



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.14

(21) Номер заявки
201790167

(22) Дата подачи заявки
2015.07.16

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)

(54) ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ЧЕЛОВЕКА, СОДЕРЖАЩИЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЙ АНТИГЕН, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ПОЛИНУКЛЕОТИД, КЛЕТКА, КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА (ВАРИАНТЫ)

(31) **62/025,348**

(32) **2014.07.16**

(33) **US**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/US2015/040807**

(87) **WO 2016/011293 2016.01.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОРЕГОН ХЕЛС ЭНД САЙЕНС
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Фрю Клаус, Хансен Скотт Г., Нельсон
Джей, Пикер Луис, Капосио Патриция
(US)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.
(RU)**

(56) WO-A2-2011143650
WO-A2-2012170765
MCGREGOR ET AL.: "Expression of the human cytomegalovirus UL97 gene in a chimeric guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) results in viable virus with increased susceptibility to ganciclovir and maribavir", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 78, no. 3, 14 February 2008 (2008-02-14), pages 250-259, XP022559898, ISSN: 0166-3542, abstract

G. HAHN ET AL.: "Human Cytomegalovirus UL131-128 Genes Are Indispensable for Virus Growth in Endothelial Cells and Virus Transfer to Leukocytes", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 18, 15 September 2004 (2004-09-15), pages 10023-10033, XP055216937, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.78.18.10023-10033.2004, the whole document
NICHOLSON IAIN P. ET AL.: "Properties of virion transactivator proteins encoded by primate cytomegaloviruses", VIROLOGY JOURNAL, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 27 May 2009 (2009-05-27), page 65, XP021059682, ISSN: 1743-422X, DOI: 10.1186/1743-422X-6-65, abstract

J. S. MICHAELSON ET AL.: "RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX", JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 116, no. 2, 15 January 2003 (2003-01-15), pages 345-352, XP055217001, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.00234, abstract

MURPHY E ET AL.: "Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 100, no. 25, 9 December 2003 (2003-12-09), pages 14976-14981, XP002348007, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.2136652100, cited in the application, the whole document

S. R. CANTRELL ET AL.: "Human Cytomegalovirus (HCMV) UL82 Gene Product (pp71) Relieves hDaxx-Mediated Repression of HCMV Replication", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 12, 15 June 2006 (2006-06-15), pages 6188-6191, XP055082252, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.02676-05, introduction; figure 8

(57) Изобретение относится к рекомбинантному вектору-цитомегаловирусу человека (HCMV) для индуцирования иммунного ответа на гетерологичный антиген, содержащему: (1) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген; (2) инактивирующую мутацию в гене UL82 или гене UL78 и (3) активные гены US2, US3, US6, US7, UL97 и UL131A; где рекомбинантный HCMV-вектор имеет происхождение из штамма HCMV TR и где рекомбинантный HCMV-вектор является чувствительным к ганцикловиру. Указанный вектор демонстрирует превосходную генетическую стабильность при пассаже в фибробластах. Кроме этого предложена иммуногенная композиция (варианты) и способ индуцирования иммунного ответа (варианты), использующие указанный HCMV-вектор; а также полинуклеотид, клетка и способ получения HCMV.

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/025348, поданной 16 июля 2014, под названием Цитомегаловирус человека, содержащий экзогенные антигены, описание которой включено в данный документ путем ссылки во всей ее полноте.

Область изобретения

Как правило, область включает платформы для вакцин. Более конкретно, область включает рекомбинантные векторы цитомегаловируса человека, экспрессирующие экзогенный антиген.

Предшествующий уровень техники

Эксперименты на животных показали, что векторные вакцины на основе цитомегаловируса (CMV) уникальны тем, что они: а) вызывают и поддерживают высокие частоты ответов экстралимфоидных Т-клеток (так называемые эффекторный Т-клетки памяти); б) суперинфицируют CMV-положительных хозяев; и с) поддерживают иммуногенность даже когда оказываются дефицитными по распространению от хозяина к хозяину. Кроме того, эксперименты на животных моделях показали, что вакцинные векторы, полученные из CMV животных, индуцируют защитный иммунный ответ против инфекционных заболеваний и рака (US 20080199493, US 20100142823, US 20130136768 и US 20140141038, все они включены в настоящий документ в качестве ссылки). Особенно поразительно то, что векторная вакцина на основе CMV макаки-резуса (RhCMV) против вируса иммунодефицита обезьян (SIV) смогла не только предотвратить СПИД у приматов, кроме человека, но, в конечном счете, вылечить этих животных от SIV (Hansen SG с соавт., Nature 502, 100-104 (2013); включено сюда в качестве ссылки).

Важно использовать ослабленный штамм при разработке цитомегаловирусной вакцины, поскольку неослабленный штамм может передаваться от одного хозяина к другому, и потенциально быть патологическим по меньшей мере для лиц с ослабленным иммунитетом. Ранее ослабленные штаммы CMV человека (HCMV) были не в состоянии а) поддерживать латентную инфекцию (Plotkin SA и Huang ES, J Infect Dis 152, 395-397 (1985); включено сюда в качестве ссылки); б) индуцировать длительный иммунитет (Jacobson MA с соавт., J Clin Virol 35, 332-337 (2006); включено сюда в качестве ссылки); с) повторно инфицировать значительную часть населения, которая была ранее естественно инфицирована HCMV (Heineman TC с соавт., J Infect Dis 193, 1350-1360 (2006), включено сюда в качестве ссылки); или d) производить хронические инфекции (WO 2013/036465; включено сюда в качестве ссылки). Кроме того, клинические штаммы геномов HCMV очень нестабильны *in vitro* при росте в фибробластах, что приводит к адаптациям фибробластов, таким как делеция UL131A. Воздействие таких адаптаций для культивирования тканей для способности выполнять векторные функции *in vivo* в основном неизвестно. В дополнение к необходимости ослабления, для стабилизации *in vitro* и *in vivo*, важно, чтобы эти векторы могли быть произведены с воспроизводимыми результатами. Наиболее устойчивой стратегией ослабления является делеция гена. Тем не менее, это обычно требует получения дополняющих клеточных линий, что трудно достижимо для первичных клеток, используемых для роста цитомегаловируса.

Краткое описание изобретения

В данном документе раскрыты сильно ослабленные, дефицитные по распространению (т.е. дефицитные по распространению от клетки к клетке) векторы, полученные из HCMV-TR3, который является генетически модифицированной версией штамма HCMV TR. Раскрытые здесь векторы устанавливают и поддерживают хронические инфекции, вызывают и поддерживают эффекторную память Т-клеток против гетерологичных антигенов, и повторно заражают CMV-серопозитивных хозяев. Упомянутые векторы содержат гетерологичные антигены, такие как не-CMV патоген-специфические антигены или опухолевые антигены.

В частности, TR3 был разработан, чтобы быть чувствительным к ганцикловиру. В одном примере, это связано с добавлением активного гена UL97 (который мутирован в исходном клиническом изоляте TR3). TR3 был дополнительно разработан, чтобы включать активные гены US2, US3, US6 и US7, которые были удалены в процессе ВАС клонирования исходного клинического изолята TR3. Дополнительные варианты TR3 включают вредную (т.е. дезактивирующую) мутацию в ген UL82, кодирующий pp71, которая может быть названа TR3Δpp71 или, в качестве альтернативы в настоящем документе TR3ΔUL82.

В дальнейших примерах векторов экспрессию гена, кодирующего гетерологичный антиген, может обуславливать промотор UL82 или другой вирусный промотор, такой как промотор UL7, UL38, UL45 или US13. В других примерах, множественные гены, кодирующие гетерологичные антигены, могут быть вставлены вместо UL82 и другого вирусного гена, такого как UL7, UL38, UL45 или US13, таким образом, что вирусный промотор гена обуславливает экспрессию гена гетерологичного антигена.

Также здесь раскрыт способ получения HCMV, в котором отсутствует функциональный белок pp71 (кодируемый геном UL82). Способ включает инфицирование клетки HCMV, где отсутствует функциональный белок pp71, причем клетка содержит siРНК, которая подавляет ген DАХХ. В других воплощениях настоящего изобретения способ включает инфицирование клетки HCMV, где отсутствует функциональный белок pp71, причем экспрессию гена DАХХ в клетке подавляют на уровне белка или РНК с помощью других методик, известных в данной области, например с помощью РНК интерференции (например, нацеливание на микроРНК и нацеливание на малые РНК, образующие шпильки (shРНК)), расщеплением рибозима, регулируемой экспрессией при помощи обусловленного или индуцируемого промото-

ра, экспрессией DAXX-связывающих белков или нацеливанием DAXX или DAXX белковых комплексов для убиквитинирования и деградации. С помощью этих методов HCMV получают эффективно без дополнительной подготовки. Клетка может быть любой клеткой, включая фибробласт человека.

Краткое описание нескольких видов фигур

Некоторые из фигур в данном документе являются более понятными при представлении в цвете, что невозможно в публикациях патентных заявок. Тем не менее, заявители считают, что цветные фигуры являются частью первоначального описания и оставляют за собой право представить здесь цветные варианты фигур в ходе последующей экспертизы.

Фиг. 1А и 1В в совокупности показывают, что HCMV TR превосходны в установлении латентности и в реактивации от латентности (+G-CSF) по сравнению с другими штаммами HCMV. На фиг. 1А представлена схема организации генома клонов HCMV, используемых на фиг. 1В. Геномы HCMV фланкированы концевыми повторами (TRL и TPC, как указано) и внутренними повторами (IRS), которые отделяют уникальную длинную (UL) и уникальную короткую (UL) области. Расположение кассеты BAC в каждой конструкции обозначено областью, обозначенной как В. В US области HCMV TR отсутствуют US2-7 за счет вставки BAC-кассеты. В TRA4 отсутствуют гены UL128-UL150 в дополнение к отсутствию US2-7. Ген UL131A является дефицитным по AD169, но исправлен в AD169 BAD UL131A (Wang и Schenk, 2005, ниже). Toledo имеет инверсию области UL133-128 с делецией в UL128 (Murphy с соавт., 2003, ниже). Фиг. 1В представляет график, обобщающий результаты мышей с нулевым NOD/SCID/IL2R γ (NSG) с привитыми CD34⁺ стволовыми клетками человека и инокулированные внутрибрюшинно фибробластами человека, инфицированными указанными HCMV штаммами. Через четыре недели после инфицирования гемопоэтические стволовые клетки человека были мобилизованы путем обработки гранулоцитарным фактором, стимулирующим колонии (G-CSF), и измерен уровень вирусной нагрузки в печени с помощью количественной ПЦР.

Фиг. 2 является графическим представлением генома HCMV- TR3, показывающим изменения в открытых рамках считывания (ORF), присутствующих в исходном штамме HCMV TR. Для подтверждения чувствительности к ганцикловиру UL97 из HCMV TR заменяли таковым из HCMV AD169. BAC кассету фланкировали сайтами loxP, и после Cre-опосредованного самоудаления, один сайт loxP остается в геноме. Так как в HCMV-TR BAC отсутствуют US2-7, соответствующие гены HCMV AD169 были вставлены. Показаны терминальные повторы (ab и c'a) и внутренние повторы (b'a'c).

На фиг. 3 представлен график, показывающий, что HCMV-TR3, но не HCMV-TR, чувствителен к ганцикловиру (GCV). Остановленные в росте фетальные фибробласты человека MRC-5 инфицировали HCMV TR3, HCMV TB40E и исходным HCMV TR (MOI - 1 КОЕ/клетка), или ложно инфицировали. Там, где указано, клетки обрабатывали возрастающими концентрациями GCV 90 мин после инфицирования до тех пор, пока не наблюдали обширный вирусный цитопатический эффект в необработанном контроле (4 суток после инфицирования). Супернатанты клеточных культур затем исследовали на инфекционность путем стандартного анализа уменьшения бляшек на клетках MRC-5. Число бляшек наносили на график в зависимости от концентрации лекарственного средства и определяли IC₅₀. Значения являются средними для двух независимых определений.

Фиг. 4А и 4В показывают, что HCMV- TR3 неожиданно сохраняет способность инфицировать эндотелиальные клетки и сохранять стабильность генома после многократного пассирования. Фиг. 4А является изображением геля, показывающим следующее: HCMV- TR3 BAC был восстановлен на клетках MRC-5, а затем пассирован 20 раз *in vitro* на первичных фибробластах человека. На пассажах 1, 5, 10, 15 и 20 вирусную ДНК экстрагировали из инфицированных клеток и подвергали анализу расщепления рестриктазами и ПНР секвенированию области UL128-131, области, которая часто подвергается мутациям в результате многократного пассирования (Dargan с соавт., 2010, ниже). Фиг. 4В является графиком, показывающим инфекционность TR3 в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVECs) после многократных пассажей на клетках MRC-5. Очищенный основной штамм вируса был получен на 10 пассаже и использован для инфицирования HUVECs при MOI = 0,5. В то же время, HUVECs также были инфицированы адаптированным в лаборатории штаммом HCMV AD169 в качестве контроля. Супернатанты и клетки собирали на 5, 10, 15 и 20 сутки после инфицирования (pi) и титровали методом бляшек на клетках MRC-5. Увеличение титра с течением времени указывает на то, что HCMV TR3 способна расти на HUVECs, в соответствии с интактной областью UL131A-128, в то время как HCMV AD 169 не растет.

Фиг. 5 является графиком, показывающим, что присутствие UL128-131 не снижает выход бесклеточной HCMV-TR3. Многоступенчатый анализ кривой роста был проведен с использованием MRC-5 клеток, инфицированных при MOI 0,01 HCMV-TR3 и штаммом, идентичным TR3, но с удаленным UL128-131 (HCMVΔUL128-131). Титры инфицированных клеток и надосадочной жидкости измеряли на 2, 5, 10, 15 и 20 сутки после заражения с помощью стандартного анализа бляшек на клетках MRC-5.

Фиг. 6А является набором из двух графиков, показывающих результаты, полученные когда SIVgag под контролем промотора EF1 α был вставлен в геном HCMV- TR3, при использовании мутагенеза BAC, как описано в Hansen SG с соавт., Nat Med 15, 293-299 (2009) (включено сюда в качестве ссылки). Мака-

ки-резусы (RM) серо-положительные по CMV были инокулированы 10^5 бляшкообразующими единицами (БОЕ) HCMV-TR, экспрессирующими SIVgag. Показан % памяти Т-клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), отвечающих на HCMV лизат (ромбы), или перекрывающиеся SIVgag (квадраты) пептиды. Обратите внимание на отсутствие Т-клеток на образцовом CM9 пептиде (круги), что свидетельствует о том, что ответ Т-клеток, индуцированный HCMV, отличается от ответа других векторов, как это описано для RhCMV (Hansen с соавт., Science 2013 ниже). График слева показывает ответы $CD4^+$ Т-клеток. График справа показывает ответы $CD8^+$ Т-клеток.

Фиг. 6B является набором из двух графиков, показывающих ответы HIVgag-специфических Т-клеток в RM, инокулированных HCMV, экспрессирующими HIVgag под контролем промотора UL78 с удаленными UL128-131 (Δ UL128-131 HCMVgag), или HCMV, экспрессирующими HIVgag под контролем промотора UL82 с интактным UL128-131 (Δ pp71 HCMVgag). Когда 10^6 БОЕ вектора Δ UL128-131 инокулировали в RM, никакого ответа клеток $CD4^+$ или $CD8^+$ Т на HIVgag не наблюдали. В отличие от этого наблюдали ответы HIVgag-специфических Т-клеток с векторами Δ pp71 HCMVgag. График слева показывает ответы $CD4^+$ Т-клеток, график справа показывает ответы $CD8^+$ Т-клеток.

На фиг. 7A показан чертеж, иллюстрирующий, как во время инфекции диким типом HCMV, белок pp71 оболочки расщепляет клеточный корепрессор DAXX. При отсутствии pp71 DAXX подавляет экспрессию вирусного гена и, таким образом, литическую репликацию. Тем не менее, экспрессия вирусного гена может протекать нормально даже при отсутствии pp71, когда мРНК DAXX удаляется путем выбивания гена с помощью DAXX-специфической siPHK.

Фиг. 7B является графиком MRC-5 клеток, трансфицированных DAXX-специфической siPHK и инфицированных 24 ч после трансфекции с TR3 и TR3 Δ pp71 HIVgag при MOI=0,05. В указанные моменты времени после инфицирования, клетки и супернатанты собирали отдельно и титровали на дополнительных клетках, экспрессирующих pp71.

Фиг. 8A и 8B представляют графики, показывающие, что HCMVTR3 Δ UL82 (Δ pp71) устанавливает время задержки у гуманизированных мышей, но дефицитен по способности реактивизироваться и распространяться. Для обоих графиков, мыши с нулевым NOD/SCID/IL2R γ (NSG) с привитыми стволовыми клетками $CD34^+$ были инокулированы внутрибрюшинно фибробластами, зараженными вирусом TR3 или TR3 Δ UL82. Через четыре недели после инфицирования, гемопоэтические стволовые клетки человека были мобилизованы путем обработки G-CSF, и измерен уровень вирусной нагрузки в костном мозге (TR3, фиг. 8A) и печени (TR3 Δ UL82, фиг. 8B) с помощью количественной ПНП.

Фиг. 9 является набором графиков, показывающих, что HCMV-TR3 с удаленным pp71, экспрессирующий HIVgag, сохраняет способность индуцировать HIVgag-специфические эффекторные Т-клетки памяти у приматов, кроме человека. HCMV, экспрессирующий HIVgag, но где отсутствует pp71, был сконструирован путем замещения гена UL82 (pp71) на HIVgag. Полученный вирус был восстановлен с помощью DAXX siPHK. 10^6 или 10^5 БОЕ полученного вируса инокулировали подкожно в RM и ответ Т-клеток на HIVgag определяли в указанные дни с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов. Показан процент $CD4^+$ (слева) и $CD8^+$ (в центре) Т-клеток памяти в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), реагирующих на перекрывающиеся HIVgag пептиды. Правый график показывает, что отвечающие Т-клетки отображают фенотип эффекторной памяти.

Фиг. 10A является набором из шести графиков, отражающих результаты двойных векторов RhCMV, экспрессирующих как SIVenv, так и SIVpol. Двойные векторы экспрессии были сконструированы сначала путем замены Rh110 (RhCMV гомолог pp71) на SIVenv. Затем гомологи генов HCMV UL7 (Rh19), UL78 (Rh107) или US13 (Rh191) были заменены на SIVpol. Полученные векторы были восстановлены в фибробластах макака, экспрессирующих pp71. 5×10^6 БОЕ каждого вектора инокулировали в каждый из двух RM (один RM показан сплошной линией, а другой RM показан пунктирной линией). Ответ $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток измеряли в PBMC в указанные дни с использованием перекрывающихся 15-мерных пептидов, соответствующих либо SIVpol, либо SIVenv. Показан процент SIV-специфических Т-клеток в популяции Т-клеток памяти.

Фиг. 10B представляет собой изображение геля SDS-PAGE, показывающее результаты, когда MRC-5 клетки ложно инфицированы или инфицированы TR3 Δ UL7HIVgag, TR3 Δ UL45HIVgag или TR3 Δ UL78HIVgag при MOI 0,5. Белковые экстракты получали через 96 ч после инфицирования (hpi). 20 мкг белков разделяли на 10% SDS-PAGE и иммуноблот окрашивали анти-Gag (p24) антителами.

Фиг. 11 является набором из двух графиков, показывающих результаты, полученные с SIVgag под контролем промотора EF1 α . SIVgag был вставлен в геном HCMV-TR3, используя ВАС мутагенеза, как описано в Hansen SG с соавт., Nat Med 15, 293-299 (2009) (включена сюда в качестве ссылки). Макаки-резусы (PM), серо-положительные на CMV, были инокулированы 10^5 бляшкообразующими единицами (БОЕ) HCMV-TR3, экспрессирующего SIVgag. Показан % $CD4^+$ (левый график) и % $CD8^+$ (правый график) Т-клеток в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), отвечающих на перекрывающиеся SIVgag пептиды. Обратите внимание, что график показывает устойчивый иммунный ответ для двух макаков-резусов (Rh31017, Rh31219) после 378 дней после инокуляции.

Фиг. 12 показывает зависимость иммунного ответа Т-клеток от двух RM, инокулированных

TR3ΔUL78 HCMV/HIVgag ΔUL128-130. В отличие от конструкций, которые включают делецию UL131A, ограничение делеции до UL128-130 приводит к устойчивым ответам CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

На фиг. 13 показан график сравнения кинетики роста дикого типа TR3 (квадраты) по сравнению с ΔUL82 (pp71) HIVgag в присутствии (круги) или отсутствии (ромбы) DAXX siPHK в диапазоне инфекционных частиц на клетку. Дефект роста становится видимым при клинически значимой низкой MOI, когда клетки MRC-5, трансфицированные DAXX-специфической siPHK и инфицированные через 24 ч после трансфекции TR3 и TR3Δpp71 HIVgag, функционально дополнены siPHK или не могут реплицироваться в отсутствие DAXX siPHK. Отсутствие репликации при низкой MOI указывает на то, что вирус дефицитен по распространению от клетки к клетке. В указанные моменты времени после инфицирования супернатанты собирали и титровали при pp71 дополняющих условиях (DAXX siPHK трансфицированные клетки MRC-5).

Фиг. 14 представляет набор из трех графиков, демонстрирующих, что HCMVTR3ΔUL82 (Δpp71) устанавливает латентность у гуманизированных мышей, но дефицитен по способности реактивироваться и распространяться. Мыши с нулевым NOD/SCID/IL2Rγ (NSG) с привитыми CD34⁺ стволовыми клетками, были инокулированы внутрибрюшинно фибробластами, инфицированными вирусами TR3, TR3ΔUL82 или TR3ΔUL82ΔUL128-130. Через четыре недели после заражения гемопоэтические стволовые клетки человека были мобилизованы путем обработки G-CSF и вирусную нагрузку измеряли в костном мозге (верхний левый график), печени (правый верхний график) и селезенке (нижний график). Относительное число копий вируса в зависимости от общего количества микрограммов ДНК приведено на графике, основанном на количественной ПНП. Значения при отсутствии гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) представляют латентную вирусную нагрузку, а значения после стимуляции G-CSF представляют реактивацию вируса, происходящую из латентности. Конструкции, удаленные для pp71, поддерживают латентную инфекцию, но не отвечают на стимуляцию G-CSF, как было измерено с помощью копий вирусной геномной ДНК.

Фиг. 15 является набором из трех графиков, характеризующих иммунный ответ трех RM, инокулированных конструкцией TR3/HCMV Δpp71 (HIVgag). Вектор выращивали и титровали в присутствии siPHK и концентрировали для подкожной инокуляции. Показан процент CD4⁺ (левый график) и CD8⁺ (средний график) Т-клеток памяти в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), реагирующих на перекрывающие HIVgag пептиды. Ответы на различные дозы конструкции нанесены на график до 294 суток после инокуляции.

Правый график показывает ответ CD8⁺ Δpp71 (HIVgag) TR3/HCMV, который совместим с фенотипом Т-эффекторной памяти.

Фиг. 16 графически изображает выравнивание последовательности HCMV/TR3 ΔUL82(pp71)HIVgag после 9 пассажа по сравнению с последовательностью ВАС клона. Открытые рамки считывания (ORF) изображены в виде стрелок, где само-вырезающийся ВАС изображен белыми стрелками, вирусные ORF изображены серыми стрелками, а HIVgag вставка, замещающая UL82 ORF, изображена черными стрелками. Внутренние и концевые повторы изображены серыми овалами. Никаких существенных полиморфизмов не наблюдали LOD 1%.

Фиг. 17a и 17b подтверждают экспрессию вставки gag и гомогенность в течение нескольких инфекционных циклов. Фиг. 17a изображает композитный Вестерн-блот, подтверждающий отсутствие экспрессии белка pp71 в конструкциях ΔUL82(pp71) и наличие экспрессии HIVgag(p24). Положительный контроль экспрессии HCMV (pp28) и контроль нагрузки по бета-актину включены. На фиг. 17b показано, что последовательность вставки gag устойчива на этих ранних пассажах без каких-либо полиморфизмов, обнаруживаемых секвенированием по Сенгеру.

Фиг. 18 представляет график, показывающий пример того, как альтернативные сайты вставки и промоторы могут повлиять на стабильность вставки. В этом примере EF1a промотор, запускающий вставку SIVgag, был помещен в локус UL36. Эта конструкция показывает появление полиморфизмов выше фонового уровня. В этом случае появление перестановки G на T приводит к получению стоп-кодона, тем самым обрывая векторный антиген.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 является последовательностью нуклеиновых кислот HCMV TR3ΔUL82 ВАС.

SEQ ID NO: 2 является последовательностью нуклеиновых кислот смысловой цепи siPHK которая подавляет DAXX.

SEQ ID NO: 3 является последовательностью нуклеиновых кислот антисмысловой цепи siPHK которая подавляет DAXX.

DAXX мРНК Homo sapiens включает ряд вариантов сплайсинга. Примеры вариантов сплайсинга включают следующие данные GenBank: AB015051; CR457085; AF006041; NM_001254717.1; NM_001350; NM_001141969; NM_001141970; HQ436529; HQ436528; все включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Подробное описание изобретения

Термины

Используемый в данном документе термин "антиген" относится к веществу, обычно белку, который способен вызывать иммунный ответ у субъекта. Термин также относится к белкам, которые иммунологически активны в том смысле, что, при разовом введении субъекту (либо непосредственно, либо путем введения субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, который кодирует указанный белок) способны вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против этого белка.

Используемые в настоящем описании термины "нуклеотидные последовательности" и "последовательности нуклеиновых кислот" относятся к последовательностям дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) или рибонуклеиновых кислот (РНК), включая, без ограничений, матричную РНК (мРНК), ДНК/РНК-гибриды, или синтетические нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными, либо частично или полностью двухцепочечными (дуплексными). Дуплексные нуклеиновые кислоты могут быть гомодуплексными или гетеродуплексными.

Используемый в данном описании термин "малая интерферирующая РНК" ("siРНК") (также упоминаемый в данной области как "короткие интерферирующие РНК") относится к РНК агенту, предпочтительно двухцепочечному агенту, длиной примерно 10-50 нуклеотидов (термин "нуклеотиды" включает нуклеотидные аналоги), предпочтительно длиной примерно 15-25 нуклеотидов, например, длиной около 20-24 или 21-23 нуклеотидов, более предпочтительно длиной приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, нити необязательно имеющие выступающие концы, содержащие, например, 1, 2 или 3, нависающих нуклеотида (или нуклеотидных аналогов), который способен направлять или опосредовать интерференцию РНК. Естественно встречающиеся siРНК получают из более длинных молекул дцРНК (например, длиной более 25 нуклеотидов) при помощи механизма клеточной РНК-интерференции (например, дайсер или его гомолог).

Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "аминокислотная последовательность" используют здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, и он может быть прерван химическими фрагментами, отличающимися от аминокислот. Термины также включают полимер аминокислоты, который был изменен естественным образом или путем вмешательства; например, формирование дисульфидных связей, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование, или любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгация с меткой или биоактивным компонентом.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" означает нуклеотид или белковую молекулу, которую получают за счет использования технологии рекомбинантной ДНК, что приводит к получению нуклеотидной или белковой молекулы, которые не встречаются в природе. Одним из примеров или рекомбинантной нуклеиновой кислотой является нуклеиновая кислота, кодирующая HCMV вектор, который экспрессирует гетерологичный (не-CMV) антиген.

Используемый в данном документе термин "вектор" включает любую биологическую молекулу, которая разрешает или облегчает перенос молекул нуклеиновой кислоты из одного окружения в другое, включая вирус, такой как вирус CMV.

Должно быть понятно, что белки и нуклеиновые кислоты, их кодирующие, могут отличаться от точных последовательностей, показанных и описанных в данном документе. Таким образом, изобретение предусматривает делеции, добавления, усечения и замены в представленных последовательностях до тех пор, как отличающиеся векторы HCMV еще способны приводить к иммунным ответам на гетерологичный антиген, при этом: а) стимулируя и поддерживая высокие частоты ответов экстралимфоидных Т-клеток эффекторной памяти (так называемые эффекторные Т-клетки памяти); б) повторно инфицируя CMV-позитивных индивидуумов и с) поддерживая иммуногенность, оставаясь при этом дефицитными по распространению (т.е. дефицитными по распространению от одного субъекта или хозяина к другому субъекту или хозяину).

В связи с этим, замещения могут быть консервативными по природе, то есть такие замещения, которые имеют место в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно подразделяют на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серии треонин, тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Достаточно предсказуемо, что изолированная замена лейцина на изолейцин или валин или наоборот; аспартата глутаматом или наоборот; треонина на серию или наоборот; или подобная консервативная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не будет иметь большого влияния на биологическую активность. Белки, имеющие по существу такую же аминокислотную последовательность, что и последовательности, проиллюстрированные и описанные, но имеющие малые аминокислотные замены, которые не влияют существенно на активность вектора, находятся, таким образом, в пределах объема настоящего изобретения.

В качестве альтернативы, гомологи могут быть выражены в терминах процентной гомологии по отношению к описанному белку или последовательности нуклеиновых кислот. Гомологи могут иметь 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 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии или идентичности с HCMV векторами и/или гетерологичными антигенами, описанными в настоящем документе.

Идентичность последовательности или гомология может быть определена путем сравнения последовательностей при выравнивании так, чтобы максимизировать перекрытие и идентичность, при сведении к минимуму пробелов последовательности. В частности, идентичность последовательности может быть определена с использованием любого из множества математических алгоритмов. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2264-2268 (1990), модифицированный так, как в Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873-5877 (1993).

Другим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers и Miller, *CABIOS* 4, 11-17 (1988). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения выравнивания последовательности GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей могут быть использованы таблица веса остатков PAM 120, штраф за продление гэпа 12 и штраф за продление гэпа 4. Еще один полезный алгоритм для идентификации областей локального сходства и выравнивания последовательности является алгоритм FASTA, как описано в Pearson и Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448 (1988).

Другие примеры методов, используемых для сравнения биологических последовательностей, включая методы с применением алгоритмов BLAST, легко доступны на веб-сайте Национального Центра США по Биотехнологической Информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Векторы HCMV

Здесь раскрыты векторы цитомегаловируса человека (HCMV). Векторы разработаны для предотвращения вирусного распространения от субъекта к субъекту (т.е. распространения от клетки к клетке), но по-прежнему настойчивого инфицирования субъектов, которые ранее были естественным образом инфицированы HCMV. Векторы приводят к получению постоянного иммунного ответа на гетерологичный антиген и чувствительны к лекарственному препарату ганцикловиру.

В конкретных примерах векторы являются производными от штамма HCMV TR и разработаны для включения активного гена UL97 (отсутствует в исходном клиническом изоляте TR), а также активного гена US2, US3, US6 и US7 (удалены из исходного TR-BAC во время клонирования). Один из примеров вектора штамма TR с этими изменениями обозначен как TR3 в настоящем документе. TR3 содержит UL97, а также гены US2, US3, US6 и US7 из штамма AD169. В некоторых воплощениях векторы, полученные из штамма HCMV TR далее содержат активный ген UL131A. TR3 содержит интактный ген UL131A.

Дополнительные варианты TR3 имеют вредные или инактивирующие мутации в одном или нескольких других вирусных генах, в том числе UL82 (который кодирует белок pp71), UL7, UL45, UL78 и/или US13. Вредной или инактивирующей мутацией может быть любая мутация, которая приводит к отсутствию функции белка, кодируемого геном, включая мутацию, которая вовлекает частичную или полную делецию кодирующей последовательности и/или промотора гена. Вредные или инактивирующие мутации также включают точечные мутации и мутации сдвига рамки кодирующей последовательности и/или промотора гена, что приводит к отсутствию функции белка, кодируемого геном.

TR3 варианты могут также экспрессировать гетерологичные антигены, такие как патоген-специфические антигены или опухолевые антигены. Эти гетерологичные антигены могут быть экспрессированы любым промотором, включая эндогенный промотор HCMV, включая промоторы UL82, UL7, UL45, UL78 и/или US13, или промотор немедленно-ранний промотор HCMV. В родственных TR3 вариантах гетерологичный антиген замещает вирусные UL82, UL7, UL45, UL78 и/или US 13 гены. В других родственных TR3 вариантах первый гетерологичный антиген замещает ген UL82, а второй гетерологичный антиген замещает вирусный ген UL7, UL45, UL78 или US 13.

В других примерах вариантов TR3, гетерологичные антигены снабжены промотором из CMV, отличным от HCMV (такого как MCMV-IE или RhCMV-IE), промотором от вируса герпеса, отличным от CMV, от вируса, отличным от вируса герпеса, или невирусным промотором, таким как EF1 γ .

В некоторых воплощениях промотор содержит ассоциацию последовательностей ДНК, соответствующих минимальным промоторным и регуляторным последовательностям выше по вектору. Минимальный промотор включает сайт CAP плюс TATA-блок. Они представляют собой минимальные последовательности для основной, нерегулируемой транскрипции. Регуляторные последовательности выше по вектору включают элементы выше по вектору, такие как последовательности энхансеров. Усеченный

промотор является промотором, из которого удалена некоторая часть полноразмерного промотора.

Здесь также раскрыты нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из векторов HCMV, описанных здесь. Хотя приводятся примерные последовательности нуклеиновых кислот, специалист в данной области может понять, что из-за вырождения в генетическом коде многие различные последовательности нуклеиновых кислот могут кодировать идентичные последовательности белка. Также раскрыты клетки, содержащие векторы HCMV и/или последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие векторы HCMV. Такими клетками могут быть клетки млекопитающих или человека, такие как фетальные фибробласты человека и другие клетки. В некоторых примерах клетки могут быть сконструированы так, чтобы экспрессировать siРНК, которая подавляет экспрессию определенного гена, такого как ген DАХХ.

Дополнительно здесь раскрыты способы получения ослабленного вектора HCMV в клетке (например, изолированной клетке). Способы включают инфицирование клетки ослабленным вектором HCMV. Клетка трансфицирована или экспрессирует siРНК, которая подавляет ген, который в противном случае предотвращал бы рост ослабленного вектора HCMV в клетке. В одном примере вектор HCMV содержит вредную или инактивирующую мутацию, такую как делеция в pp71, и siРНК подавляет экспрессию гена DАХХ. Также раскрыт способ получения ослабленного HCMV вектора, где отсутствует функциональный белок pp71 в клетке (например, изолированной клетке), при этом экспрессия гена DАХХ в клетке понижается до уровня белка или РНК с помощью других методов, известных в данной области техники, например, путем интерференции РНК (например, нацеливание на микроРНК и нацеливание на короткую шпилечную РНК (shRNA)), расщепления рибозима, регулируемой экспрессии с помощью условного или индуцибельного промотора, экспрессией DАХХ-связывающих белков или нацеливания на DАХХ или DАХХ белковые комплексы для убиквитинирования и деградации.

Местно-направленные мутации описанного здесь типа могут быть введены с использованием синтетических олигонуклеотидов. Эти олигонуклеотиды содержат нуклеотидные последовательности, фланкирующие желаемые сайты мутаций. Подходящий способ раскрыт в Morinaga с соавт., *Biotechnology* 2, 646-649 (1984). Другой способ введения мутаций в кодирующие фермент нуклеотидные последовательности описан в работе Nelson и Long, *Analytical Biochemistry* 180, 147-151 (1989). Методы местно-направленного мутагенеза для ВАС описаны в Chadburn A с соавт., *Histopathology* 53, 513-524 (2008); Lee E с соавт., *Genomics* 73, 56-65 (2001); и Yu D с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5978-5983 (2000); все они включены сюда в качестве ссылки.

РНК-интерференция (RNAi) является методом посттранскрипционного подавления генов, индуцированного прямым введением двухцепочечной РНК (дцРНК), он появился в качестве полезного инструмента для выбивания экспрессии специфических генов во множестве организмов. RNAi описана в Fire с соавт., *Nature* 391, 806-811 (1998) (включено в настоящий документ в качестве ссылки). Один такой способ включает введение siРНК (малой интерферирующей РНК) в клетки путем трансфекции. Другие системы, такие как специфические плазмидные векторные системы, приводят к стабильной экспрессии siРНК в клетке (например, система pSUPER - Brummelkamp TR с соавт., *Science* 296, 550-553 (2002), включено сюда в качестве ссылки). Способы конструирования siРНК, которые могут эффективно подавлять любой ген, известны специалистам в данной области.

Гетерологичные антигены

Гетерологичный антиген может быть получен из любого белка, который не естественно экспрессируется в HCMV и включает патоген-специфические антигены, опухолевые антигены, маркеры (такие как флуоресцентные белки или ферменты), факторы роста, слитые белки или любой другой белок или его фрагмент, к которым может быть получен иммунный ответ (такой как ограниченный пептид класса I или II класса МНС).

Гетерологичные антигены в HCMV-векторах, описанных здесь, могут быть патоген-специфическими антигенами. Например, можно использовать белок из вирусного патогена. Вирусные патогенные микроорганизмы включают, но не ограничиваются ими, аденовирус, вирус коксаки, вирус гепатита А, полиовирус, риновирус, герпес простой тип 1, герпес простой тип 2, вирус ветряной оспы, вирус Эпштейна-Барра, герпесвирус саркомы Капоши, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки, вирус лихорадки денге, вирус Западного Нила, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гриппа, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус папилломы человека, вирус бешенства, вирус краснухи, бокавирус человека и парвовирус В19. В некоторых воплощениях гетерологичные антигены в HCMV-векторах могут быть антигенами HIV, включая gag, pol, env, rev, tat и nef. Преимущественно антигены HIV включают, но не ограничиваются ими, антигены HIV, обсуждаемые в публикации США №№ 2008/0199493 A1 и 2013/0136768 A1, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки.

В качестве альтернативы, гетерологичный антиген может быть белком из бактериального патогена. Бактериальные патогены включают

Bordetella pertussis, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholera* и *Yersinia pestis*.

Альтернативно, гетерологичный антиген может быть белком из паразитарного организма. Паразитарные организмы включают, но не ограничиваются ими, простейшие, которые вызывают заболевания, такие как акантамеба, бабезиеллез, балантидиаз,

бластоцитоз, кокцидиоз, диентамебиаз, амебиаз, лямблии, изоспороз, лейшманиоз, первичный амебный менингоэнцефалит (РАМ), малярия, риноспориоз, токсоплазмоз, паразитарная пневмония, трихомониаз, сонная болезнь и болезнь Шагаса.

Альтернативно, гетерологичный антиген может быть белком из организма гельминтов. Организмы гельминтов включают, но не ограничиваются указанными: анкилостомы, круглые черви, ленточные черви, гвинейские черви, печеночные сосальщики, кишечные сосальщики, легочные сосальщики, шистосомы и власоглавы.

Альтернативно, гетерологичный антиген может быть белком, полученным из опухоли.

Гетерологичные антигены могут быть оптимизированы по кодону. Многие вирусы, включая ВИЧ и другие лентивирусы, используют большое количество редких кодонов и путем изменения этих кодонов для соответствия кодам, обычно используемым у желаемого субъекта (например, людей), может быть достигнута улучшенная экспрессия антигенов. Например, редкие кодоны, используемые в ВИЧ-белках, могут быть мутированы в те, которые часто появляются в высоко экспрессированных человеческих генах (Andre с соавт., *J Virol* 72, 1497-1503, (1998)). Кроме того, антигены могут представлять собой консенсусные последовательности или мозаичные антигены, содержащие фрагменты последовательности из разных штаммов патогенов.

Иммуногенные композиции

Здесь раскрыты иммуногенные композиции, содержащие описанные рекомбинантные векторы HCMV и фармацевтически приемлемый носитель, или разбавитель. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный вектор HCMV, вызывает иммунологический ответ. Ответ может, но не обязательно, быть защитным. Композиция вакцины вызывает защитную реакцию, как правило, связанную с развитием иммунологической памяти.

Также раскрыты способы индукции иммунологического ответа у субъекта. Такие способы включают введение субъекту иммуногенной или вакцинной композиции, содержащей описанные рекомбинантные векторы HCMV и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Для целей настоящего описания термин "субъект" включает всех животных и людей.

Иммуногенные или вакцинные композиции можно вводить парентерально (внутрикожно, внутримышечно или подкожно). Другое введение может осуществляться через слизистый путь, например, перорально, назально, генитально и т. д.

Иммуногенные или вакцинные композиции могут быть сформулированы и введены в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Композиции могут вводиться отдельно или могут вводиться совместно или последовательно с другими векторами HCMV или с другими иммуногенными, вакцинными или терапевтическими композициями.

Примеры таких композиций включают жидкие препараты, такие как препараты для инъекционного введения, например парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного или внутривенного введения, такие как стерильные суспензии или эмульсии. В таких композициях вектор HCMV находится в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза или тому подобное.

Иммуногенные или вакцинные композиции могут содержать адъювант. Типичным адъювантом являются квасцы (фосфат алюминия или гидроксид алюминия). Сапонин и его очищенный компонент Quil A, полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда и другие адъюванты часто используют в исследованиях и ветеринарных применениях.

Композиция может быть упакована в форму разовой дозировки для инъекционного введения или другого введения с эффективной дозировкой и пути введения, определяемого природой композиции,

природой продукта экспрессии и другими факторами. Дозировка описанных векторов HCMV может быть выражена в единицах образования бляшек (БОЕ), включая дозу более 10^2 БОЕ, более 10^3 БОЕ, более 10^4 БОЕ, более 10^5 БОЕ, более 10^6 БОЕ, или более 10^7 БОЕ.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют раскрытые способы. В свете этого раскрытия специалисты в данной области техники поймут, что варианты этих примеров и другие примеры раскрытого способа возможны без лишних экспериментов.

Пример 1. Векторная платформа HCMV-TR3

Клиническое применение векторов CMV, стимулирующих Т-клетки эффекторной памяти, требует векторов, которые генетически стабильны и поддерживают хроническую инфекцию, но у которых отсутствует способность распространяться на пациентов с ослабленным иммунитетом, у которых HCMV может быть патогенным. Предыдущие стратегии ослабления вариантов HCMV, которые вошли в клинические испытания, были основаны на последовательном пассировании вируса в фибробластах (Plotkin SA с соавт., *J Infect Dis* 134, 470-475 (1976), включенная сюда в качестве ссылки), рекомбинации ослабленных с помощью неослабленных штаммов HCMV (Heineman J с соавт. 2006, выше), или получении дефицитных по репликации рекомбинантных векторов (WO 2013/036465, включенный здесь в качестве ссылки). Однако полученные вирусы либо сохраняют патогенность, либо теряют полезные свойства, такие как способность устанавливать скрытые инфекции или вторичные инфекции у субъектов, ранее инфицированных CMV естественным путем.

Здесь раскрыта векторная платформа HCMV-HCMV-TR3, которая преодолевает эти ограничения. HCMV-TR3 является модифицированной версией молекулярного клона HCMV TR (Murphy E с соавт., *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 14976-14981 (2003), включенный сюда в качестве ссылки). HCMV TR превосходит другие штаммы HCMV при установлении латентности и постоянства *in vivo*. HCMV TR также превосходит другие клинические изоляты HCMV *in vitro*, так как он не показывает типичные для HCMV адаптации фибробластов при множественных пассажах. TR3 был изменен, чтобы сделать его чувствительным к ганцикловиру, для получения возможности повторно инфицировать ранее инфицированных субъектов и для облегчения извлечения вектора CMV из системы бактериальной искусственной хромосомы (BAC).

В частности, делеция гена UL82 (который кодирует белок pp71) из TR3 приводит к получению дефицитного по распространению вектора (то есть дефектного по отношению к клеточному распространению). Ранее показано, что вирусы, в которых отсутствует экспрессия pp71, нуждаются в комплементации для роста *in vitro* (Bresnahan W. A., и T. E. Shenk. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14506-11 (2000), включено сюда в качестве ссылки). Вирионный белок UL82 активирует экспрессию непосредственно-ранних вирусных генов в клетках, инфицированных цитомегаловирусом человека, что, в свою очередь, приводит к риску того, что вирус вернется к дикому типу с активным pp71. В результате, был разработан и подробно описан ниже новый способ выращивания векторов HCMV, в которых отсутствует pp71.

Модель приматов, кроме человека, далее демонстрирует, что HCMV-TR3 с удаленным pp71 сохраняет способность индуцировать и поддерживать ответы Т-клеток эффекторной памяти, тогда как варианты HCMV-TR3, дефицитные по тропизму, которые повторяют вирусные адаптации, обычно возникающие при пассировании через фибробласты, этого не сохраняют.

Кроме того, HCMV-TR3 векторы с удаленным pp71 поддерживают скрытые инфекции, но у них отсутствует способность реактивироваться у гуманизированных мышей.

Далее описаны сайты внутренней экспрессии, которые могут быть использованы для вставки и экспрессии гетерологичных антигенов. Они могут быть использованы для получения векторов HCMV, которые содержат гетерологичные антигены.

Пример 2 - HCMV TR превосходит другие штаммы HCMV при установлении скрытой инфекции

Модель гуманизированной мыши, которая позволяет исследовать латентность HCMV и реактивацию, описана в Smith MS с соавт., *Cell Host Microbe* 8, 284-291 (2010) (включена сюда в качестве ссылки). Эту модель использовали, чтобы продемонстрировать, что HCMV TR превосходит другие штаммы HCMV (AD169, Toledo) при установлении хронической инфекции. Хроническая инфекция важна для индуцирования Т-клеток эффекторной памяти. Способность приводить к хронической инфекции не зависит от области UL128-150, которая мутирована во многих штаммах HCMV, включая все штаммы, ранее использовавшиеся в клинических испытаниях HCMV-вакцины (AD169, Towne и Toledo). Восстановление UL131A в штамме AD169 не восстанавливает способность устанавливать латентность, но штамм HCMV-TRA4, в котором отсутствует UL128-150, сохраняет способность устанавливать латентность (фиг. 1B). Обратите внимание, что указанные предыдущие клинические испытания не включали HCMV, содержащий гетерологичные антигены. Генетические схемы этих штаммов показаны на фиг. 1A.

Пример 3 - HCMV-TR3 чувствителен к ганцикловиру и включает область US2-7, тогда как исходный HCMV TR не включает

HCMV TR клонировали путем рекомбинирования BAC из вирусного изолята, который устойчив к противовирусному лекарственному препарату ганцикловиру (Smith IL с соавт., *J Infect Dis* 176, 69-77 (1997), включено сюда в качестве ссылки). Резистентность к ганцикловиру не является желательным

признаком в векторе HCMV, поскольку лечение ганцикловиром было бы важно в случае заболевания, связанного с CMV, вызванного векторами на основе HCMV. Подтверждение устойчивости к ганцикловиру показано на фиг. 3.

Интактный ген UL97 вставляли в HCMV TR (фиг. 2) для получения чувствительного к ганцикловиру вектора. Молекулярный клон HCMV TR был дополнительно модифицирован. Вставка кассеты BAC во время первоначального клонирования HCMV TR привела к делеции области US2-7 (Murphy с соавт. 2003, выше). Позже было определено, что US2-7 является областью, необходимой для повторного инфицирования CMV-положительных индивидуумов (Hansen SG с соавт., Science 328, 102-106 (2010), включен сюда в качестве ссылки). Получили модифицированную версию HCMV TR, в которую была вставлена область US2-7 штамма HCMV AD169, чтобы модифицировать кассету BAC. Эта модификация была сделана, потому что в исходном клоне HCMV TR кассета BAC не могла быть удалена, когда вирус восстанавливают путем трансфекции фибробластов (Lauron E с соавт., J Virol 88, 403-416 (2014), включено сюда в качестве ссылки). HCMV-TR3, следовательно, также включает область US2-7 AD169 и сайт loxP между US7 и US8 после восстановления вируса, как показано путем полного секвенирования генома (фиг. 2).

Пример 4 - HCMV-TR3 демонстрирует превосходную стабильность генома при множественном пассировании через фибробласты

Пассирование HCMV в фибробластах приводит к преимущественному отбору векторов с вредными (т.е. инактивирующими) мутациями в области UL128-131A (Dargan DJ с соавт., J Gen Virol 91, 1535-1546 (2010), включено сюда в качестве ссылки) и гене RL13 (Stanton RJ с соавт. J Clin Invest 120, 3191-208; (2010), включено сюда в качестве ссылки). Тем не менее, пассирование через фибробласты приводит к самым высоким вирусным выходам при производстве вакцины. Фиг. 4А показывает, что, как ни странно, геном HCMV-TR3 остается стабильным даже после 20 пассажей в фибробластах.

Пример 5 - Наличие UL128-131A не снижает выход внеклеточного HCMV-TR3, в отличие от других штаммов HCMV

При производстве вакцины для выделения векторов вакцины предпочтительны супернатанты клеток, а не сгусток клеток. В большинстве штаммов HCMV выход внеклеточного вируса из фибробластов резко снижается, когда гены UL131A, UL130 и UL128 остаются незараженными (Wang D и Shenk T, J Virol 79, 10330-10338 (2005), включено сюда в качестве ссылки). Удивительно, но удаление UL131A-128 не влияет на соотношение внеклеточного вируса с вирусом, ассоциированным с клетками, для HCMV-TR3 (фиг. 5).

Пример 6 - HCMV-TR3 индуцирует эффекторную память Т-клеток у обезьян, тогда как HCMV-мутанты, у которых отсутствует область UL128-131, не способны к этому

HCMV-TR3, экспрессирующий Gag-антиген SIV, способен индуцировать эффекторную память ответа Т-клеток на Gag у приматов, кроме человека (NHP, фиг. 6А). Важно отметить, что этот ответ Т-клеток эффекторной памяти сохраняется со временем (фиг. 11). Напротив, HCMV-TR3, у которого отсутствуют гены UL128-131, область гена, которая часто мутирует в штаммах HCMV, ослабленных при последовательном пассировании *in vitro*, неспособна к этому (фиг. 6В). Это также первая известная демонстрация вектора HCMV, индуцирующего иммунный ответ на гетерологичный антиген в модели приматов, кроме человека. Дальнейшие делеции в этой геномной области показали, что вирусы, у которых отсутствуют UL128 и UL130, способны вызывать иммунные ответы на гетерологичные антигены *in vivo* подобно родительским векторам (фиг. 12). Таким образом, мы делаем вывод, что UL131A необходим для инфицирования HCMV.

Пример 7 - Получение некомплементарного HCMV-TR3 с удаленным pp71 с использованием siPHK DAXX.

Способ выращивания ослабленного вируса без комплементации или в слиянии сFKBP

Основным ограничением для производства HCMV, у которого отсутствуют необходимые гены, или гены, которые необходимы для оптимальной репликации *in vitro*, является потребность в комплементации, то есть экзогенной экспрессии удаленного гена в линии клеток-продуцентов. Известно, что линии клеток-продуцентов сложно получить и поддерживать, особенно в контексте производства вакцин GMP.

Один подход, используемый в комплементации, заключается в слиянии основного гена с доменом деградации (таким как FKBP), по стратегии, описанной в WO 2013/036465 (включено сюда в качестве ссылки). Хотя слияния с FKBP могут быть полезны для производства вакцин, нестойких во внешней среде, которые реплицируются с дефицитом *in vivo*, в случае описанного здесь мутантного HCMV существует риск того, что домен деградации будет мутировать, и, таким образом, ослабление будет потеряно, что делает HCMV способным распространяться от хозяина к хозяину.

Здесь раскрыт подход, включающий подавление антивирусного фактора клетки-хозяина, используя, например, siPHK. Результатом является клеточная линия, которая не требует комплементации, поскольку мутантный HCMV можно выращивать *in vitro*, хотя он остается ослабленным *in vivo*. Пример этого процесса показан на фиг. 7А. Как описано выше, HCMV-TR3, где отсутствует ген UL82, который кодирует фосфопротейн 71 (pp71), не способен расти в фибробластах. Однако, когда экспрессию антивирусного белка DAXX подавляют с помощью siPHK, экспрессированной в фибробластах, HCMV-TR3ΔUL82 мож-

но выращивать с высоким выходом (фиг. 7В и 13).

Пример 8 - HCMV-TR3, у которого отсутствует UL82 (pp71), сохраняет постоянство *in vivo*, но дефицитен по способности реактивировать после задержки

Цитомегаловирус человека (HCMV) устанавливает латентную инфекцию в клетках-хозяевах, которая регулируется через временную экспрессию вирусных генов. HCMV pp71 представляет собой белок-оболочку, который противодействует деградации клеточного белка DAXX (белок, связанный с доменом смерти) (Penkert, RR, и RF Kalejta, *Future Virol* 7, 855-869 (2012), включено сюда в качестве ссылки) внутренним иммунитетом хозяина. Деградация DAXX с помощью pp71 необходима для оптимальной немедленной экспрессии раннего гена и литической репликации. Данные, полученные *in vitro* свидетельствуют, что HCMV предотвращает опосредованную pp71 деградацию DAXX во время установления латентности путем секвестрирования pp71 в цитоплазме инфицированных клеток. Однако роль pp71 в персистенции HCMV, поддержание латентности и реактивации *in vivo* остается неизвестной. Ранее авторы настоящего изобретения показали, что инфицирование HCMV гемопоэтических стволовых клеток человека (HSC), привитых мышам с дефицитом иммунитета (HU-NSG), приводит к вирусной латентности, которая может быть реактивирована после лечения G-CSF. Хотя эта модель важна, у мышей HU NSG отсутствуют зрелые Т-клетки человека. Наоборот, мыши NSG с трансплантированными HSC в сочетании с фетальной печенью человека и тимусом (мыши BLT), развивают все гемопоэтические клеточные линии человека, необходимые для функциональной иммунной системы человека, включая зрелые CD4 и CD8 Т-клетки. На этой новой модели гуманизированной мыши показано, что HCMV устанавливает латентность и реактивацию, подобно мышам HU-NSG. Латентно инфицированные мыши также получают IgG человека, а также HCMV-специфичные ответы Т-клеток. Важно отметить, что инфицирование BLT мышей условно экспрессирующим pp71 (TR UL82-FKBP) или pp71-нокаутным (TR (дельта)UL82) приводило к возникновению инфекции, но не реактивировало. Эти данные показывают, что pp71 играет важную роль в реактивации HCMV и что вирус с дефицитом репликации может приводить к получению ответа Т-клеток. Возможность репликации *in vitro* не является хорошим прогнозом того, может ли вирус установить латентность, как показано на фиг. 1В. Например, AD169 хорошо реплицируется *in vitro*, но не может установить латентность, как показано на фиг. 1В. Однако HCMV-TR3ΔUL82, выращенный на клетках MRC-5, экспрессирующих siPHK DAXX, создает латентность у гуманизированных мышей, но не активируется и не распространяется (фиг. 8).

Аналогичные результаты были получены на мышах NSG для HCMV-TR3ΔUL82 и HCMV-TR3ΔUL82ΔUL128-130 (фиг. 14).

Пример 9 - HCMV-TR3 с удаленным pp71, экспрессирующий HIVgag, сохраняет способность индуцировать HIVgag специфические эффекторные Т-клетки памяти *in vivo*

Благодаря большому геному HCMV дает возможность вставлять множественные гетерологичные антигены в вирусный вектор. Экспрессия множественных гетерологичных антигенов с помощью HCMV требует идентификации эндогенных генов, которые могут быть использованы для вставки чужеродных последовательностей без влияния на функцию вектора. Ранее анализ транспозонов идентифицировал все несущественные гены в геноме HCMV *in vitro* (Yu D с соавт., *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12396-12401 (2003), включено сюда в качестве ссылки).

Однако это не дает прогнозов относительно того, какие несущественные гены *in vitro* будут несущественными *in vivo* и, кроме того, будет ли замена вирусного гена геном, кодирующим гетерологичный антиген, индуцировать иммунный ответ, когда экспрессия гетерологичного антигена обусловлена промотором замещенного гена. Фиг. 9 и 15 показывают, что замена UL82 (pp71) на HIVgag вызывает и поддерживает иммунный ответ Т-клеток эффекторной памяти *in vivo*.

Дополнительные сайты для замены гетерологичным антигеном включают HCMV UL7, UL78 и US 13. Когда каждый из них замещали гетерологичным антигеном (SIVpol) в векторах, которые уже несут замену pp71-ORF антигеном (SIVenv), каждый раз получали иммунные ответы. Результаты суммированы на фиг. 10А. Фиг. 10В показывает, что замена UL7, UL45 и UL78 на HIVgag в HCMV приводит к экспрессии HIVgag *in vitro*.

Пример 10 - Стабильность HCMV-TR3 с удаленным pp71 путем роста и продуцирования при условной комплементации

Предыдущая работа продемонстрировала, что клинические изоляты HCMV подвергаются быстрой адаптации *in vitro* при выращивании в фибробластах. В частности, получение мутаций рамки сдвига, приводящих к преждевременным стоп-кодонам в RL13 и потере экспрессии одного или нескольких пентамерных комплексных белков (UL128, UL130 и UL131A), может возникать даже после небольшого количества пассажей в тканевой культуре (Stanton RJ с соавт. *J Clin Invest* 120(9), 3191-3208 (2010), включено сюда в качестве ссылки). Реконструкция полного генома цитомегаловируса человека в ВАС показывает, что RL13 является сильным ингибитором репликации (Id.). Как следствие, все штаммы HCMV, ранее использованные в клинических исследованиях (AD169, Towne, Toledo), отображают множественные перегруппировки и делеции (Murphy, ED с соавт. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25), 14976-14981 (2003); включено сюда в качестве ссылки). Эти адаптации фибробластов могут приводить к делеции

UL131A, как наблюдалось в AD169, тем самым делая вирус неинфекционным *in vivo*. Чтобы определить, будет ли HCMV-TR3/HIVgag с удаленным UL82, выращенный в клетках фибробластах, обработанных siPHK DAXX, аналогичным образом проявлять нестабильность после нескольких пассажей, мы проанализировали вирусный геном путем секвенирования следующего поколения (NGS).

Конкретно, рекомбинантную бактериальную искусственную хромосомную ДНК секвенировали перед введением в фибробласты и при восстановлении в фибробластах вирусную ДНК выделяли в пассаже 5 и пассаже 9. Геномную ДНК выделяли из супернатанта инфицированных фибробластов человека экстракцией Гирта (Hirt B. *J Mol Biol.* 26(2):365-369 (1967), включено сюда в качестве ссылки) после очистки вируса через 20% сахарозную подушку. Библиотеки ДНК получали с использованием набора для подготовки образцов ДНК TruSeq, и адаптеры с известными сайтами связывания праймеров были лигированы с каждым концом фрагментов ДНК. Парное концевое секвенирование, с анализом 150 пар оснований на каждом конце неизвестной ДНК, выполняли на секвенаторе Illumina MiSeq NGS с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kits v2 для 300 циклов. Полученные в результате последовательности ридов импортировали в Geneious 8.1.4 и усекали с максимально возможным пределом вероятности ошибки 0,001, что означало, что каждую пару оснований с вероятностью ошибки более 0,1% удаляли. Сборку последовательности *De novo* выполняли с от 250000 до 1000000 ридов, чтобы определить последовательность ДНК независимо. Никаких крупных вставок, делеции или геномных перестроек не наблюдали по сравнению с предсказанными последовательностями. Далее выполняли сборку всех ридов в соответствии со стандартом с использованием последовательности *De novo* в качестве стандарта для определения полной и правильной основной последовательности. Средний минимальный охват обладал кратностью более 150.

Фиг. 16 показывает выравнивание полученных последовательностей. Открытые рамки считывания (ORF), закодированные в самовырезающейся кассете ВАС, изображены белыми стрелками, а вирусные ORF изображены серыми стрелками. Желтые стрелки показывают ORF HIVgag, заменяющий ORF UL82. Серые овалы изображают внутренние и концевые повторы. Некодирующие области показаны как прерывания кодирующих областей, показанных как черные прямоугольники. Как и ожидалось, кассета ВАС была удалена при восстановлении вируса в тканевой культуре. Однако все остальные нуклеотиды в основной последовательности были идентичны предсказанной последовательности (консенсус). Важно отметить, что никаких изменений каких-либо аминокислот не наблюдали в ORF даже через девять пассажей. Это включает ORF, кодирующие гены UL128-131A, RL13, а также гены UL97 и US2-7, полученные из AD169. Эти наблюдения указывают на удивительную стабильность HCMV-TR3 с удаленным UL82, несмотря на многочисленные пассажи в фибробластах в присутствии siPHK DAXX.

Важно отметить, что не было изменений в кодировании ORF HIVgag, экспрессированном при помощи промотора UL82. Это было независимо подтверждено иммуноблоттингом и секвенированием Сэнгера вставки HIVgag на пассажах 5, 6 и 7 после восстановления HCMV-TR3 с удаленным UL82 (pp71). На фиг. 17А показан иммуноблот лизатов из фибробластов, инфицированных указанными вирусами. Лизаты разделяли с помощью метода SDS-PAGE, переносили на нейлоновые мембраны и подвергали взаимодействию с антителами, специфичными к pp71, HIVgag (p24) и вирусному белку pp28 и клеточному белку актину. Как и ожидали, pp71 присутствовал в родителем вирусе TR3, но не в векторах, экспрессирующих HIVgag, вследствие замены UL82 на HIVgag. Важно отметить, что HIVgag стабильно проявлялся при каждом пассаже. На фиг. 17В показано выравнивание, основанное на анализе последовательностей фрагментов ПНР, охватывающих ген HIVgag, и полученных из вирусной ДНК на указанном пассаже. Никаких изменений нуклеотидов не наблюдалось.

В противоположность удивительно стабильной экспрессии HIVgag, экспрессируемого эндогенным промотором UL82, экспрессия гетерологичных антигенов при помощи гетерологичных промоторов обычно неустойчива при множественных пассажах. Например, SIVgag, экспрессируемый гетерологичным промотором EFlα в векторе RhCMV 68-1.2, обнаруживал преждевременное нарушение кодирующей области из-за точечной мутации. На фиг. 18 показана частота одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) по сравнению с эталонной последовательностью из анализа последовательности последующих поколений UL36-вектора RhCMV, полученного из клона RhCMV 68-1.2, который экспрессирует SIVgag, используя промотор EFlα. Примерно 38% геномов демонстрируют преждевременный стоп-кодон в последовательности SIVgag.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор-цитомегаловирус человека (HCMV) для индуцирования иммунного ответа на гетерологичный антиген, содержащий:

- (1) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген;
- (2) инактивирующую мутацию в гене UL82 или гене UL78 и
- (3) активные гены US2, US3, US6, US7, UL97 и UL131A;

где рекомбинантный HCMV-вектор имеет происхождение из штамма HCMV TR и где рекомбинантный HCMV-вектор является чувствительным к ганцикловиру.

2. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.1, где активные гены US2, US3, US6 и US7 получают из штамма HCMV AD169.
3. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.1 или 2, дополнительно включающий промотор UL82, промотор UL7, промотор UL45, промотор UL78 или промотор US13, которые регулируют экспрессию первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген.
4. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-3, где инактивирующая мутация в гене UL82 является делецией всего или части гена UL82.
5. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.4, где первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена UL82.
6. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.5, дополнительно включающий промотор UL82, который регулирует экспрессию первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещающей весь или часть гена UL82.
7. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-6, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL7, UL38, UL45 или US13 HCMV.
8. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL7, представляющую собой делецию всего или части гена UL7.
9. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.8, где первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена UL7.
10. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.9, где экспрессия первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещающей весь или часть гена UL7, регулируется промотором UL7.
11. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL38, представляющую собой делецию всего или части гена UL38.
12. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.11, где первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена UL38.
13. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.12, где экспрессия первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещающей весь или часть гена UL38, регулируется промотором UL38.
14. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL45, представляющую собой делецию всего или части гена UL45.
15. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.14, где первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена UL45.
16. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.15, где экспрессия первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещающей весь или часть гена UL45, регулируется промотором UL45.
17. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене US13, представляющую собой делецию всего или части гена US13.
18. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.17, где первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена US13.
19. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.18, где экспрессия первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещающей весь или часть гена US13, регулируется промотором US 13.
20. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-19, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL128 или гене UL130.
21. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-19, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL128 и в гене UL130.
22. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-21, где по меньшей мере один гетерологичный антиген является патоген-специфическим антигеном или опухолевым антигеном.
23. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-21, где нуклеиновая кислота, кодирующая геном рекомбинантного HCMV-вектора, и первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, стабильны при множественных пассажах в фибробластах.
24. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-22, дополнительно содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй гетерологичный антиген.
25. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-7, дополнительно содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй гетерологичный антиген, причем первая нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена UL82, и вторая нуклеиновая кислота, кодирующая второй гетерологичный антиген, замещает весь или часть гена UL7, UL45, UL78 или US13 HCMV, присутствующего в исходном штамме TR HCMV.
26. Рекомбинантный HCMV-вектор по п.25, дополнительно содержащий промотор UL82, регулирующий экспрессию первой нуклеиновой кислоты, кодирующей по меньшей мере один гетерологичный антиген, и промотор UL7, промотор UL45, промотор UL78 или промотор US13, регулирующий экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей второй гетерологичный антиген.

27. Рекombинантный HCMV-вектор по п.25 или 26, где указанный по меньшей мере один гетерологичный антиген является патоген-специфическим антигеном или опухолевым антигеном.

28. Рекombинантный HCMV-вектор по п.27, где второй гетерологичный антиген является патоген-специфическим или опухолевым антигеном, который отличается от указанного по меньшей мере одного гетерологичного антигена.

29. Рекombинантный HCMV-вектор по любому из пп.24-28, где нуклеиновая кислота, кодирующая геном рекombинантного HCMV-вектора, и первая и вторая нуклеиновые кислоты, кодирующие гетерологичные антигены, стабильны при множественных пассажах в фибробластах.

30. Рекombинантный HCMV-вектор по любому из пп.25-29, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL128 или гене UL130.

31. Рекombинантный HCMV-вектор по любому из пп.25-29, дополнительно содержащий инактивирующую мутацию в гене UL128 и гене UL130.

32. Иммуногенная композиция, содержащая рекombинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-23 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение эффективного количества иммуногенной композиции по п.32.

34. Способ по п.33, где введение иммуногенной композиции индуцирует и поддерживает ответ Т-клеток с долговременной эффекторной памятью по меньшей мере на один гетерологичный антиген.

35. Иммуногенная композиция, содержащая рекombинантный HCMV-вектор по любому из пп.24-31 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение эффективного количества иммуногенной композиции по п.35.

37. Способ по п.36, где введение иммуногенной композиции индуцирует и поддерживает ответ Т-клеток с долговременной эффекторной памятью на указанный по меньшей мере один гетерологичный антиген и второй гетерологичный антиген.

38. Выделенный полинуклеотид, кодирующий рекombинантный HCMV-вектор по любому из пп.1-31.

39. Полинуклеотид по п.38, содержащий последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

40. Выделенная клетка для экспрессии рекombинантного HCMV-вектора по п.1, содержащая полинуклеотид по п.38 или 39.

41. Выделенная клетка по п.40, где выделенная клетка дополнительно содержит siPHK, которая подавляет экспрессию гена DAXX.

42. Выделенная клетка по п.41, где DAXX siPHK содержит смысловую последовательность SEQ ID NO: 2 и антисмысловую последовательность SEQ ID NO: 3.

43. Выделенная клетка по любому из пп.40-42, где выделенная клетка является клеткой млекопитающего.

44. Выделенная клетка по п.43, где выделенная клетка является клеткой человека.

45. Выделенная клетка по любому из пп.40-44, где выделенная клетка является фибробластом.

46. Способ получения HCMV, дефицитного по pp71, имеющего инактивирующую мутацию в гене UL82, при этом способ включает:

(1) инфицирование клетки HCMV-вектором по любому из пп.1-31, дефицитным по pp71, где клетка содержит siPHK, которая подавляет экспрессию DAXX;

(2) инкубирование клетки и

(3) сбор HCMV, дефицитного по pp71.

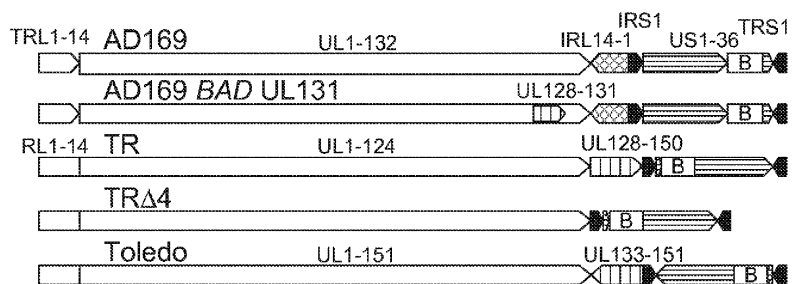
47. Способ по п.46, где инактивирующая мутация в гене UL82 является делецией всего или части гена UL82.

48. Способ по п.46 или 47, где DAXX siPHK содержит смысловую последовательность SEQ ID NO: 2 и антисмысловую последовательность SEQ ID NO: 3.

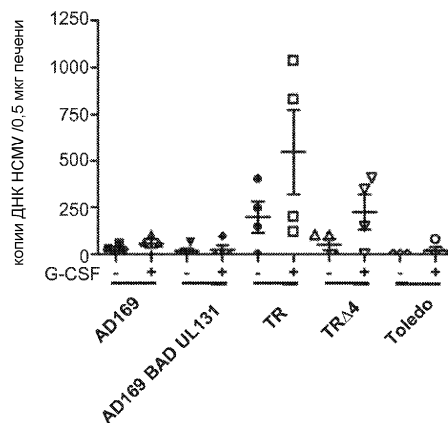
49. Способ по любому из пп.46-48, где клетка является клеткой млекопитающего.

50. Способ по п.49, где клетка является клеткой человека.

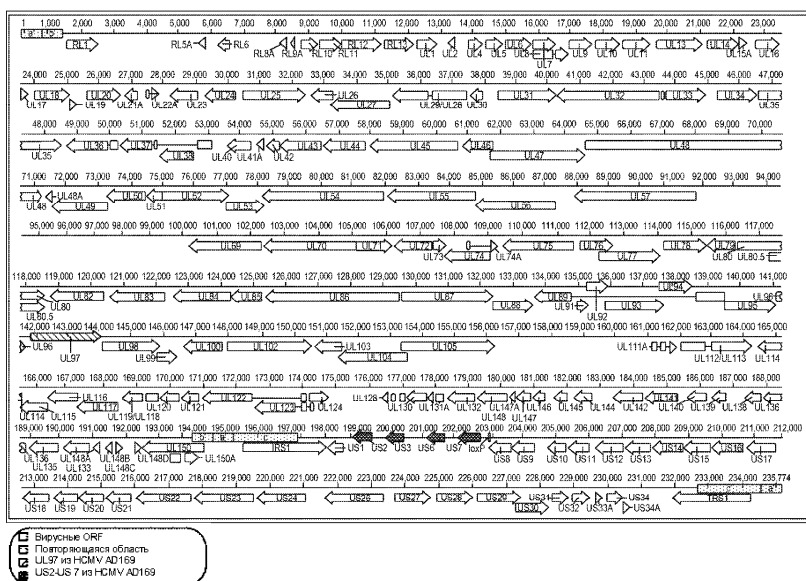
51. Способ по любому из пп.46-50, где клетка является фибробластом.



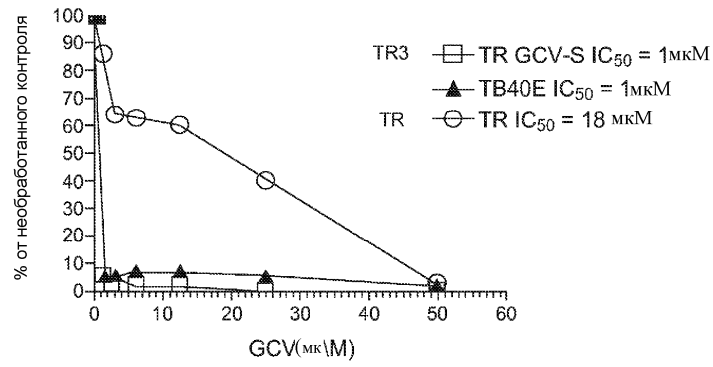
Фиг. 1А



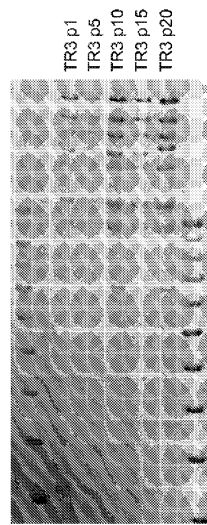
Фиг. 1В



Фиг. 2

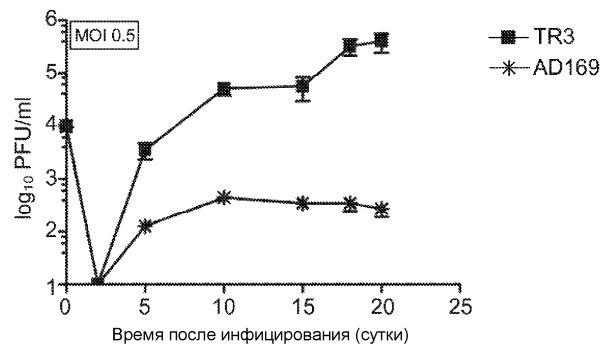


Фиг. 3



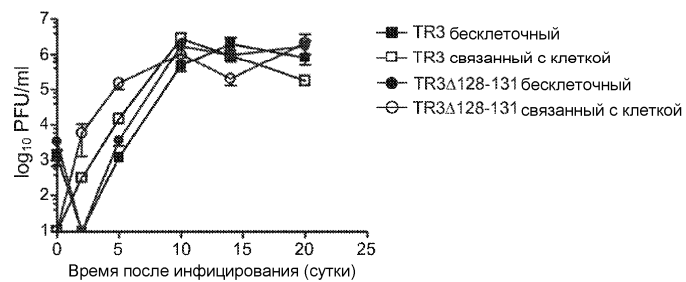
Фиг. 4А

Репликация в ЕС:

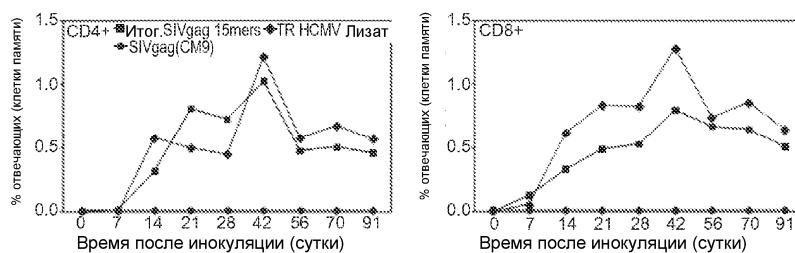


Фиг. 4В

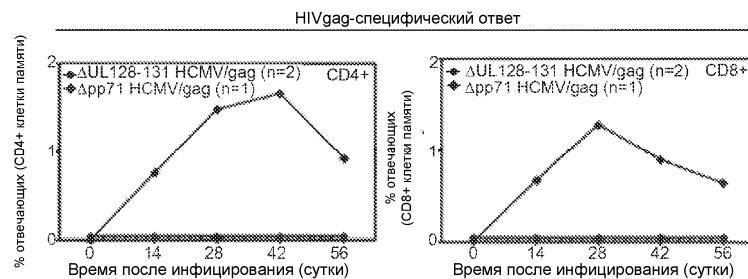
MOI=0.01



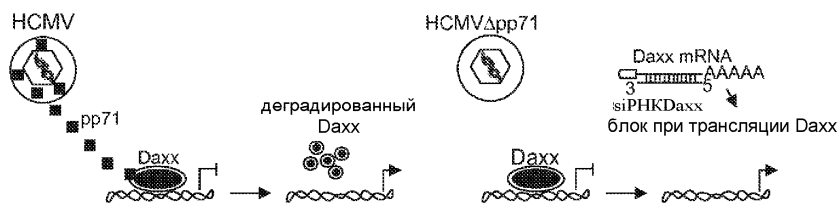
Фиг. 5



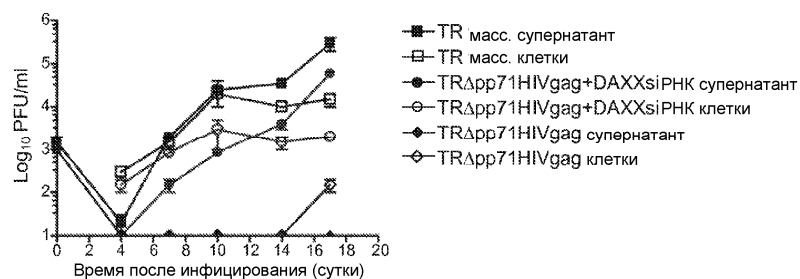
Фиг. 6А



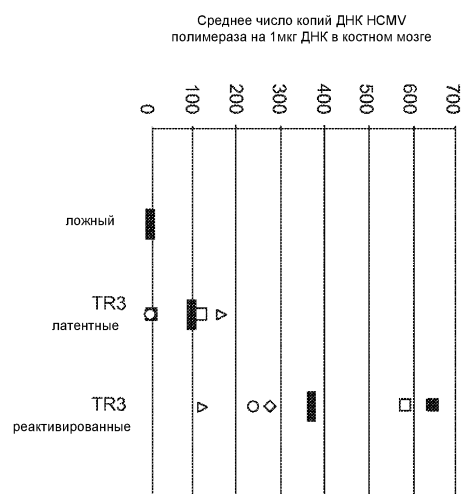
Фиг. 6В



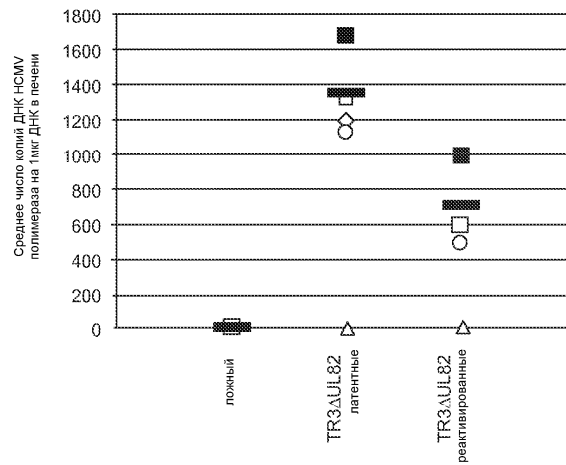
Фиг. 7А



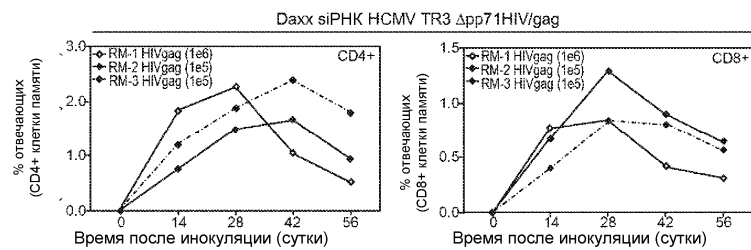
Фиг. 7В



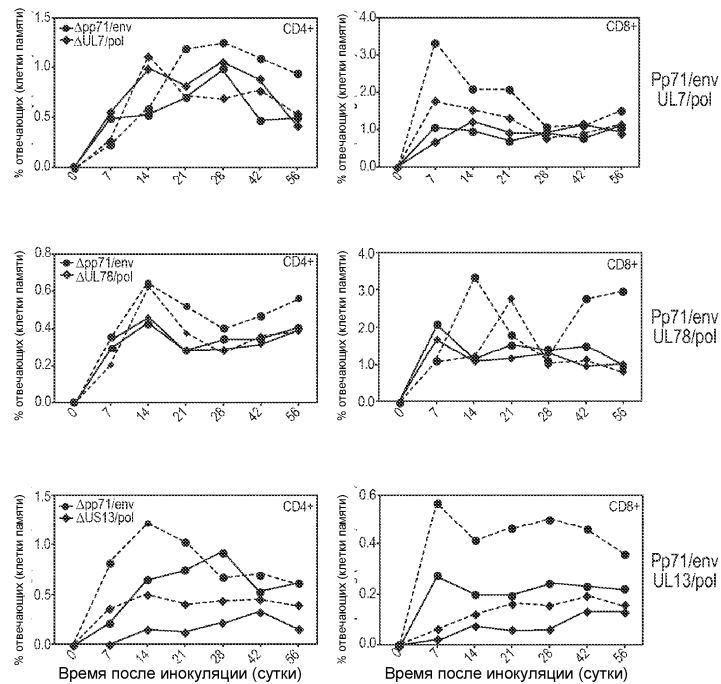
Фиг. 8А



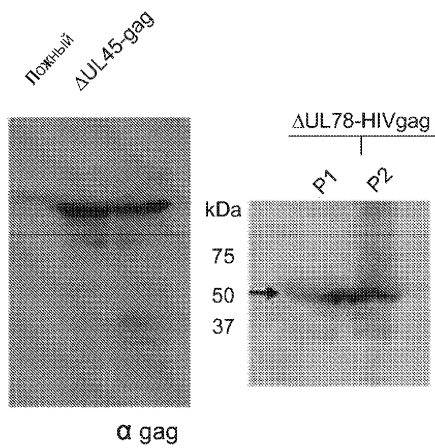
Фиг. 8В



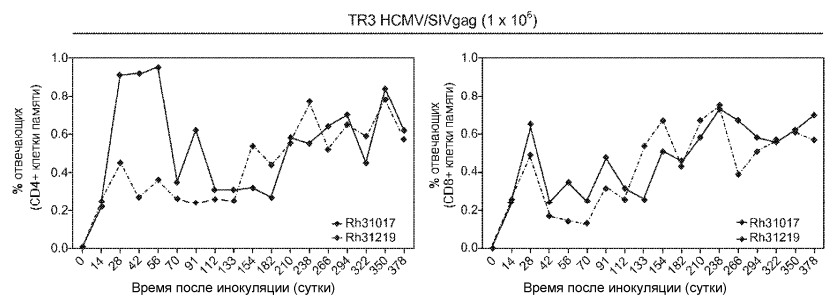
Фиг. 9



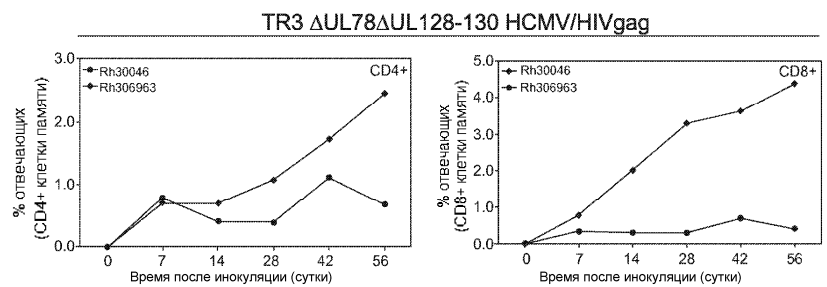
Фиг. 10А



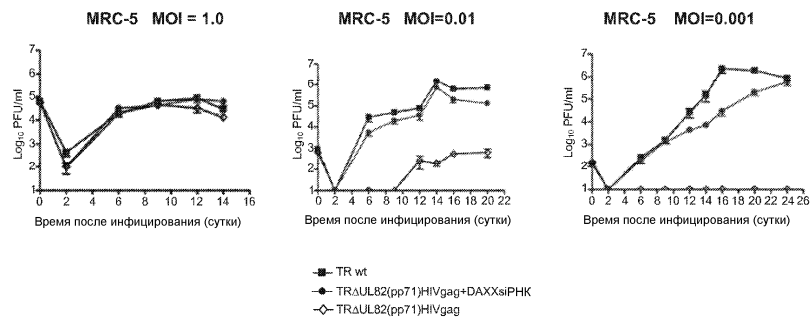
Фиг. 10В



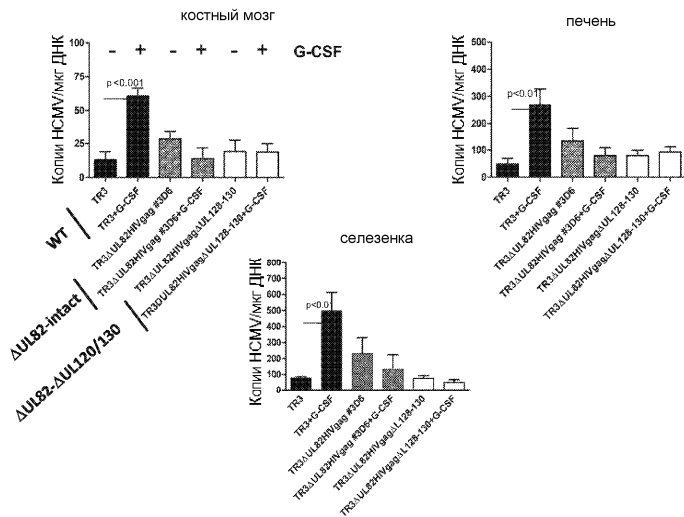
Фиг. 11



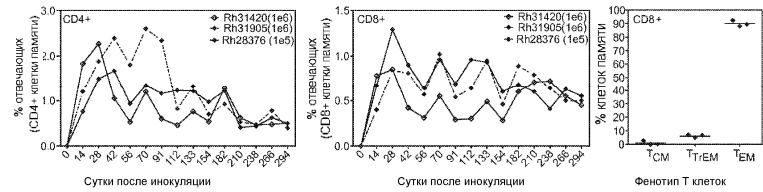
Фиг. 12



Фиг. 13

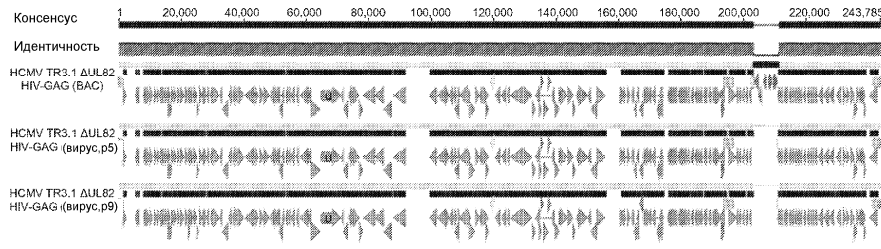


Фиг. 14

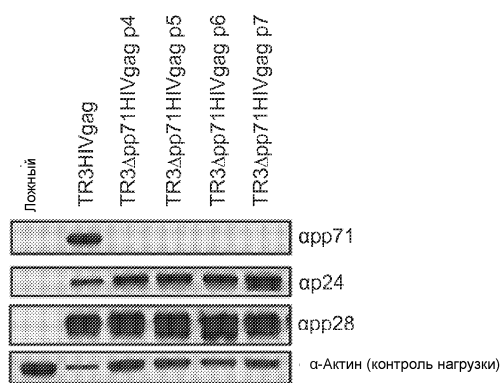


Δ UL82 TR-HCMV/HIVgag

Фиг. 15



Фиг. 16



Δ UL82-HCMV-TR3/HIVgag

Фиг. 17A

```

HIVgag      MAARASILSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELDRLFALNPSLLETTEGCQOI 60
#3D6 p4     MAARASILSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELDRLFALNPSLLETTEGCQOI 60
#3D6 p5     MAARASILSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELDRLFALNPSLLETTEGCQOI 60
#3D6 p6     MAARASILSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELDRLFALNPSLLETTEGCQOI 60
*****

HIVgag      MNQLQPAVKTGTEEEKSLFNTVATLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEIQNKSKQKTQAAAA 120
#3D6 p4     MNQLQPAVKTGTEEEKSLFNTVATLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEIQNKSKQKTQAAAA 120
#3D6 p5     MNQLQPAVKTGTEEEKSLFNTVATLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEIQNKSKQKTQAAAA 120
#3D6 p6     MNQLQPAVKTGTEEEKSLFNTVATLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEIQNKSKQKTQAAAA 120
*****

HIVgag      DTGSSSKVSQNYPIIQNAQGQMIHQNLSPRTLNAWVKVIEEKAFAFSPVIMPFSALEGAT 180
#3D6 p4     DTGSSSKVSQNYPIIQNAQGQMIHQNLSPRTLNAWVKVIEEKAFAFSPVIMPFSALEGAT 180
#3D6 p5     DTGSSSKVSQNYPIIQNAQGQMIHQNLSPRTLNAWVKVIEEKAFAFSPVIMPFSALEGAT 180
#3D6 p6     DTGSSSKVSQNYPIIQNAQGQMIHQNLSPRTLNAWVKVIEEKAFAFSPVIMPFSALEGAT 180
*****

HIVgag      PQDLNVMLNIVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVQAGPIPPGQIREPRGSDIAGTT 240
#3D6 p4     PQDLNVMLNIVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVQAGPIPPGQIREPRGSDIAGTT 240
#3D6 p5     PQDLNVMLNIVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVQAGPIPPGQIREPRGSDIAGTT 240
#3D6 p6     PQDLNVMLNIVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLHPVQAGPIPPGQIREPRGSDIAGTT 240
*****

HIVgag      STPQEQQLQWMTGNPPIPVGNIYKRWIILGLNKIVRMYSFVSILDIKQGPKEPRFDYVDRF 300
#3D6 p4     STPQEQQLQWMTGNPPIPVGNIYKRWIILGLNKIVRMYSFVSILDIKQGPKEPRFDYVDRF 300
#3D6 p5     STPQEQQLQWMTGNPPIPVGNIYKRWIILGLNKIVRMYSFVSILDIKQGPKEPRFDYVDRF 300
#3D6 p6     STPQEQQLQWMTGNPPIPVGNIYKRWIILGLNKIVRMYSFVSILDIKQGPKEPRFDYVDRF 300
*****

HIVgag      FKALRAEQATQDVKGWMTETLLVQANPDCKSILKALGSGATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
#3D6 p4     FKALRAEQATQDVKGWMTETLLVQANPDCKSILKALGSGATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
#3D6 p5     FKALRAEQATQDVKGWMTETLLVQANPDCKSILKALGSGATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
#3D6 p6     FKALRAEQATQDVKGWMTETLLVQANPDCKSILKALGSGATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
*****

HIVgag      RVLAEAMSQAQQTNIIMQRGNFRGQKRIKCFNCGKEGHLARNCPAPRKKGCWKCGKEGHQ 420
#3D6 p4     RVLAEAMSQAQQTNIIMQRGNFRGQKRIKCFNCGKEGHLARNCPAPRKKGCWKCGKEGHQ 420
#3D6 p5     RVLAEAMSQAQQTNIIMQRGNFRGQKRIKCFNCGKEGHLARNCPAPRKKGCWKCGKEGHQ 420
#3D6 p6     RVLAEAMSQAQQTNIIMQRGNFRGQKRIKCFNCGKEGHLARNCPAPRKKGCWKCGKEGHQ 420
*****

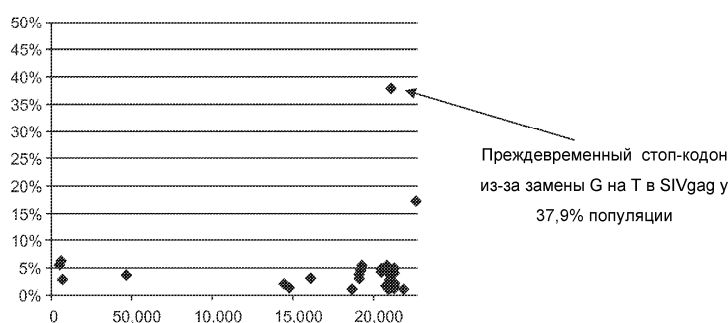
HIVgag      MKDCTERQANFLGKIWFSSKGRPGNFPQSRPEPTAPPAELFGMGEGLASLPKQEQKDREQ 480
#3D6 p4     MKDCTERQANFLGKIWFSSKGRPGNFPQSRPEPTAPPAELFGMGEGLASLPKQEQKDREQ 480
#3D6 p5     MKDCTERQANFLGKIWFSSKGRPGNFPQSRPEPTAPPAELFGMGEGLASLPKQEQKDREQ 480
#3D6 p6     MKDCTERQANFLGKIWFSSKGRPGNFPQSRPEPTAPPAELFGMGEGLASLPKQEQKDREQ 480
*****

HIVgag      VPPLVSLKSLFGNDPLSQ 498
#3D6 p4     VPPLVSLKSLFGNDPLSQ 498
#3D6 p5     VPPLVSLKSLFGNDPLSQ 498
#3D6 p6     VPPLVSLKSLFGNDPLSQ 498
*****!

```

Фиг. 17B

Последовательность следующего поколения вирусной ДНК RhCMV 68-1.2 SIV-гag ΔUL36



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2