посредством БОЦ для IFN- γ (фиг. 15). Как интеграционно-компетентные, так и интеграционно-дефицитные векторы, RI gag/pol и WT gag/pol векторы вызывали сопоставимые ответы Т-клеток CD8, подтверждающие, что оптимизация кодона гена gag/pol не оказала отрицательного влияния на функцию ЛВ как иммунотерапевтического носителя.

Пример 16. Оба вектора RI и WT gag/pol вызывают защитный противовирусный иммунитет

Хотя наблюдалось, что индуцированные ЛВ ответы Т-клеток CD8 были эквивалентны вызванным векторами RI gag/pol, следующие эксперименты проводились для определения, был ли эквивалентным функциональный иммунитет, индуцированный этими векторами. Для решения этого вопроса, испытание с рекомбинантным живым вирусом осповакцины использовали в качестве модели вирусной инфекции.

Материалы и способы

Испытание вирусом осповакцины

Мышей линии C57BL/6 иммунизировали подкожно в основание хвоста на 0 день 5×10^8 TE вектора, кодирующего LV1b или носителем HBSS. Через четыре недели мышей подвергали испытанию посредством внутрибрюшинного введения 1×10^7 TCID₅₀ рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего OVA (rVV-OVA), 1E7 TCID₅₀ дикого типа вируса осповакцины (VV-WT) или носителя HBSS. Через пять дней после испытания яичники собирали для количественного определения вирусной нагрузки с помощью анализа TCID₅₀.

Результаты

Мышей вакцинировали интеграционно-дефицитными (ИНТ(-)) ЛВ векторами, кодирующими OVA₂₅₇ с WT или RI gag/pol, а затем, спустя 4 недели проводили испытание с рекомбинантным вирусом осповакцины, кодирующим OVA (rVV-OVA) или дикого типа вирусом осповакцины (VV-WT) в качестве контроля (фиг. 16). Мыши, вакцинированные векторами как RI gag/pol, так и WT gag/pol, показали резкое снижение вирусной нагрузки после испытания с rVV-OVA. Подтверждая, что защита была антиген-специфичной, вирусная нагрузка после испытания с VV-WT была схожей в группах, которым вводили носитель и ЛВ. Эти данные показывают, что ЛВ RI gag/pol могут стимулировать Т-клетки памяти CD8, которые отвечают на вирусное заражение, и обеспечивать функциональный иммунитет.

Пример 17. Модификации RI gag/pol устраняют рекомбинацию psi-gag, но не другие события рекомбинации между векторным геномом и транскриптами gag/pol

RI gag/pol был разработан, чтобы попытаться устранить рекомбинацию psi-gag, тем самым дополнительно минимизируя шансы формирования RCL для третьего поколения ЛВ. Для скрининга геномной ДНК клеток, трансдуцированных интегрирующим вектором, использовали подход на основе гнездовой ПЦР с целью детектирования рекомбинации psi-gag.

Способы и материалы

Количественное определение вектора - анализ геномов

Геномную РНК выделяли из векторных частиц с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Для устранения загрязняющей ДНК экстрагированную нуклеиновую кислоту затем подвергали расщеплению ДНКазой I (Invitrogen), следуя инструкциям производителя. Два разведения каждого образца РНК, обработанного ДНКазой I, затем анализировали с помощью количественной ОТ-ПЦР с использованием системы RNA Ultrasense One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) и ранее описанных вектор-специфических праймеров и зонда. Количество копий РНК генома рассчитывали со ссылкой на стандартную кривую, состоящую из линейаризованной плазмидной ДНК, содержащей целевые последовательности разведенные сверх 7-кратного логарифмического диапазона (10 копий - $1,0 \times 10^7$ копий) Геномный титр, как выражен здесь, отражает количество физических векторных частиц, рассчитанных на основе геномов, при этом предполагается, что каждая векторная частица, содержит две одноцепочечных копии геномной РНК.

Анализ рекомбинации psi-gag

Клетки 293Т высевали в 10 см планшеты в количестве 2×10^6 клеток. На следующий день клетки подвергли трансдукции геномами 1E11 концентрированного VSV-G псевдотипированного вектора, выполненного с WT gag/pol или RI gag/pol. Титры для этих векторов составляли $1,2 \times 10^3$ геномов/мл и $1,5$ геномов/мл, соответственно. Через сорок восемь часов после трансдукции клетки собирали, и геномную ДНК выделяли с использованием набора ДНК для культуры крови и клеток (Qiagen, номер по каталогу 13323). 100 нг геномной ДНК использовали в качестве матрицы для первого раунда ПЦР с использованием высококачественной taq полимеразы platinum (Invitrogen, номер по каталогу 11304-011) и следующих параметров циклов: 1 цикл при 94°C в течение 2 мин; 40 циклов при 94°C в течение 30 с, 55°C в течение 30 с, 68°C в течение 90 с; 1 цикл при 68°C в течение 5 мин. 1 мкл (из 50 мкл) первой ПЦР использовали в качестве матрицы либо неразведенными (1:1) или в разведении 1:100 или в разведении 1:1000 для гнездо-

вой ПЦР. Параметры циклов гнездовой ПЦР были идентичны используемым в первом раунде. Для всех реакций не были включены контроли праймеров.

Праймеры, используемые для ПЦР, представляли собой
 378 (TAAGGCCGAGTCTTATGAGCAGC) (SEQ ID NO: 60),
 709 (AGGACTCGGCTTGCTGAAG) (SEQ ID NO: 61),
 710 (AGCCTGTCTCTCAGTACAATC) (SEQ ID NO: 62),
 835 (TGTCTTATGTCCAGAATGCT) (SEQ ID NO: 63),
 863 (GCACGGCAAGAGGCGAGG) (SEQ ID NO: 64) и
 864 (GCCGGATGTCCAGGATGCTG) (SEQ ID NO: 65).

25 мкл из суммарных 50 мкл гнездовой ПЦР визуализировали на 1% агарозном геле, объединенном с буфером 1×TAE и этидийбромидом. Полосы экстрагировали, и ДНК очищали с использованием набора для экстракции из геля (Qiagen, номер по каталогу 28704) с последующим клонированием в вектор TOPO-TA (Invitrogen, номер по каталогу K4500-02) и секвенированием (Davis Sequencing, CA) с использованием прямых и обратных праймеров M13.

Результаты

Используя подход гнездовой ПЦР, первый раунд ПЦР проводили с использованием прямого праймера (709), который связывается с 5' генома ЛВ упаковывающего пси сигнала, и обратного праймера (710), который связывается в области сдвига рамки считывания как с RI gag/pol, так и с WT gag/pol (фиг. 12). Продукт ПЦР из этого первого раунда затем разбавляли и использовали в качестве матрицы для второй ПЦР с использованием гнездового прямого праймера (863), который связывается с геномом ЛВ, и гнездового обратного праймера (835 или 864), который связывается с областью gag в WT gag/pol или RI gag/pol, соответственно. Эти два обратных праймера были сконструированы для связывания с той же областью в обоих конструктах, только с различиями из-за кодон-оптимизации. Размер ампликона от гипотетического рекомбинанта psi-gag составлял бы 937 п.о. при использовании либо пар праймеров 863 и 835 или пар праймеров 863 и 864.

Векторные препараты, кодирующие полиэпитоп LV1b, были получены с плазмидами RI gag/pol или WT gag/pol, и применялись для трансдукции клеток 293Т. Через 48 ч после трансдукции собирали геномную ДНК и выполняли ПЦР с последующим анализом на агарозном геле. Прежде всего, проводили положительный контроль ПЦР с использованием праймеров, которые связываются только в ЛВ геноме (праймеры 709 и 378). Прогнозируемый размер ампликона генома ЛВ с этими праймерами предположительно составит 1697 п.о. Клеточные культуры, подвергнутые трансдукции вектором WT gag/pol или RI gag/pol в обоих случаях давали ожидаемый размер ампликона, подтвердив тем самым, что трансдукция и интеграция провируса сопоставимы для обоих векторов (фиг. 17А).

Затем выполняли гнездовую ПЦР для рекомбинации psi-gag, как описано выше. Геномная ДНК из клеток, трансдуцированных вектором WT gag/pol производила полосу с ожидаемым размером из 937 п.о. в соответствии с рекомбинацией psi-gag (левая половина, фиг. 17В). В отличие от этого геномная ДНК из клеток, трансдуцированных RI gag/pol производила большую, но более слабую полосу из 1329 п.о. (правая половина, фиг. 17В). Чтобы определить характер полос ПЦР, полосу из 937 п.о. из WT gag/pol, а также полосу из 1329 п.о. из RI gag/pol экстрагировали и клонировали в плазмиды TOPO-TA. Секвенирование показало, что полоса WTgag/pol согласуется с рекомбинантом psi-gag в том, что первая половина последовательности выровнена с векторным геномом, а вторая половина выровнена с транскриптом gag/pol, выходящим за рамки частичной последовательности gag (фиг. 17С). Более слабая полоса 1329 п.о. из RI gag/pol кодировала последовательность, состоящую из первых 1253 п.о., выровненных с геномом ЛВ, но последние 77 п.о. выровнены с областью RI gag/pol (фиг. 17D). Эти результаты показывают, что рекомбинация psi-gag детектировалась в клетках, трансдуцированных вектором WTgag/pol, но не в клетках трансдуцированных вектором RI gag/pol. Кроме того, эти результаты предоставляют доказательства, что рекомбинация, хотя, по-видимому, не зависит от последовательностей psi-gag, все еще детектировалась в клетках, трансдуцированных вектором RI gag/pol.

Пример 18. Идентификация DC-SIGN гомолога SIGNR1 в качестве мышинного рецептора SINvar1

Частицы вектора ID-VP02 были исследованы для определения того, могут ли они использовать эндогенный мышинный рецептор для связывания и входа. В то время как у людей кодируется DC-SIGN и один паралог, DC-SIGNR, мыши имеют 8 гомологов DC-SIGN (называются от SIGNR1 до SIGNR8). По прогнозам шесть из них являются мембраносвязанными, а именно SIGNR1, -R3, -R4, -R5, -R7 и -R8. На основе функциональных исследований было зарегистрировано, что SIGNR1, SIGNR3 и SIGNR5 (также называемые мышинными DC-SIGN) являются самыми близкими функциональными ортологами DC-SIGN человека. Таким образом, исследовали способность SINvar1 выступать посредником связывания и входа через эти рецепторы.

Были созданы клетки HT1080, стабильно экспрессирующие любой мышинный SIGNR1, SIGNR3 или SIGNR5. Эти клетки инкубировали с различными концентрациями интеграционно-дефицитного вектора, кодирующего GFP, который был псевдотипирован с SINvar1, кифуензин-модифицированным высокоманнозным SINvar1 или с пантропным VSV-G. В примере 8 было установлено, что оболочка SINvar1, полученная в присутствии ингибитора маннозидазы I кифуензина, необходима для связывания DC-

SIGN и трансдукции ДК человека. Таким образом, в этом эксперименте в качестве положительного контроля использовали клетки HT1080, чрезмерно экспрессирующие DC-SIGN человека. Из трех исследованных ортологов DC-SIGN мыши, вектор, псевдотипированный с SINvar1 трансдуцировал только клетки, экспрессирующие мышинный SIGNR1 и делали это исключительно кифунензин-зависимым образом (фиг. 18A-D), как наблюдалось для человеческого рецептора. Эффективность трансдукции кифунензин-модифицированного вектора SINvar1 для клеток, экспрессирующих DC-SIGN человека и SIGNR1 мыши, была в высшей степени похожа (фиг. 18A, B), указывая, что SIGNR1 является функционально ортологичным рецептором для векторных частиц ID-VP 0 2 у мыши.

Пример 19. SIGNR1 экспрессируется в мышинных ДК *in vivo*

С целью дальнейшего изучения полезности мышинной модели для функциональных исследований, которые отражают предполагаемый механизм действия у человека, были проведены эксперименты для определения того, экспрессировался ли SIGNR1 в мышинных дендритных клетках.

Материалы и способы

Экспрессия SIGNR1 и 5 *in vivo*

Клетки из отдельных селезенек или пулов из 10 подколенных лимфатических узлов от 5 мышей окрашивали в буфере FACS (PBS, 1% FCS, 2 mM EDTA, 0,01% азид натрия) в присутствии антитела 2.4G2, блокирующего FcR, и набора для окрашивания LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (L/D NIR, Invitrogen). Антитела, используемые для окрашивания поверхности включали антимышиное CD4-PerCP-Cy5.5 (eBioscience) или CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience), CD8-Pacific Blue (eBioscience) и B220-V500 (BD). После окрашивания поверхности клетки фиксировали Cytofix® (BD) и анализировали с помощью многопараметрического проточного цитометра LSRFortessa. События живых одиночных клеток (L/D NIR⁻, SSH=SSA) были разделены на В-клетки (B220⁺ TCRβ⁻), Т-клетки (TCRβ⁺, B220⁻), и ДК (B220⁻TCRβ⁻ MHC-II⁺ CD11c^{hi}). Селекции для экспрессии SIGNR5 и SIGNR1 каждого из этих подмножеств были установлены с помощью отрицательных контрольных окрашиваний с отсутствием SIGNR1- и SIGNR5-специфических антител, так, что частота положительных событий составила ≤0,00.

Результаты

Каждую из суспензий одного вида клеток из трех отдельных селезенек или трех пулов подколенных лимфатических узлов проанализировали в отношении экспрессии SIGNR1 и SIGNR5 в Т-клетках, В-клетках и ДК. Экспрессия SIGNR5 была относительно редкой в устойчивом состоянии, при этом детектировалась только в небольшой популяции В-клеток (фиг. 19). В отличие от этого, в то время как экспрессия SIGNR1 была ограничена лимфоцитами, примерно 10-12% ДК MHC-II⁺ CD11c^{hi} экспрессировали SIGNR1 (фиг. 19). Поскольку SIGNR1 также является функциональным рецептором для векторных частиц ID-VP02, эти данные привели авторов настоящего изобретения к тому, чтобы оценить, могут ли векторные частицы ID-VP02 быть нацелены специфически на ДК мыши *in vivo*.

Пример 20. Векторные частицы ID-VP02 нацелены на ДК дренирующих лимфатических узлов *in vivo*

Для того чтобы определить, может ли быть детектирован продукт трансгена, кодированного лентивирусной векторной частицей, псевдотипированной с гликопротеином E2 вируса Синдбис в ДК после прямого введения, частицы, кодирующие GFP или нефлуоресцентный белок, являющийся отрицательным контролем, вводили в подушечку стопы правой лапы мыши-реципиента линии BALB/c.

Материалы и способы

Трансдукция ID-VP02-GFP *in vivo*.

Мышам линии BALB/c (n=15/группа) вводили подкожно в подушечку лапы с помощью инъекции 3×10^{10} геномов векторных частиц ID-VP02, кодирующих GFP, контрольных частиц, кодирующих NY-ESO-1 или ничего не вводили. Через четыре дня дренирующие подколенные или недренирующие шейные лимфатические узлы объединяли в пул от 5 мышей (3 пула на группу лечения) и живыми (L/D синглетные события (L/D NIR⁻, SSH=SSA) анализировали на наличие GFP. Фенотип клеток GFP⁺ определяли совместным окрашиванием с анти-мышинным CD11c-PE-Cy7 (eBioscience), MHC-II-Pacific Blue (eBioscience), SIGNR5-PE (eBioscience) и SIGNR1-APC (eBioscience).

Результаты

Через четыре дня после введения путем инъекции векторных частиц ID-VP02, кодирующих GFP, дренирующие подколенные или недренирующие шейные лимфатические узлы от 5 мышей объединяли в пул (3 пула на группу лечения) и анализировали на экспрессию GFP. Инъекция векторных частиц ID-VP02, кодирующих GFP, но не нефлуоресцентный контрольный белок, приводила к детекции клеток GFP⁺ в дренирующем подколенном лимфоузле, но не в дистальном лимфоузле (фиг. 20A). При дальнейшем анализе поверхностного маркера, около 90% трансдуцированных клеток были идентифицированы как ДК, на что указывает экспрессия CD11c и MHC-II (фиг. 20B), и более одной трети этих GFP⁺ ДК были SIGNR1⁺ (фиг. 20C), поддерживая вероятную роль этого рецептора в трансдукции ДК мыши *in vivo*.

Пример 21. ДНК векторной частицы ID-VP02 имеет ограниченное биораопределение

В то время как анализ клеток лимфатических узлов согласуется со специфическим таргетингом мышинных ДК *in vivo*, выполнялись исследования биораспределения, чтобы установить, могут ли быть

детектированы события трансдукции в других, особенно нелимфоидных тканях и для того, чтобы охарактеризовать кинетики клиренса в местах положительной ткани.

Материалы и способы

Биораспределение вектора

Мыши C57BL/6 ($n=3$ /группа) получали подкожно в основание хвоста 3×10^{10} геномов ID-VP02, кодирующих полиэпитопный конструктор LV1b. Наличие обратно транскрибированной векторной ДНК анализировали с помощью количественной ПЦР через 1, 4, 8, 21 или 42 дня после инъекции в следующих тканях: место инъекции (основание хвоста), селезенка, печень, сердце, яичники, головной мозг и дренирующие (паховые) и недренирующие (шейные) лимфатические узлы. Ткани были обработаны в пробирках Fastprep Lysing Matrix D с использованием гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, Санта-Ана, Калифорния), и геномную ДНК выделяли из гомогенатов с использованием набора Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Валенсия, Калифорния). Элюированную ДНК (200 нг на образец) анализировали с помощью количественной ПЦР в четырех повторностях с использованием EXPRESS qPCR Supermix Universal (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) и набором праймер/зонд, предназначенным для амплификации целевой последовательности из 85-п.о. в кассете LV1b. Все реакции проводили с использованием амплификатора Bio-Rad CFX384 и анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния).

Количество копий векторной ДНК рассчитывали со ссылкой на стандартную кривую, состоящую из плазмидной ДНК, содержащей целевые последовательности, разведенные сверх 7-кратного логарифмического диапазона (10^1 копий - 10^7 копий).

Результаты

Векторные частицы ID-VP02, кодирующие антигенный конструктор полиэпитопной модели, обозначенный как LV1b, использовали для определения биораспределения указанных частиц. После инъекции вектора, наличие обратно транскрибированных векторных геномов (векторной ДНК) может быть измерено с помощью количественной ПЦР с использованием набора праймеров и зонда, специфичных для кассеты LV1b. Мышам вводили $2,8 \times 10^{10}$ геномов псевдотипированных векторных частиц-LV1b в виде однократной подкожной инъекции в основание хвоста. В течение промежутка времени между 1 и 42 днем после инъекции проводили количественное определение векторной ДНК в месте инъекции (основание хвоста), дренирующих (паховых) и не-дренирующих (шейных) лимфатических узлах, селезенке, сердце, печени, головном мозге и яичниках. В ранних временных точках после введения, векторную ДНК детектировали исключительно в месте инъекции и в дренирующих лимфатических узлах. Векторный сигнал в этих тканях уменьшался с течением времени, при этом становился не определяемым количественно сигналом к 8 дню в дренирующем лимфатическом узле и сигналом чуть выше предела количественного определения (ПКО; 10 копий) на 42 день в месте инъекции (фиг. 21). Эти результаты показывают, что рассредоточение векторных частиц ID-VP02 вне места инъекции ограничено дренирующим лимфатическим узлом, где гипотетически будет происходить его биологическая активность, а в течение трех недель наблюдался клиренс более 99% векторной ДНК.

Пример 22. Векторные частицы ID-VP02 индуцируют полифункциональные первичные и вторичные ответы Т-клеток CD8

Следующие эксперименты были проведены для измерения способности лентивирусных векторных частиц, псевдотипированных с гликопротеином E2 вируса Синдбис, вызывать антигенспецифический иммунный ответ *in vivo*.

Материалы и способы

Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ВОЦ)

Селезенки гомогенизировали путем отжимания через нейлоновый фильтр 70 мкм. Эритроциты лизировали с помощью гипотонического шока посредством короткой инкубации в ледяной ультрафильтрованной воде с последующим немедленным изотоническим восстановлением с 10-кратным PBS. Для анализа цитокинов клетки стимулировали в 96-лунках с пептидами в концентрации 1 мкг/мл на пептид в полной среде RPMI (10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM β -меркаптоэтанол и L-глутамин) в течение 5 часов при 37°C, 5% CO₂. Пептиды, включая OVA₂₅₇ (SIINFELK) (SEQ ID NO: 24), LCMV GP₃₃ (KAVYNFATM) (SEQ ID NO: 66), AH1 (SPSYVYHQF) (SEQ ID NO: 67), и AH1A5 (SPSYAYNHQF) (SEQ ID NO: 25) были произведены с 95% чистотой компанией AnaSpec (Фримонт, Калифорния). В некоторых экспериментах, как уже отмечалось выше, антимышиный CD107a-PerCP-eF710 (eBioscience) был включен в коктейль для стимуляции, чтобы захватить смещенный CD107a на поверхности дегранулирующих Т-клеток. После стимуляции

окрашивание поверхности проводили в буфере FACS (PBS, 1% FCS, 2 mM EDTA, 0,01% азид натрия) в присутствии антитела 2.4G2, блокирующего FcR, и набора для окрашивания LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (L/D NIR, Invitrogen). Антитела, используемые для окрашивания поверхности в экспериментах *in vivo* включали антимышиное CD4-PerCP-Cy5.5 (eBioscience) или CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience), CD8-Pacific Blue (eBioscience) и B220-V500 (BD). После окрашивания поверхности клетки фиксировали Cytofix® (BD) и хранили при температуре 4°C в течение ночи в буфере FACS. Затем клетки пер-

меабилizовали буфером Perm/Wash™ (BD), содержащим 5% крысиную сыворотку (Sigma Aldrich). Антитела для внутриклеточного окрашивания разводили буфером Perm/Wash™, содержащим 5% крысиную сыворотку и добавляли в пермеабилizованные клетки. Антитела включали антимышиное TNF- α -FITC (eBioscience), IFN- γ -PE (eBioscience) и IL-2-APC (eBioscience). Клетки дважды промывали буфером Perm/Wash™ и ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с помощью 3-лазерного проточного цитометра LSRFortessa с пробоотборником с высокой пропускной способностью (BD). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar, Ашленд, Орегон). Жизнеспособные Т-клетки CD8 подвергали селекции следующим образом: лимфоциты (FSC^{int}, SSC^{lo}), единичные клетки (SSC-A=SSC-H), живые (L/D NIR^{lo}), B220⁻ CD4⁻ CD8⁺. Селекции цитокинов были основаны на 99,9 процентиле (0,1% положительных событий в нестимулированных клетках), и селекция CD107a была основана на 99 процентиле.

Результаты

Для оценки иммунологической активности векторных частиц ID-VP02 *in vivo*, мышам линии C57BL/6 вводили подкожно диапазон доз вектора, кодирующего полноразмерный куриный овальбумин (ID-VP02-OVA) и измеряли OVA₂₅₇-специфичный ответ Т-клеток CD8 в селезенке при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов (ВОЦ) (фиг. 22А). Частота эффекторов IFN- γ ⁺ между Т-клетками CD8 селезенки находилась в диапазоне в среднем от около 15% при дозе $7,0 \times 10^{10}$ геномов до около 1% при дозе $2,7 \times 10^8$ геномов, что указывает на то, что ID-VP02 индуцирует ответы Т-клеток CD8 зависимым от дозы образом по меньшей мере в 2-кратном логарифмическом диапазоне доз.

Для решения вопроса, индуцирует ли примирование с векторными частицами ID-VP02 Т-клетки памяти, которые могут быть выведены посредством введения ID-VP02 как гомологичного буста, животных примировали со средним диапазоном доз $1,0 \times 10^{10}$ геномов, а затем увеличивали эквивалентной дозой через 35 дней после начала. В разные временные точки после примирования и буста, ответ Т-клеток CD8 измеряли посредством ВОЦ. Посредством анализа частоты FN- γ ⁺ Т-клеток CD8 было обнаружено, что бустинг ID-VP02-OVA индуцировал OVA₂₅₇-специфический повторный ответ, который был быстрее и более чем вдвое большей величины в сравнении с первичным ответом (фиг. 22В). Эти данные указывают на то, что применение ID-VP02 не ограничивается однократным введением для вектор-специфического иммунитета, что, как известно, является проблемой для других вирусных векторов, таких как векторы на основе аденовирусов.

В дополнение к окрашиванию IFN- γ , качество первичных и вторичных ответов Т-клеток CD8 анализировали с помощью одновременного окрашивания двух дополнительных цитокинов, TNF- α и IL-2, а также поверхностной транслокации CD107a, коррелята цитотоксической активности. Как после примирования, так и после буста, большая часть отвечающих Т-клеток CD8 имели многофункциональный фенотип, о чем свидетельствует выявление CD107a, TNF- α и IL-2 (фиг. 22С, D). Примечательно, что через 35 дней после буста, по сути 100% IFN- γ ⁺ клеток были CD107a⁺, большая часть также экспрессировала TNF- α , и значительная часть этих "тройных положительных" клеток также вырабатывала IL-2, что указывает на образование Т-клеток памяти с высоким функциональным качеством.

Маркеры KLRG1 и CD127 при измерении около пика вирус-специфического ответа Т-клеток CD8, были связаны с судьбой короткоживущих эффекторных клеток (SLEC) и клеток-предшественников памяти (МРЕС), соответственно. Как было отмечено при инфицировании LCMV, когда фенотип антиген-специфических H-2K^b-OVA₂₅₇ мультимер-связывающих Т-клеток CD8 анализировали на 9 день после иммунизации, фракция клеток была поляризована в фенотип KLRG1⁺ CD127⁻ SLEC или KLRG1⁻ CD127⁺ МРЕС (фиг. 22Е). Интересно, что через 35 дней после иммунизации примирования и буста, в то время как большая часть клеток имела фенотип памяти CD127⁺, они примерно делились поровну между популяциями KLRG1⁺ и KLRG1⁻, оба из которых, как сообщается, повышали потенциал вызова памяти SLEC.

Пример 23.

Т-клетки памяти CD8, индуцированные лентивирусными векторными частицами, псевдотипированными с гликопротеином E2 вируса Синдбис, развивают и демонстрируют противовирусную функцию.

Чтобы непосредственно оценить функцию Т-клеток памяти CD8, вызванную иммунизацией SINVar1, использовали кассету альтернативного антигена, называемого LV1b, который кодирует пептидные последовательности как минимальную OVA₂₅₇, так и LCMV GP₃₃, два устойчивых H-2Kb-ограниченных эпитопа.

Материалы и способы

МНС-I мультимер и анализ фенотипа памяти

Спленоциты, полученные, как описано выше, окрашивали H-2K^b-OVA₂₅₇ пентамерами МНС-I (ProImmune, Оксфорд, Великобритания) в буфере FACS при комнатной температуре в течение 10 минут в присутствии антитела 2-4G2. Клетки промывали один раз и окрашивали поверхностными антителами плюс L/D NIR в течение 20 мин на льду. Антитела включали CD127-FITC, CD44-PerCP-Cy5.5, KLRG1-APC, CD8-Alexa Fluor 700 (все от компании eBioscience) и B220-V500 (BD). Клетки промывали, фикси-

ровали с помощью Cytofix® и анализировали как описано выше. В жизнеспособной популяции Т-клеток CD8, события CD44^{hi} H-2K^b-OVA₂₅₇ пентамер⁺, отобранные на основе 99,9 процентиля у неиммунизированных мышей, были проанализированы на экспрессию KLRG1 и CD127.

Испытание вирусом осповакцины

Мышей линии C57BL/6 иммунизировали подкожно в основание хвоста на 0 день диапазоном доз ID-VP02, кодирующих LV1b, полиэпитопным конструктором, содержащим OVA₂₅₇ (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 24) и LCMV GP33 (KAVYNFATM) (SEQ ID NO: 66) H-2K^b-ограниченный эпитоп или носителем HBSS. Через пять недель мышей подвергали испытанию посредством внутрибрюшинного введения 1×10^7 TCID₅₀ рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего OVA (rVV-OVA), 1E7 TCID₅₀ дикого типа вируса осповакцины (VV-WT) или носителя HBSS. Через пять дней после испытания селезенки собирали для OVA₂₅₇- и GP₃₃-специфического БОЦ как описано выше, яичники собирали для количественного определения вирусной нагрузки с помощью анализа TCID₅₀.

Результаты

Как схематично представлено на фиг. 23А, через 35 дней после иммунизации ID-VP02-LV1b, у мышей, которых подвергали испытанию введением рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего OVA (rVV-OVA), но не дикого типа вируса осповакцины (VV-WT) было продемонстрировано значительное распространение OVA₂₅₇-специфических Т-клеток CD8 (фиг. 23В,С), что указывает на то, что эти клетки памяти были вновь выведены антиген-специфическим образом. Кроме того, rVV-OVA не распространяли GP₃₃-специфические клетки памяти (фиг. 23В), подтверждая необходимость в антиген-специфичности у того же животного. В соответствии с зависимой от дозы индукцией Т-клеток CD8, которые откликнулись на инфицирование, было отмечено явное зависимое от дозы снижение вирусной нагрузки rVV-OVA в яичниках инфицированных мышей (фиг. 23D). Важно отметить, что единственной антигенной последовательностью, разделяемой между антигенным конструктором LV1b и штаммом испытания rVV-OVA был эпитоп SIINFEKL МНС класса I, что указывает на то, что защита опосредовалась Т-клетками CD8. Подтверждая, что защита была действительно антигенспецифичной, иммунизация не оказывала влияние на инфицирование VV-WT.

Пример 24. Иммунизация SINVar1 обеспечивает как профилактическую, так и терапевтическую противоопухолевую эффективность

Опухолевая клеточная линия CT26 получена из спонтанного рака толстой кишки у мышей BALB/c. Эндогенный эпитоп, который может опосредовать отторжение имплантированных опухолей CT26, представляет собой пептид АН1. В то время как взаимодействие МНС-TCR является относительно слабым с эпитопом АН1, измененный пептидный лиганд АН1А5 может стабилизировать это взаимодействие, что приводит к большему распространению Т-клеток CD8 и противоопухолевым ответам. Для создания SINVar1, кодирующего этот эпитоп, была сгенерирована антигенная кассета, в которой в полноразмерную последовательность OVA была вставлена последовательность АН1А5 (OVA-АН1А5), как сообщалось ранее. Brockstedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101(38), 13832 (2004).

Материалы и способы

In vivo анализ цитотоксичности

Мышей линии BALB/c (3 на группу) иммунизировали подкожно в основание хвоста ID-VP02, кодирующим OVA-АН1А5. Двенадцать дней спустя, меченные красителем, инкубированные с пептидом клетки-мишени были введены внутривенно через ретроорбитальную пазуху иммунизированных и необработанных контрольных мышей. Клетки-мишени получали из наивных спленоцитов путем лизирования эритроцитов с помощью гипотонического шока, а затем разделения клеток на три популяции, которые инкубировали с 1 мкг/мл пептидов АН1 (SPSYVYHQF) (SEQ ID NO: 67), АН1А5 (SPSYAYHQF) (SEQ ID NO: 25) или отрицательным контролем NY-ESO-181-88 (RGPE SRL) (SEQ ID NO: 68). Клетки промывали, а затем метили 2 мкМ CFSE (Invitrogen) плюс одной из трех концентраций Cell Trace Violet (Invitrogen) : 2 мкМ, 0,2 мкМ или 0,02 мкМ. Клетки-мишени были объединены в соотношении 1:1:1 и всего 5×10^6 клеток было введено реципиенту. На следующий день отбирали селезенки, и относительное восстановление каждой популяции сравнивали между наивным и иммунизированными мышами, чтобы рассчитать специфическое уничтожение, как описано ранее. Wonderlich et al., Curr. Protoc. Immunol. Chapter 3, Unit (2006).

Испытание опухолевой линией CT26

Для профилактических экспериментов мышей линии BALB/c (10 на группу) иммунизировали подкожно в основание хвоста ID-VP02, кодирующим OVA-АН1А5, антиген, который содержит указанный МНС-I-ограничивающий отторжение эпитоп для опухолевых клеток CT26. Через четыре недели, иммунизированным и необработанным контрольным мышам с помощью инъекции вводили подкожно 8×10^4 клеток опухоли CT26 в правый бок. Рост опухоли контролировали три раза в неделю и мышей умерщвляли, когда размер опухоли превышал 100 мм². Эксперименты для исследования терапевтического режима ID-VP02 проводились так же, за исключением того, что иммунизация ID-VP02 была отложена до четырех дней после имплантации опухоли.

Результаты

При иммунизации мышей линии BALB/c ID-VP02, кодирующими OVA-AH1A5, авторы настоящего изобретения наблюдали зависимое от дозы индуцирование многофункциональных AH1A5-специфических Т-клеток CD8, примерно половина из которых перекрестно реагирует с эндогенной последовательностью AH1 (фиг. 24A). Способность ID-VP02 индуцировать приобретение цитолитической способности Т-клетками CD8 непосредственно проанализированы в анализе цитотоксичности *in vivo*. Три популяции клеток-мишеней спленоцитов одновременно метили CFSE плюс различными концентрациями Cell Tracer Violet, затем инкубировали с пептидами AH1, AH1A5 или отрицательным контролем. Клетки-мишени смешивали в соотношении 1:1:1, затем совместно вводили мышам-реципиентам, иммунизированным на 12 дней раньше ID-VP02 или тем, которых оставляли необработанными. Через 1 день относительное восстановление инкубированных с AH1 и AH1A5 мишеней было снижено у мышей, иммунизированных ID-VP02, с уровнями специфического уничтожения более 90% против AH1A5 и около 25% против AH1 (фиг. 24B), что указывает на то, что ID-VP02 индуцирует функциональные цитотоксические Т-клетки CD8 против иммунизирующего антигена.

В качестве первого исследования противоопухолевой эффективности мышей иммунизировали подкожно ID-VP02-OVA-AH1A5 или носителем, через 28 дней проводили испытание с опухолевыми клетками линии CT26, которые имплантировали в бок. В то время как все контрольные мыши имели летальный рост опухоли ($>100 \text{ мм}^2$) к 21 дню, 70% мышей, иммунизированных ID-VP02 смогли отторгнуть имплантированные опухоли, и эти выжившие мыши были без опухоли, по меньшей мере в течение периода 60 дней (фиг. 24C). Эти выводы были расширены посредством применения ID-VP02 в качестве терапии ранее имплантированных опухолей CT26. В этой модели опухолям предоставляли возможность роста в течение 5 дней, затем животным вводили ID-VP02-OVA-AH1A5 или контрольный носитель. Как и в профилактических экспериментах все контрольные животные поддавались росту опухоли в течение около трех недель (фиг. 24D). В отличие от этого все мыши, получившие ID-VP02, продемонстрировали влияние на прогрессирование опухоли, начиная от задержки кинетики роста до полного отторжения. В иммунизированной группе опухоли либо не вырастали до пальпируемого размера (2/10) или полностью регрессировали (3/10), приводя к 50% мышей, у которых не было опухоли, по меньшей мере в течение периода 60 дней. Эти данные показывают, что ID-VP02 может оказывать цитотоксическую противоопухолевую активность как в профилактических, так и в терапевтических условиях, поддерживая оценку ID-VP02 в качестве средства терапии рака у людей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, включающий:
 - (а) культивирование в питательной среде, содержащей кифунозин, упаковывающей вирус клетки, включающей:
 - (1) геном лентивирусного вектора, содержащий полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген,
 - (2) полинуклеотид, кодирующий гликопротеин оболочки E2 вируса Синдбис, который преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN,
 - (3) полинуклеотид, кодирующий белок Vpx или белок Vpr, сохраняющий ингибирующую активность в отношении SAMHD1; и
 - (б) выделение псевдотипированной лентивирусной векторной частицы, которая преимущественно связывает дендритные клетки, экспрессирующие DC-SIGN,
 где указанные псевдотипированные лентивирусные векторные частицы являются более высокомагнитизированными по сравнению с контрольной композицией из тех же псевдотипированных лентивирусных векторных частиц, полученных в отсутствие кифунозина.
2. Способ по п.1, где указанный экзогенный антиген выбран из NY-ESO-1, MAGE, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, gp100, gp75, mda-7, тирозиназы, белка, связанного с тирозиназой, антигена почечно-клеточной карциномы, 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I, карбоангидразы IX (также известной как G250), HIF-1альфа, HIF-2альфа, VEGF, простатического специфического мембранного антигена (PSMA), простатического специфического антигена (PSA), простатических кислых фосфатаз, шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы (STEAP), NKX3.1, фермента теломеразы, сурвивина, мезотелина, мутированного *ras*, реаранжировки *bcr/abl*, *Her2/neu*, мутированного *p53*, *p53* дикого типа, цитохрома P450 1B1, N-ацетилглюкозаминилтрансферазы-V, белка E6 папилломавируса человека, белка E7 папилломавируса человека, карциноэмбрионального антигена и альфа-фетопротеина.
3. Способ по п.1, где указанный экзогенный антиген выбран из антигена вирусов: HIV, SIV, аденовируса, энтеровируса, коронавируса, калицивируса, вируса чумы плотоядных, вируса Эбола, флавивируса, вируса гепатита, вируса герпеса, вируса инфекционного перитонита, вируса гриппа, вируса лейкемии, вируса Марбург, ортомиксовируса, вируса папилломы, вируса парагриппа, парамиксовируса, парвовируса, пестивируса, пикорнавируса, вируса полиомиелита, вируса оспы, вируса бешенства, реовируса, ретровируса или ротавируса.
4. Способ по любому из пп.1-3, где гликопротеин оболочки E2 вируса Синдбис выбран из группы,

состоящей из гликопротеина E2 вируса Синдбис, который на 90% идентичен SEQ ID NO: 30 [SIN-Var1], в котором (i) остаток 160 гликопротеина E2 отсутствует или представляет собой аминокислоту, отличную от глутаминовой кислоты,

(ii) один или более из остатков 70, 76 или 159 варианта гликопротеина E2 является не основным остатком и

(iii) вариант гликопротеина E2 не является частью гибридного белка с гликопротеином E3 вируса Синдбис или гликопротеина E2 вируса Синдбис, представленного SEQ ID NO:30 [SIN-Var1].

5. Способ по любому из пп.1-4, где белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична SIVmac Vpx [SEQ ID NO: 44], или где белок Vpx содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVmac Vpx (SEQ ID NO: 44), SIVsm Vpx (SEQ ID NO: 45), SIVrgm Vpx (SEQ ID NO: 46) или HIV-2 Vpx (SEQ ID NO: 47), или где белок Vpr содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SIVdeb Vpr (SEQ ID NO: 48) или SIVmus Vpr (SEQ ID NO: 49).

6. Способ по п.1, где геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую второй антиген.

7. Способ по п.6, где первый и второй антиген экспрессируются в виде гибридного белка, который содержит саморасщепляющийся пептид A2 между указанными двумя антигенами, или где первый и второй антиген экспрессируются из двунаправленного промотора.

8. Способ по п.6 или 7, где первый антиген представляет собой NY-ESO-1 и второй антиген представляет собой MAGE-A3.

9. Способ по любому из пп.1-8, где геном лентивирусного вектора дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую стимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF-альфа, B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

10. Способ по п.1, где полинуклеотид, кодирующий экзогенный антиген, кодирует стимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF-альфа, B7.1, B7.2, 4-1BB, лиганда CD40 и индуцируемого лекарственными средствами CD40.

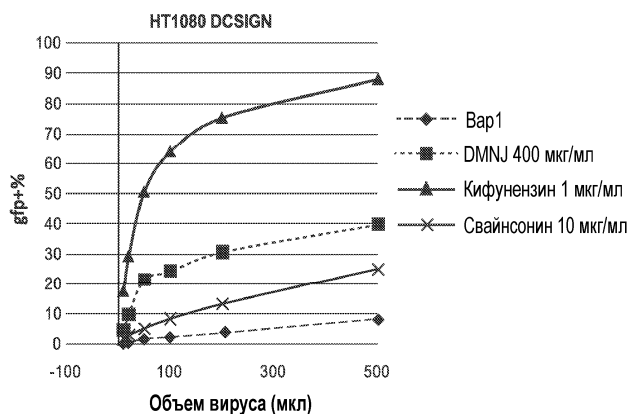
11. Способ по любому из пп.1-10, где кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мкг/мл.

12. Способ по любому из пп.1-10, где кифунензин присутствует в питательной среде в концентрации от приблизительно 0,25 до приблизительно 2 мкг/мл.

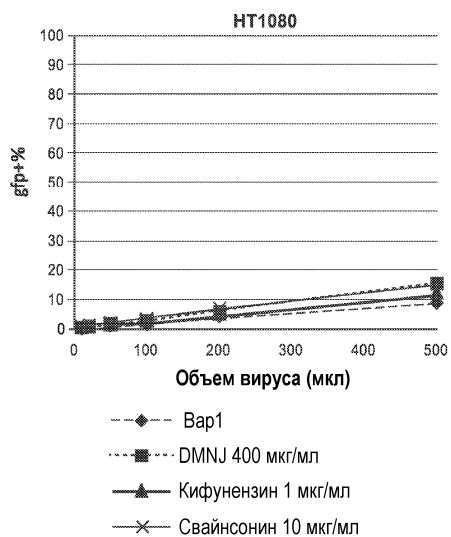
13. Способ по любому из пп.1-12, где упаковывающая вирус клетка также содержит полинуклеотид, который содержит гены gag и pol.

14. Способ по любому из пп.1-12, где упаковывающая вирус клетка дополнительно содержит полинуклеотид, который кодирует белок rev.

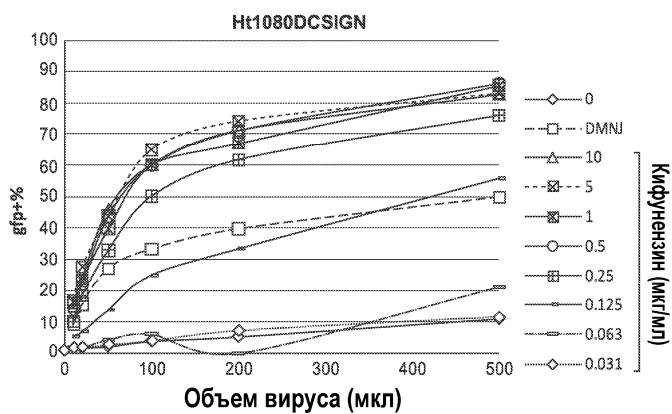
15. Способ по п.13 или 14, где полинуклеотид, содержащий гены gag и pol, не имеет функционального элемента, чувствительного к rev (RRE), и ген pol кодирует неактивный фермент интегразу.



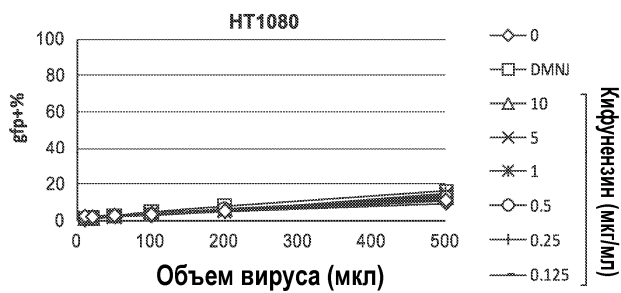
Фиг. 1А



Фиг. 1В

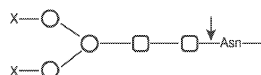


Фиг. 2А



Фиг. 2В

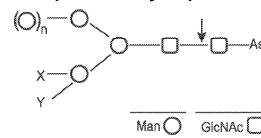
Специфичность субстрата:



PNGaseF:

Расщепляет все N-связанное гликозилирование (Будет направлена на все 4 сайта SinVar1)

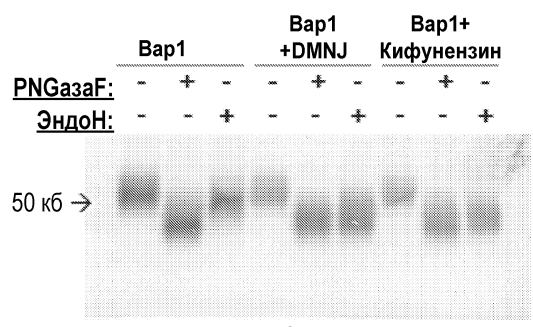
Специфичность субстрата:



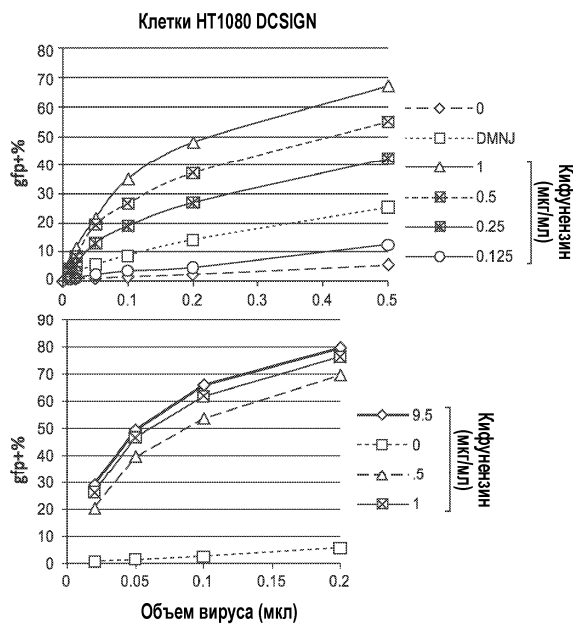
Эндон:

Расщепляет только высокоманнозное N-связанное гликозилирование (Будет направлена на 2/4 сайтов SinVar1)

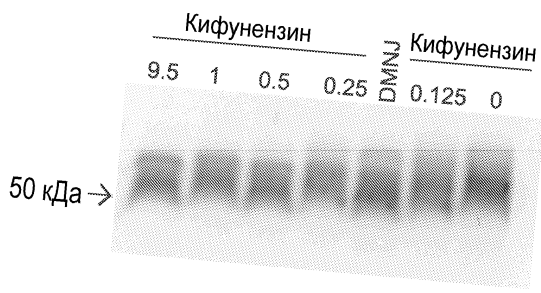
Фиг. 3А



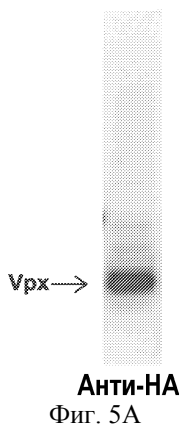
Фиг. 3В

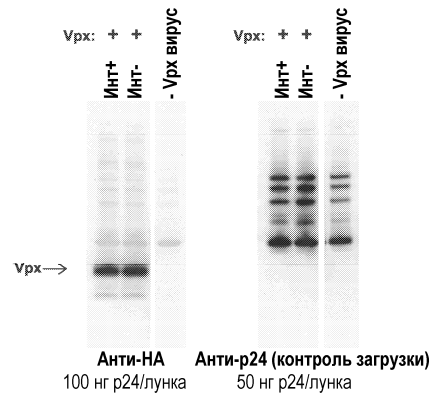


Фиг. 4А

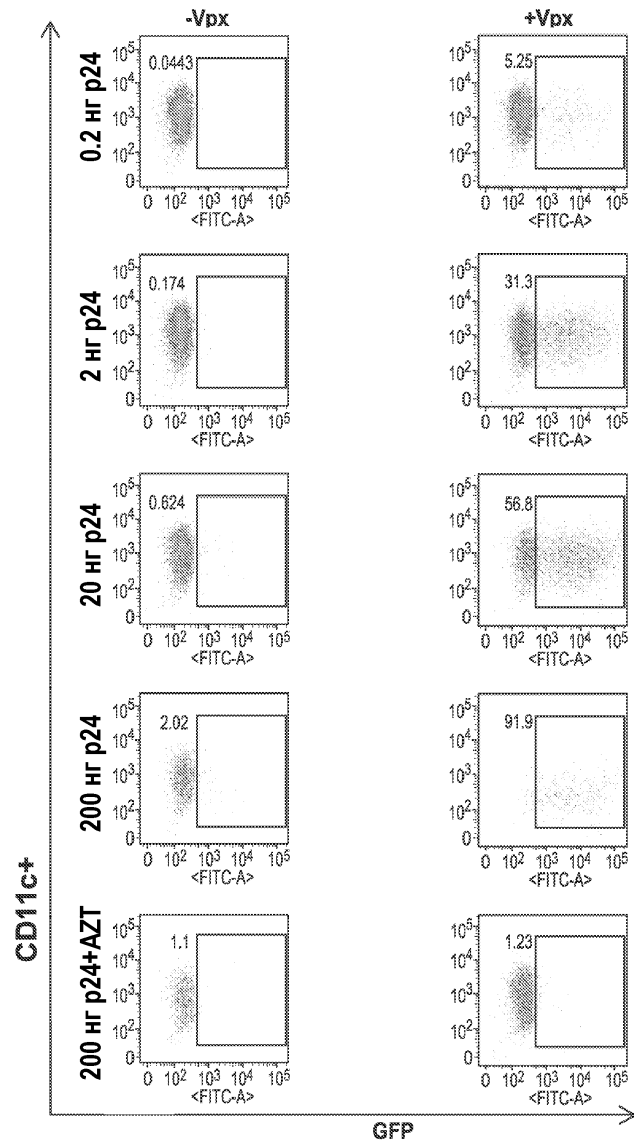


Фиг. 4В

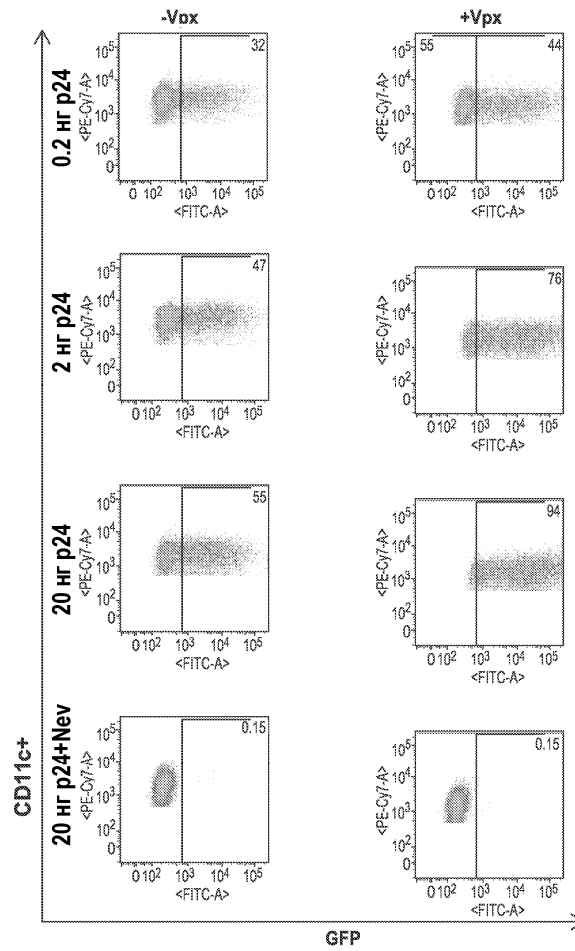




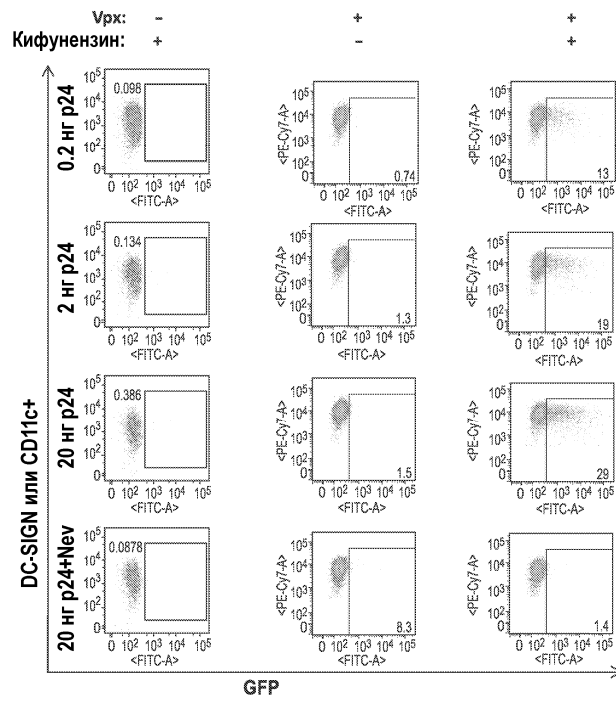
Фиг. 5В



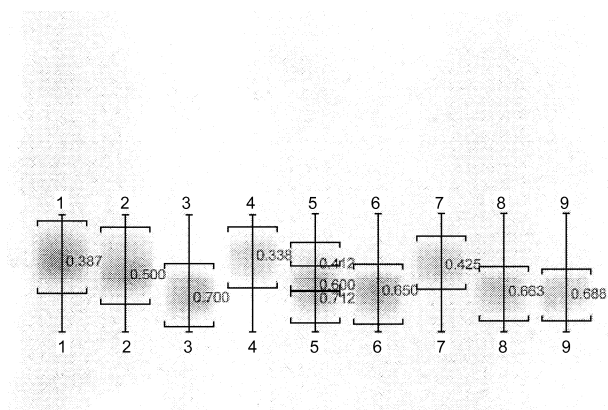
Фиг. 6



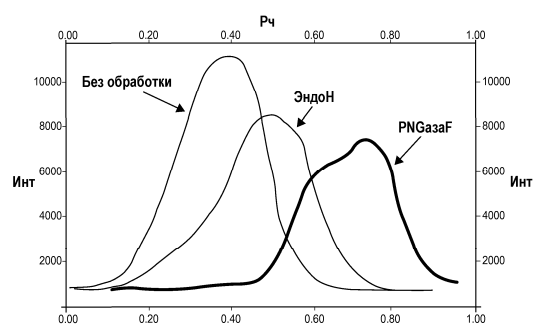
Фиг. 7



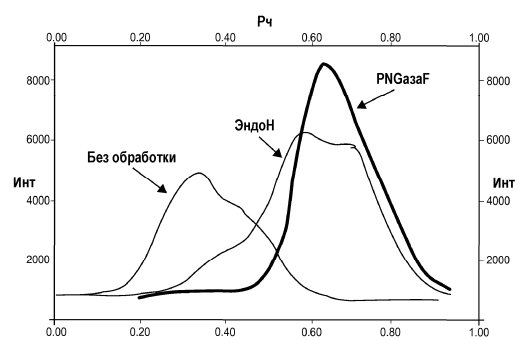
Фиг. 8



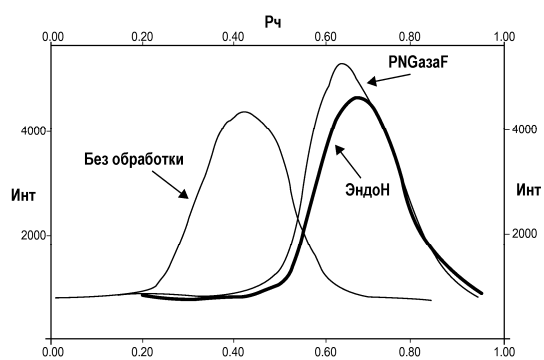
Фиг. 9А



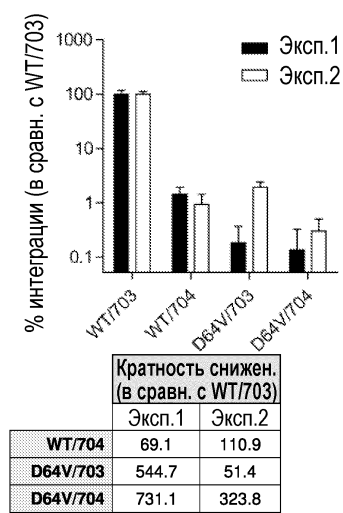
Фиг. 9В



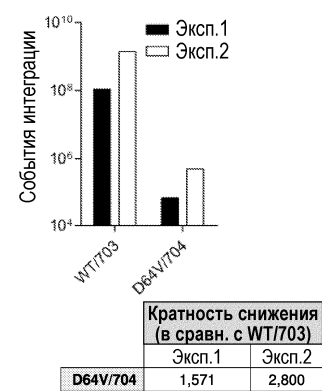
Фиг. 9С



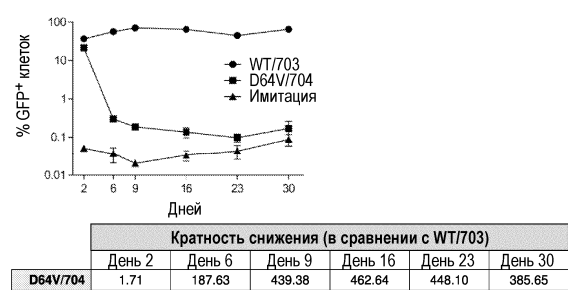
Фиг. 9D



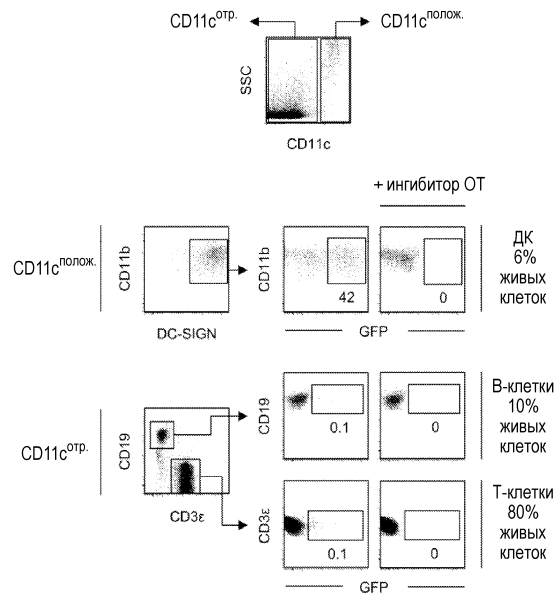
Фиг. 10А



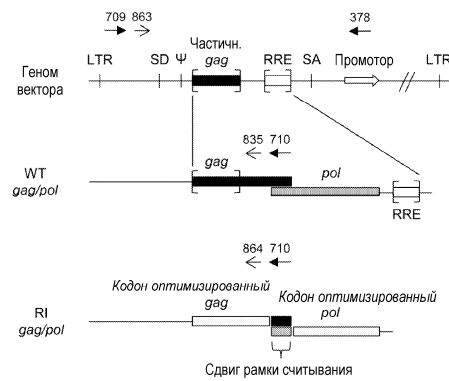
Фиг. 10В



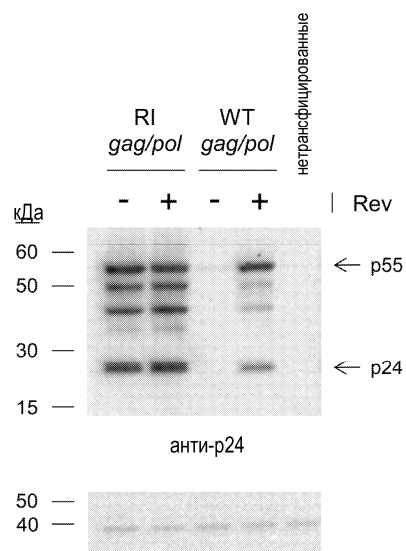
Фиг. 10С



Фиг. 11



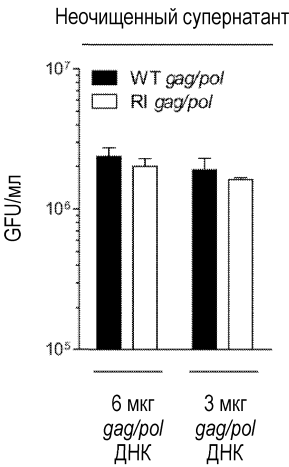
Фиг. 12



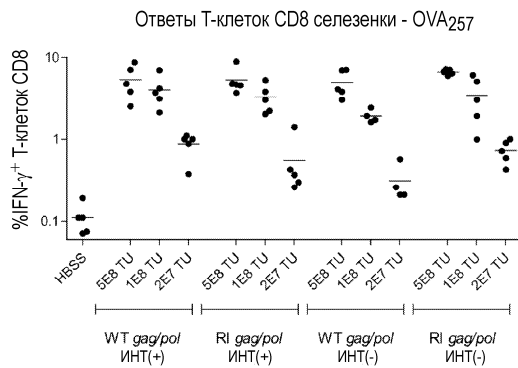
Фиг. 13

	6 мкг <i>gag/pol</i> ДНК		3 мкг <i>gag/pol</i> ДНК	
	WT <i>gag/pol</i>	RI <i>gag/pol</i>	WT <i>gag/pol</i>	RI <i>gag/pol</i>
p24 (нг/мл)	206 +/- 21	235 +/- 6	84 +/- 3	100 +/- 6

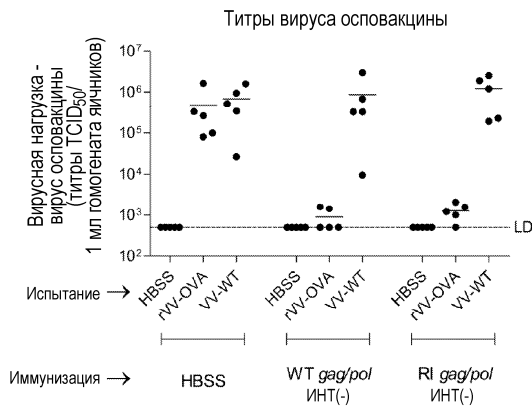
Фиг. 14А



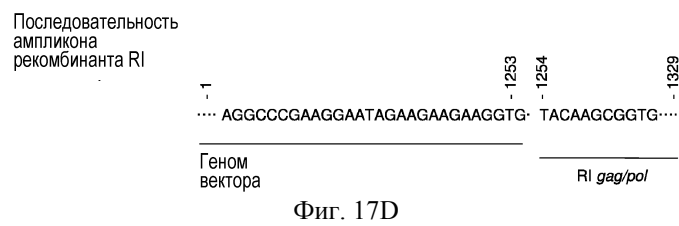
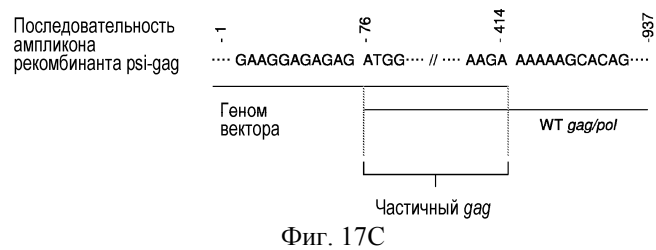
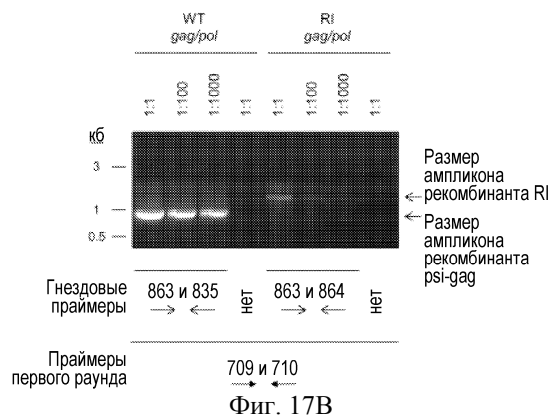
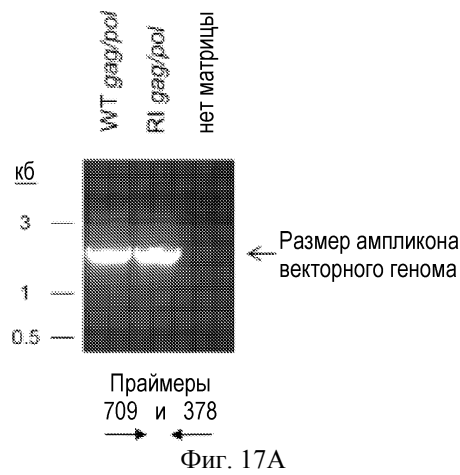
Фиг. 14В

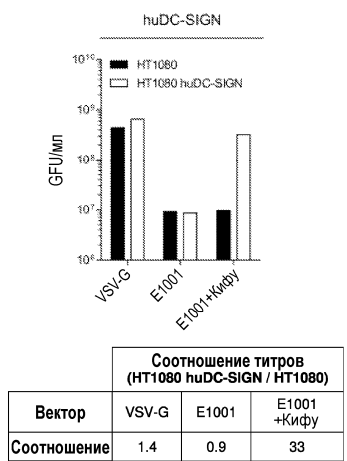


Фиг. 15

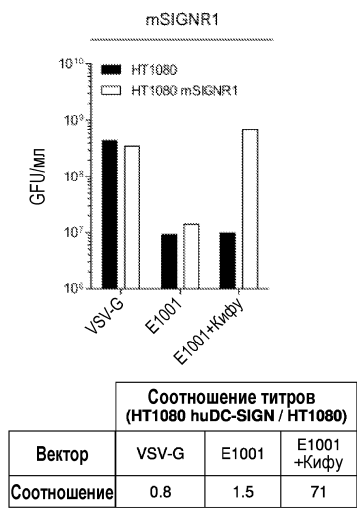


Фиг. 16

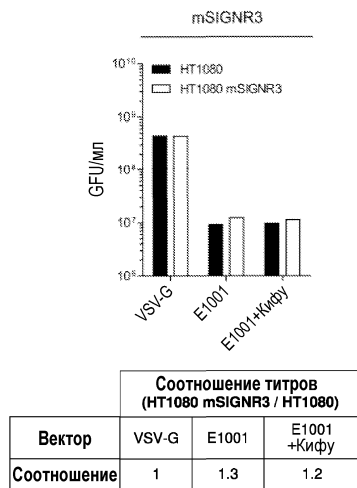




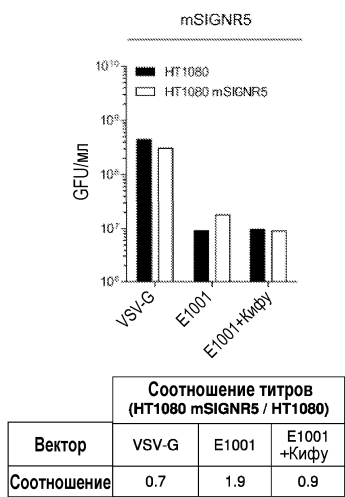
Фиг. 18А



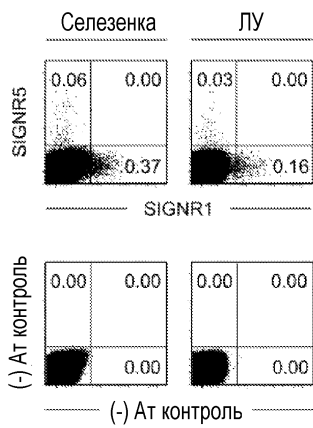
Фиг. 18В



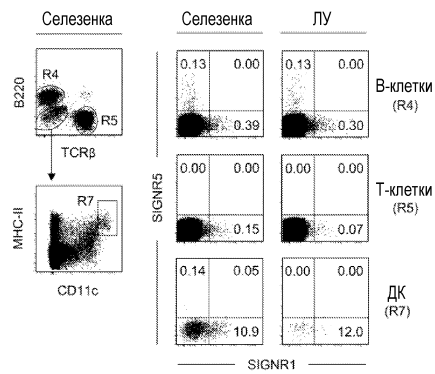
Фиг. 18С



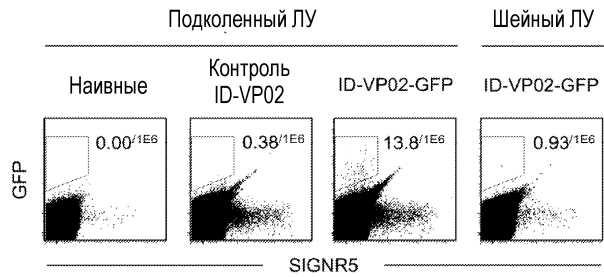
Фиг. 18D



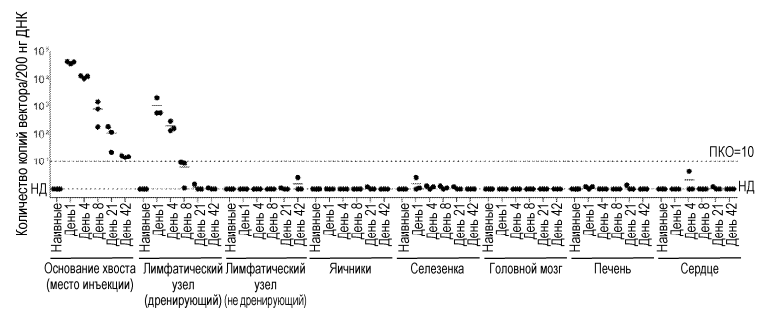
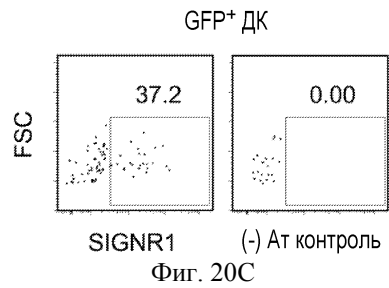
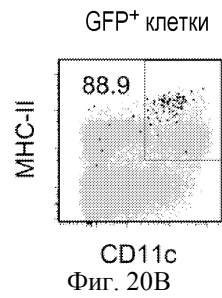
Фиг. 19A



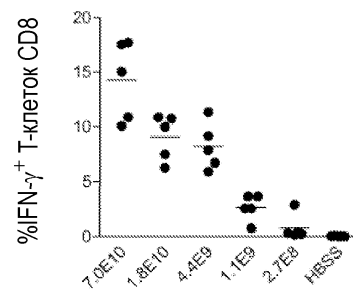
Фиг. 19B



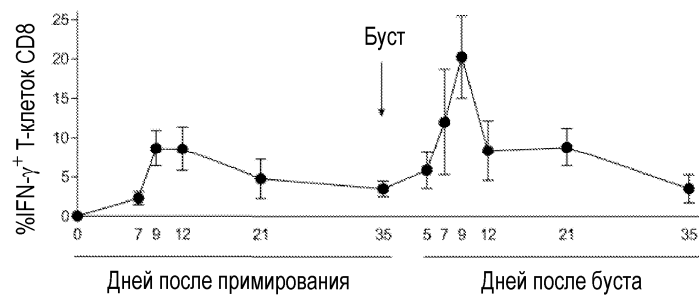
Фиг. 20A



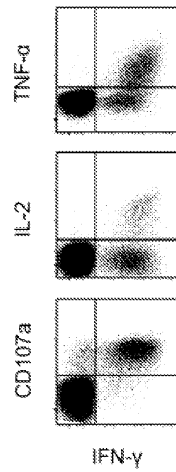
Фиг. 21



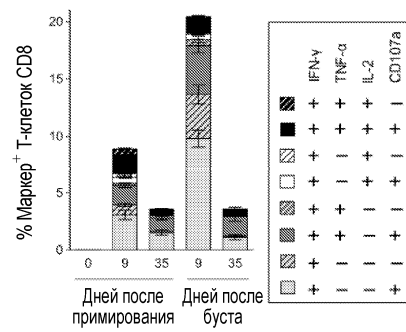
Векторные геномы
Фиг. 22А



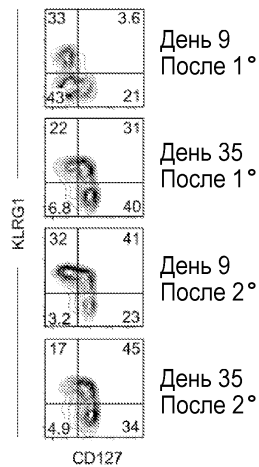
Фиг. 22В



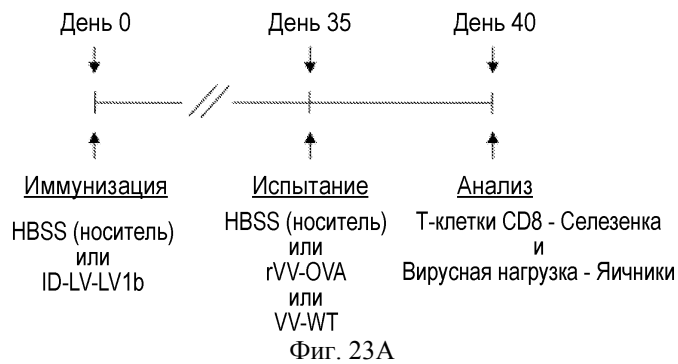
Фиг. 22С



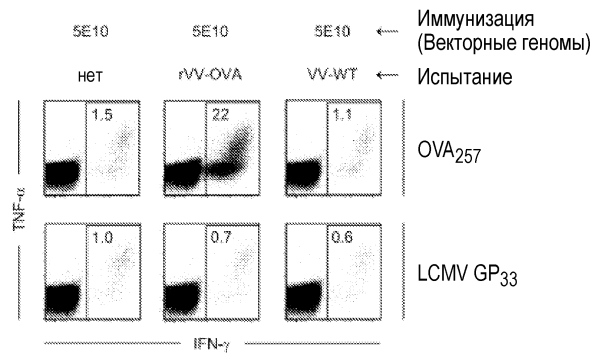
Фиг. 22D



Фиг. 22Е

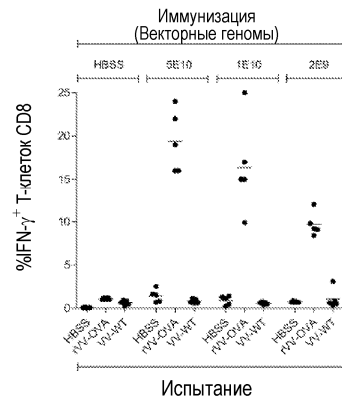


Фиг. 23А

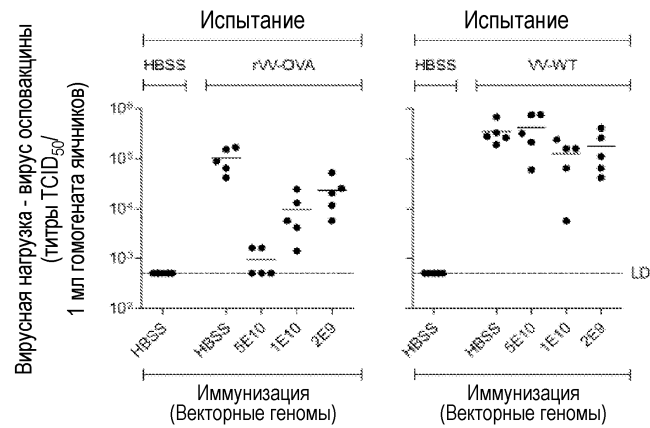


Фиг. 23В

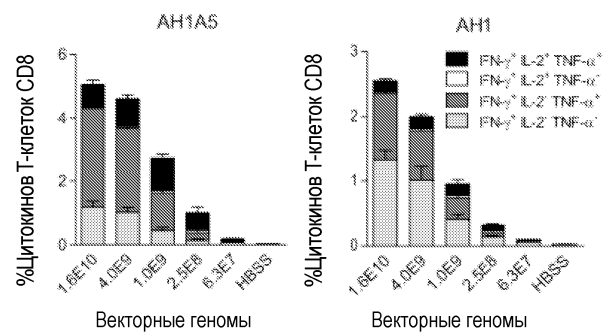
Ответы Т-клеток CD8 селезенки - OVA₂₅₇



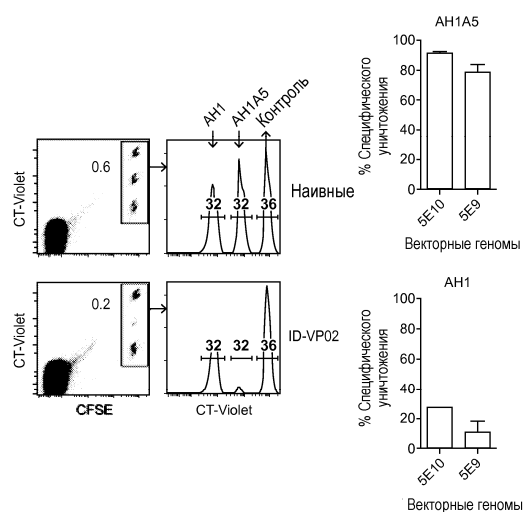
Фиг. 23С



Фиг. 23D



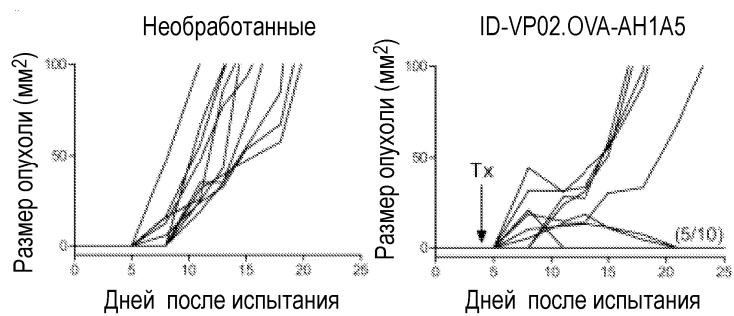
Фиг. 24А



Фиг. 24В



Фиг. 24С



Фиг. 24D

