

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291001** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.22

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.10.16

(54) **ВЕКТОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **1914984.8; 2009420.7**

(32) **2019.10.16; 2020.06.19**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2020/052620**

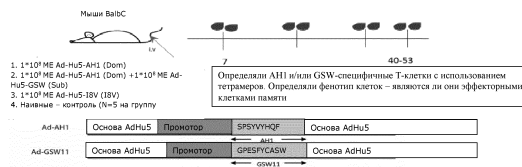
(87) **WO 2021/074648 2021.04.22**

(71) Заявитель:
**КЭНСЕР РИСЕРЧ ТЕКНОЛОДЖИ
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Лээ Лянь Ни, Чиннаканнан Сентхил,
Кленермэн Пол (GB)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(57) Изобретение относится к аденовирусному вектору или аденоассоциированному вирусному вектору, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп, при этом вектор способен индуцировать инфляционный ответ CD8+ Т-клеток памяти, причем указанный вектор не содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую дополнительные ракоспецифичные Т-клеточные эпитопы. Изобретение также относится к способам и применению вектора.



**202291001
A1**

**202291001
A1**

ВЕКТОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Описание

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к векторам, которые способны вызывать инфляционный ответ CD8⁺ Т-клеток памяти. Векторы, вызывающие инфляционный ответ CD8⁺ Т-клеток памяти, подходят для применения при лечении рака. Настоящее изобретение также относится к способам получения векторов и способам индуцирования инфляционного ответа CD8⁺ Т-клеток памяти.

Введение

Противораковые стратегии, направленные на активацию CD8 Т-клеточного звена иммунитета, показали существенную эффективность. Существует немало совпадений между требованиями, касающимися хорошего CD8 Т-клеточного ответа в отношении хронической инфекции с требованиями в отношении рака — ответы должны быть продолжительными, функциональными, стабильными, быть нацеленными на определенный участок и устойчивыми к истощению, возникающему из-за продолжительной стимуляции TCR.

Противораковые вакцины на основе эпитопов представляют собой одну из стратегий, которая использовалась для активации Т-клеточного ответа на специфические антигены, ассоциированные с опухолью. Первоначально использовались пептидные вакцины на основе одного эпитопа, однако они давали слабый клинический ответ, поскольку недостаточно активировали врожденную иммунную систему. Для усиления иммунной активации были разработаны мульти-пептидные вакцины, в которых несколько эпитопов вводили вместе.

Подход, включающий введение нескольких эпитопов, также был реализован с использованием аденовирусных векторов. При использовании аденовирусного вектора, способного кодировать крупные трансгены, можно кодировать и доставлять несколько эпитопов в виде конкатемера (Bei and Scardino, J Biomed Biotechnol 2010; 2010:102758). Альтернативно, можно кодировать и доставлять полноразмерные антигены. Однако, по-прежнему существует потребность в улучшении активации иммунной системы, направленной против раковых клеток.

Сущность настоящего изобретения

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что вектор, кодирующий одиночный ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, называемый здесь минигенным вектором, может индуцировать инфляционный ответ CD8⁺ Т-клеток памяти. Инфляция памяти характеризуется лонгитюдинальным развитием стабильных расширенных пулов CD8⁺ Т-клеток памяти, при этом клетки имеют определенный фенотип и функцию. Инфляционный ответ клеток памяти приводит к образованию долгоживущего пула специфичных к эпитопу Т-клеток, которые остаются широко распространенными и функциональными даже после острой фазы инфекции (Klernerman., Immunol Rev 2018 283(1):99-11). Считается, что особенности инфляционных клеток памяти могут привести к усилению противоопухолевого ответа.

Авторы настоящего изобретения разработали вакцинную платформу на основе аденовирусного вектора AdHu5 с дефектом репликации, в который вставлен только представляющий интерес CD8⁺ Т-клеточный эпитоп. Таким образом, обходятся требования к процессингу антигена, что позволяет развивать инфляционные ответы против эпитопов, которые в иных обстоятельствах являются неинфляционными. В данном описании показано, что однократная праймирующая инъекция вектора приводила к значительному эпитоп-специфичному CD8⁺Т-клеточному ответу, при этом Т-клетки демонстрировали фенотип инфляции памяти. Удивительно, но полученные ответы были долговременными, способными контролировать опухоли даже более чем через 50-90 дней после иммунизации в экспериментах по профилактической иммунизации, а также при введении мышам, уже имеющим опухоли. Указанные ответы детектировались в течение длительного времени при низком содержании PD-1, а также низком содержании ингибиторов контрольных точек Lag-3 и Tim-3. Для сравнения, введение вектора, кодирующего полноразмерный белковый антиген, не приводило к CD8⁺ Т-клеточному ответу такой же величины и того же фенотипа.

Преимущество аденовирусных векторов, как правило, заключается в способности к вместимости больших трансгенов, благодаря удалению одного или нескольких вирусных генов. Сущность предыдущих подходов к вакцинам на основе эпитопов с использованием аденовирусных векторов заключалась в том, что они кодировали несколько Т-клеточных эпитопов в качестве конкатемера. Однако, предложенный здесь подход показал, что продолжительный и устойчивый иммунный ответ может быть вызван аденовирусным вектором (который называется здесь минигенным вектором), содержащим относительно небольшую вставку размером приблизительно 70 п.н. и минимальные энхансерные элементы. Неожиданно было показано, что короткая последовательность нуклеиновой

кислоты транскрибируется *in vivo* и успешно презентуется на молекуле МНС, генерируя пептид-специфические CD8⁺ Т-клетки.

Кроме того, величина и продолжительность Т-клеточного ответа, генерируемого минигеном, гораздо выше на более поздних стадиях после доставки (более 50 дней), чем ранее наблюдаемая для ответов, индуцированных с использованием аденовирусных векторов, содержащих несколько CD8⁺ Т-клеточных эпитопов. Предполагается, что при использовании аденовируса или аденоассоциированного вируса, кодирующего короткую последовательность пептидного эпитопа, кодируемый пептид обходит обычные требования процессинга антигена для презентации на молекуле МНС. Это приводит к Т-клеточному ответу, который проще предсказать, который более стабилен, имеет более широкий спектр, а также более надежен и эффективен.

Указанные минигенные векторы обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными вакцинами на основе пептидов и ДНК-вакцинами. Во-первых, минигены аденовирусного вектора способны индуцировать соответствующие праймирующие ответы (костимуляцию) внутри инфицированной клетки. Это приводит к генерации мощного антиген-специфического CD8⁺ Т-клеточного ответа. ДНК- и пептидные вакцины не способны индуцировать праймирующие ответы, если только они не комбинируются с адьювантом. Во-вторых, минигены аденовирусного вектора способны персистентно инфицировать клетку. Эта характеристика позволяет вектору служить в качестве долгосрочного источника антигена, тем самым поддерживая размер пула антигенспецифических Т-клеток. В-третьих, пептидные и ДНК-вакцины не способны генерировать долговременные антиген-специфические ответы CD8⁺ Т-клеток, если только они не вводятся в виде нескольких прайм-буст (примирующих и стимулирующих) доз и обычно в сочетании с адьювантом. Напротив, при однократной инъекции минигена генерируются крупные пулы долгоживущих антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток. Эти долгоживущие опухолеспецифические CD8⁺ Т-клеточные ответы обнаруживаются в крови и таким образом присутствуют системно. Следовательно, они могут играть важную роль в подавлении микрометастазирования после первичной борьбы с опухолью. Наконец, преимуществом минигенных аденовирусных векторов также является то, что их легко конструировать и получать благодаря простоте вектора и кодируемой последовательности.

Таким образом, изобретение относится к аденовирусному вектору, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, при этом вектор способен индуцировать инфляционный ответ CD8⁺Т-клеток памяти.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к аденовирусному вектору или аденоассоциированному вирусному вектору (AAV), содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп, причем вектор способен индуцировать инфляционный ответ CD8+Т-клеток памяти. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор способен индуцировать продукцию CD8+ Т-клеток, характеризующихся маркерами, выбранными из группы, содержащей CX3CR1+, KLRG-1+, CD44+, CD62L-. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор способен индуцировать продукцию CD8+ Т-клеток, характеризующихся маркерами, выбранными из группы, содержащей CX3CR1+, KLRG-1+, CD44+, CD62L-, CD27 (низкий уровень), CD127 (низкий уровень). В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая ракоспецифичный CD8+ или CD4+ Т-клеточный эпитоп, содержит от 12 до 45 нуклеотидных пар оснований. В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая ракоспецифичный CD8+ или CD4+ Т-клеточный эпитоп, содержит от 24 до 45 нуклеотидных пар оснований. В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп получают из антигена, ассоциированного с опухолью. В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп в раковой клетке мутирован. В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп сверхэкспрессирован в раковой клетке. В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп получен из ассоциированного с опухолью антигена, выбранного из группы, состоящей из TRP-1, CEA, TAG-72, 9D7, Ep-CAM, EphA3, теломеразы, мезотелина, SAP-1 Melan-A/MART-1, тирозиназы, CLPP, циклина-A1, циклина-B1 MAGE-A1, MAGE-C1, MAGE-C2, SSX2, XAGE1b/GAGED2a, CD45, глипикана-3, IGF2B3, калликреина-4, KIF20A, ленгсина, мелоз, MUC5AC, сурвивина, PRAME, SSX-2, NY-ESO-1/LAGE1, gp70, MC1R, TRP-1/-2, β -катенина, BRCA1/2, CDK4, фетального белка SIM1. В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ или CD4+ Т-клеточный эпитоп содержит SEQ ID NO:1 (SPSYVYHQF) или SEQ ID NO:2 (SLLMWITQC). В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп специфичен в отношении колоректального рака, рака предстательной железы, рака пищевода, рака печени, рака почки, рака легких, рака молочной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака головного мозга, гепатоцеллюлярного рака, лимфомы, лейкемии, рака желудка, рака шейки матки, рака яичников, рака щитовидной железы, меланомы, карциномы, рака головы и шеи, рака кожи, рака

носоглотки, рака, вызванного вирусом Эпштейна-Барра, рака, вызванного вирусом папилломы человека, и саркомы мягких тканей. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор относится к человеческому серотипу 5 (AdHu5). В одном из вариантов осуществления изобретения вектор содержит CMV промотор. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор содержит ТАТА-бокс. В одном из вариантов осуществления изобретения в векторе отсутствуют белки E1 и E3. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор не содержит никакой дополнительной нуклеотидной последовательности, кодирующей ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп. Таким образом, вектор включает нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, и может содержать другие элементы вектора, необходимые для транскрипции нуклеиновой кислоты, но он не включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ракоспецифичный эпитоп, который не является CD8⁺ Т-клеточным эпитопом, например, CD4⁺ Т-клеточный эпитоп. Более того, он включает не более одного ракоспецифичного CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеточного эпитопа. Таким образом, исключается наличие в векторе нескольких противораковых Т-клеточных эпитопов. Исключается как присутствие нескольких копий одного и того же противоракового Т-клеточного эпитопа, так и копий разных противораковых Т-клеточных эпитопов. Вектор не содержит конкатемер, который представляет собой длинную непрерывную молекулу ДНК, которая содержит несколько последовательно соединенных копий одного и того же ракоспецифичного Т-клеточного эпитопа.

В одном из аспектов изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей вектор по изобретению.

В одном аспекте изобретение относится к иммуногенной композиции или вакцинной композиции, содержащей по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, до 20, 30, 40 или 50 векторов по изобретению.

В еще одном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор по изобретению или иммуногенную композицию по изобретению.

В следующем аспекте изобретение относится к вектору или композиции по изобретению для применения в терапии.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения или профилактики рака, включающему введение терапевтически эффективного количества вектора или композиции по изобретению.

В следующем аспекте изобретение относится к способу индукции инфляционного ответа CD8⁺ Т-клеток памяти, включающему стадию введения терапевтически

эффективного количества вектора или композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, при этом CD8⁺ Т-клетки характеризуются маркерами, выбранными из группы, содержащей CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺ и CD62L⁻.

В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения описанного выше вектора, включающему стадии:

- i) синтез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей эпитоп, в качестве смыслового и антисмыслового праймера,
- ii) клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность эпитопа, в первую плазмиду,
- iii) клонирование последовательности, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую эпитоп, во вторую плазмиду, содержащую аденовирусную ДНК.

В еще одном аспекте изобретение относится к набору, содержащему вектор по изобретению, один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант и необязательно инструкцию по применению.

В одном из аспектов изобретение относится к способу индукции Т-клеточного иммунного ответа против ракоспецифичного CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточного эпитопа у животного, включающему приведение клетки в контакт с вектором или композицией по изобретению.

Описание чертежей

Фиг. 1. Иммунизация Balb/c мышей вектором AdHu5 с дефицитом репликации, кодирующим АН1 CD8⁺ Т-клеточный опухолевый эпитоп, стимулирует устойчивый CD8⁺ Т-клеточный ответ на периферии.

(А) Схематическое представление конструкций, используемых для получения вектора AdHu5, экспрессирующего МНС-1, связывающий СТ26-специфический раковый эпитоп.

(В) Диаграммы FACS, показывающие % CD8⁺ АН1 тетрамер⁺ (tet⁺) клеток в крови мышей, вакцинированных АН1 (слева) и Ad-I8V (справа).

(С) АН1-тетрамер-специфичные CD8⁺ Т-клеточные ответы в крови на 7-й день (слева) и 50-й день (справа) из двух независимых экспериментов.

(D) Диаграммы FACS, показывающие присутствие указанных маркеров в популяциях CD8⁺ АН1-tet⁺ (слева) и АН1-tet⁻ (справа) в крови из того же образца.

(E) Фенотип AN1-tet⁺ CD8⁺ Т-клеток в сравнении с AN1-tet-CD8⁺ Т-клетками из тех же групп на 7-й день (слева) и 50-й день (справа) из двух независимых экспериментов. Geo MFI = средняя геометрическая интенсивность флуоресценции.

Фиг. 2. AN1-специфические Т-клетки, вызывающие инфляцию памяти, демонстрируют ингибирование роста опухоли СТ26 у мышей Balb/c как после профилактической, так и после терапевтической вакцинации с использованием Ad-AN1.

(A) Экспериментальная схема профилактической вакцинации (независимо выполнена дважды, P1 и P2) и терапевтической вакцинации (T1). Звездочка указывает на наличие пальпируемых опухолей.

(B-D) Кривые роста опухоли для разных групп (N=5 на группу) для схем профилактической (P1 и P2) (фиг. B и C) и терапевтической вакцинации (T1) (фиг. D). На графике T1 стрелка указывает момент времени вакцинации. Мыши, вакцинированные Ad-AN1 (1×10^8 ME), показаны зеленым цветом, Ad-AN1 в низкой концентрации (1×10^7 ME) — оранжевым, Ad-AN1 (1×10^8 ME) + Ad-GSW11 (1×10^8 ME) - красным, Ad-GSW11 (1×10^8 ME) сиреневым, Ad-I8V (1×10^8 ME) серым, а наивные мыши - черным цветом. TF = без опухоли.

(E, G, L) Статистически значимые различия в размерах опухолей между группами на 18-й день после заражения. Точками обозначены отдельные мыши.

(F, H, J) Графики показывают наклон кривых роста опухоли, определенных с помощью линейной регрессии, начиная от дня, когда опухоли демонстрируют явный рост опухоли (7-й день после заражения для контрольных животных и 18-й день после заражения для мышей, вакцинированных Ad-AN1).

(K) Для определения удельной скорости роста была пересчитана скорость роста опухоли. Скорость роста опухоли между имплантацией и гуманной конечной точкой количественно определяли с использованием параметра удельной скорости роста (SGR - specific growth rate, %/день), рассчитанного по следующему уравнению:

[15] $SGR = \ln (V2/V1)/(t2 - t1)$, где V1 и V2 представляют собой объемы опухоли через один день после имплантации (V1 был зафиксирован на уровне 0,01 мм) (t1 = день 0) и в конечной точке (t2), соответственно.

Фиг. 3. AN1-специфические CD8⁺ Т-клетки опухоли и селезенки различаются как по численности, так и по фенотипу.

(A) Репрезентативные диаграммы FACS, показывающие % (CD8⁺AN1-tet⁺) клеток в опухоли (верхняя панель) и селезенке (нижняя панель) мышей, вакцинированных Ad-AN1. В качестве отрицательного контроля образцы опухоли и селезенки окрашивали полным набором антител, конъюгированных с флуорохромом, и нерелевантным H2-Ld-

связывающим тетрамером (pp89) для образцов опухоли или без тетрамера для образцов селезенки (без tet).

(B) На диаграммах показан $\%$ (CD8⁺ AN1-tet⁺) клеток в опухоли (верхняя панель) и селезенке (нижняя панель) у профилактически (левая панель) и терапевтически (правая панель) вакцинированных мышей.

(C) Тепловая карта, показывающая фенотип AN1-специфических CD8⁺ Т-клеток в опухоли и селезенке профилактически вакцинированных (Ad-AN1) и контрольных мышей (Ad-I8V и наивные). Значения в ячейках указывают среднее из двух независимых экспериментов (N=5-10). Маркеры, которые определяли с помощью геометрической MFI, были нормализованы по шкале от 0 до 100%.

Фиг. 4. (A) Оказалось, что в опухолях мышей, вакцинированных Ad-AN1, количество регуляторных Т-клеток (CD4⁺ FoxP3⁺ клеток) было ниже по сравнению с контрольными мышами, как после профилактической (слева), так и после терапевтической вакцинации (справа). Данные мышей, вакцинированных Ad-AN1 и Ad-AN1 + Ad-GSW11, группировали также, как для мышей, вакцинированных Ad-I8V, и наивных мышей (обозначены как вакцинированные и контрольные, соответственно).

(B) Иммунизация AdHu5-AN1-MG увеличивает процент Trm tet⁺ клеток в опухоли. Мыши, иммунизированные AdHu5-AN1-MG, или по отдельности или в комбинации, показали увеличенный процент AN-1 специфических CD8 Т-клеток в опухоли (TIL) с фенотипом резидентной памяти по сравнению с контрольными мышами (наивными или иммунизированными нерелевантными конструкциями AdHu5 (AdHu5-I8V-MG или AdHu5-GSW11)).

Фиг. 5. Иммунизация AdHu5-AN1-MG индуцирует AN-1+CD8 Т-клетки в селезенке, которые остаются функциональными во время роста опухоли. Спленоциты и TIL стимулировали пептидом AN-1 для измерения их цитотоксического потенциала на основе секреции IFN-гамма. AN-1-специфические спленоциты иммунизированных животных способны отвечать на пептидную стимуляцию (A и B). Напротив, CD8 Т-клетки в TIL не отвечали на пептидную стимуляцию (C и D); однако уровни IFN-гамма, секретируемого в ответ на РМА-иономицин, также были низкими, что указывает на подавление CD8 Т-клеток в опухоли в целом.

Фиг. 6. (A) На рисунках показана корреляция между наклоном кривой роста опухоли для каждого животного (обозначена точкой) и процентным содержанием CD8⁺ AN-1-специфических Т-клеток в его крови (слева), селезенке (посередине) и абсолютное количество CD8⁺ AN1 tet⁺ клеток в опухоли (справа). Данные показаны для двух независимых профилактических (P1 и P2) и одного терапевтического (T1) эксперимента.

Более низкая скорость роста опухоли коррелирует с повышенным уровнем АН1-специфических CD8⁺ Т-клеток в селезенке и крови после заражения опухолью, но слабо коррелирует с абсолютным количеством АН-1-специфических CD8 Т-клеток в опухоли.

(В) Показано сравнение антиген-специфических клеток из различных компартментов с определенными скоростями роста.

Фиг 7. (А) Терапевтическая иммунизация вектором AdHu5, кодирующим полноразмерный gp90 (AdHu5-gp90FL), не дает аналогичного уровня контроля опухоли. Удельную скорость роста опухолей в каждой группе сравнивали с использованием критерия Манна-Уитни. *p<0,05, **p<0,005

(В) Мыши, которые избавились от опухоли с помощью терапевтической и профилактической иммунизации, продолжают нести АН-1-специфические клетки в кровотоке. Кровь мышей, у которых за 6 месяцев до этого полностью исчезли опухоли, брали и окрашивали тетрамерами для определения АН1+ CD8 Т-клеток.

Фиг. 8. У мышей ННД, иммунизированных минигеном AdHu5-NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅, развивается долгоживущая циркулирующая популяция NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺ CD8 Т-клеток с фенотипом инфляции памяти.

(А) Уровни NY-ESO-1-157-165 Tet⁺ клеток измеряли путем окрашивания тетрамерами в крови после того, как группы мышей ННД (N=4-5 в группе) были иммунизированы 1×10⁸ МЕ AdHu5-NY-ESO-1mini или 1×10⁹ МЕ AdHu5-NY- ESO-1-FL. Представлено схематическое изображение используемых конструкций. Эти клетки были фенотипированы путем поверхностного окрашивания с использованием (В) CD44 и CD62L для определения субпопуляции памяти, маркеров инфляционных клеток (С) CX3CR1 и (D) KLRG-1, маркеров истощения, (Е) PD-1, (F) Tim3 и (G) Lag-3. Показанные результаты получены на группах из 4-5 мышей в 1 из 2 независимых экспериментов.

Фиг. 9. У мышей, примированных однократной дозой минигена AdHu5-NY-ESO-1-157-165, образуется более высокий процент циркулирующих NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺ CD8 Т-клеток после заражения опухолью, и они лучше контролируют рост опухоли.

(А) Через 53 (сплошная линия) или 99 (пунктирная линия) дней после иммунизации 1×110⁸ МЕ AdHu5-NY-ESO-1mini или 1×10⁹ МЕ AdHu5-NY-ESO-1-FL, животным подкожно (s.c.) вводили либо 1×10⁶ (сплошная линия), либо 5×10⁵ (пунктирная линия) ННД-NY-ESO-1 клеток саркомы. В качестве отрицательного контроля группы мышей иммунизировали 1×10⁸ МЕ нерелевантного AdHu5-минигена (N=5) или оставляли наивными (N=10). Опухоли измеряли каждые 1-2 дня с помощью цифровых штангенциркулей.

(B) Уровни циркулирующих NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺ клеток измеряли в крови, взятой через 14 дней после заражения опухолью, с использованием окрашивания тетрамерами.

(C) Показаны уровни NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺, определенные в крови до заражения опухолью, в сравнении с размером опухолей, измеренным в начале (день 14) и (D) в конце, в день 27/28. Статистические измерения проводились с помощью Т-тестов. Приведенные данные взяты из двух отдельных независимых экспериментов.

Фиг. 10. NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺ CD8 Т-клетки опухолей (TIL) демонстрируют повышенные уровни маркеров истощения и активации. Мышей умерщвляли, когда достигалась гуманная конечная точка, которую определяли либо по незаживающим изъязвлениям, либо когда опухоли приближались к размеру 1300 мм³, селезенки и опухоли удаляли и анализировали. Лимфоциты выделяли из обоих компартментов и (A) измеряли процент CD8 Т-клеток. Также (B) определяли процентное содержание NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺ клеток в организме, а также уровни маркеров истощения (C) PD-1, (D) Tim-3 и (E) Lag-3 и маркера апоптоза (F) FasL.

Фиг 11. Активация CX3CR1 преимущественно происходит на NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ Tet⁺ CD8 Т-клетках в селезенке и TIL после иммунизации минигеном AdHu5-NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅. Лимфоциты, выделенные из TIL или селезенки при достижении гуманной конечной точки, окрашивали тетрамером и определяли уровни следующих молекул на клетках Tet⁺. Маркер инфляции CX3CR1 в (A) селезенке и (B) в TIL. (C) Маркеры фенотипа эффекторной памяти, CD44 и CD62L, и (D) маркеры резидентной памяти CD103 и CD69. (E) Уровни CD4⁺ регуляторных Т-клеток (Treg) в обоих компартментах также определяли с помощью внутриклеточного окрашивания.

Фиг. 12. CX3CR1⁺ CD8 Т-клетки более устойчивы к окислительному стрессу и содержат более высокие уровни здоровых поляризованных митохондрий.

(A) Уровни внутриклеточных активных форм кислорода (ROS) в CX3CR1⁺/-gfp спленоцитах мышей, инфицированных Ad-lacZ или MCMV, определяли на 50-й день после заражения с помощью CellROX Red анализа. (N = 2, независимые эксперименты).

(B) Лимфоциты периферической крови C57BL/6 мышей, инфицированных MCMV или рекомбинантным аденовектором AdHu5 (Ad-I8V) >100 дней назад, окрашивали с помощью MitoTracker Green (обнаруживает все митохондрии) и MitoTracker DeepRed (обнаруживает только здоровые, поляризованные митохондрии), затем поверхность окрашивали анти-мышинным CD8, анти-мышинным CX3CR1, LiveDead nearIR Fixable маркером, и затем анализировали на LSRII, а данные рассчитывали на FlowJo. Антиген-специфические CX3CR1⁺ инфляционные клетки содержат более здоровые митохондрии и демонстрируют повышенную окислительно-восстановительную устойчивость.

(D) и (E) показывают, что при инкубации в среде, не содержащей сыворотки (т. е. в условиях стресса), наблюдалась заметная выживаемость CX3CR1+ популяции по сравнению с CX3CR1-отрицательными Т-клетками (фиг. D) в основной и антиген-специфической популяциях (фиг. E). Фиг (F) показывает уровни активных форм кислорода (ROS) при сывороточном голодании, указывая на то, что CX3CR1+ Т-клетки (основные и антиген-специфические) действительно обладают более низкими уровнями активных форм кислорода и более устойчивы к окислительному стрессу.

Фиг. 13. Профилактическая иммунизация минигенным вектором HPV16 E7₄₉₋₅₇ обеспечивает защиту от заражения опухолью. E7₄₉₋₅₇-специфические клетки способны проникать в участок имплантации опухоли и обеспечивать защиту от заражения опухолью.

Фиг. 14. Синергический эффект после иммунизации панелью минигенов, кодирующих CD8 Т-клеточные эпитопы против MCMV, в субоптимальной дозе. Была создана панель из 3 минигенов против известных MCMV-специфических CD8 Т-клеточных эпитопов, а именно: M45 (⁹⁸⁵HGIRNASFI⁹⁹³), M38 (³¹⁶SSPPMFRV³²⁵) и m139 (⁴¹⁹TWYGFCLL⁴²⁶). Их вводили внутривенно C57BL/6 мышам либо в виде отдельных минигенов, либо в виде коктейля. Минигены, кодирующие M38 и M139, вводили в субоптимальной дозе 1×10^7 инфекционных единиц (МЕ), тогда как миниген, кодирующий M45, вводили в оптимальной дозе 1×10^8 МЕ. Измеряли уровни M38-специфических клеток в крови на 6й день после иммунизации. Удивительно, но у мышей, которым вводили комбинированную минигенную вакцину, содержащую M38- и m139-минигенные векторы в субоптимальных дозах, плюс M45-миниген в оптимальной дозе, вырабатывались более высокие уровни M38-специфических Т-клеток по сравнению с группами, которым вводили субоптимальную дозу только M38-минигенного вектора. Этот неожиданный результат подтверждает, что доставка смеси минигенных векторов в субоптимальных дозах может иметь аддитивный эффект в отношении увеличения количества антиген-специфических Т-клеток по сравнению с наблюдаемым при иммунизации одним единственным вектором.

Фиг. 15. Т-клетки CD8 из опухолей мышей, иммунизированных AdHu5-AH1-MG, экспрессируют более высокие уровни гранзима-В. На фиг. 15А показаны уровни гранзима В в общем количестве CD8 Т-клеток в опухолях через 23 дня после имплантации, через 16 дней после иммунизации и размеры опухоли во время анализа. На фиг. 15В показаны уровни транскрипционных факторов T-bet и Eomes в AH1-специфических CD8 Т-клетках в опухолях через 23 дня после имплантации, через 16 дней после иммунизации.

Фиг. 16. Тестирование минигена GP70₄₂₃₋₄₃₁ (AH1) в качестве терапевтической вакцины в комбинации с анти-PD-L1. На фиг. 16А показаны группы мышей, иммунизированных указанными аденовекторами через 7 дней после заражения опухолью,

а затем обработанных анти-PD-L1 или изотипическим контролем. Показаны размеры опухолей отдельных мышей. На фиг. 16B показана кривая выживания всех групп мышей. На фиг. 16C показан процент GP70₄₂₃₋₄₃₁ (AH1) Tet⁺ клеток в кровотоке через 15 дней после иммунизации (22 дня после заражения опухолью). Фиг. 16D показывает сравнение удельной скорости роста опухолей в каждой группе с использованием критерия Манна-Уитни. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Фиг. 17.

17 A, B, C, D. Отдельные клетки, полученные из селезенки и опухоли в результате профилактической (A, C) или терапевтической (B, D) вакцинации, *ex vivo* стимулировали пептидом AH1 (4 мкг/мл) или РМА-иономицином (IO) в течение 7 часов, а затем окрашивали для определения внутриклеточной продукции цитокина IFN γ . Для каждого образца вычитали низкий уровень фоновой активации (только среда).

17 E-H. Селезенка и отдельные клетки опухоли, полученные в результате терапевтической вакцинации в комбинации с анти-PD-L1, *ex vivo* стимулировали пептидом AH1 (4 мкг/мл) или РМА-иономицином (IO) в течение 7 часов, а затем окрашивали для определения внутриклеточной продукции цитокинов IFN γ . Для каждого образца вычитали низкий уровень фоновой активации (только среда). Показан ответ CD8 Т-клеток в селезенке (17E) и опухоли (17G), а также ответ CD4 Т-клеток в селезенке (17F) и опухоли (17H).

Фиг. 18. Пилотный эксперимент для определения, улучшат ли контроль над опухолью два минигена, кодирующих два опухолевых антигена. На фиг.18A показан используемый протокол — имплантацию опухоли проводили в день 0, вакцинацию одним из минигенов AdHu5-AH1 (MG), AdHu5-e2F8-27mer MG, Combo (оба MG — AdHu5-AH1 и AdHu5-e2F8-27mer), нерелевантным AdHu5-MG - на 7-й день, или оставляли невакцинированными, N=6 на группу лечения. Половине каждой группы вводили ингибитор контрольной точки анти-PD-1, а половине группы вводили изотипический контроль в 12, 16 и 19 день после имплантации. Кровь брали на 13 и 20 день. На фиг. 18 B, C, D, E и F показан рост опухоли в зависимости от времени.

Фиг. 19. Показывает сравнение комбинированного лечения минигеном плюс anti-PD-1 с отрицательным контролем и вакцинацией одним минигеном.

Фиг. 20. Скорость роста опухолей в случаях комбинированного лечения минигеном, лечения одним минигеном и отрицательного контроля, рассчитанная с помощью линейной регрессии.

Фиг. 21. % (CD8⁺ AH1-tet⁺) клеток и % (CD8⁺ ef28-tet⁺) клеток, полученных в результате вакцинации с использованием комбинации минигенов и вакцинации

отдельными минигенами AdHu5-AH1 и AdHu5-e2F8-27mer, измеренные через 6 дней после вакцинации.

Фиг. 22. Одновременная внутривенная иммунизация двумя минигенными конструкциями/вакцинами (combo - AdHu5-AH1 и AdHu5-e2F8) индуцирует обе антиген-специфические популяции в аналогичных количествах и с аналогичным фенотипом по сравнению с одной вакциной, измерения проводили через 11 дней после вакцинации.

Фиг. 23. Показана иммунизация двумя минигенами, нацеленными на CD8 Т-клеточные эпитопы (AdHu5-AH1 и AdHu5-e2F8) в раковой клетке, контролирующая рост опухоли. Данные линейной регрессии на фиг. 20 были пересчитаны как удельная скорость роста.

Фиг. 24. Транскрипционное профилирование нетрадиционного подмножества Т-клеток памяти: инфляция Т-клеток памяти.

(А) PCA инфляционных/неинфляционных CD8 Т-клеток. 3D PCA, показывающий распределение профилей транскрипции двух независимых моделей инфляционных образцов (M38, D8V — более поздние стадии, т. е., инфляция памяти, обведено синим) и неинфляционных образцов (M45, I8V — более поздние стадии, т. е., центральная память, обведено серым), на острой стадии (7-й или 21-й день) и более поздних стадиях (50-й или 100-й день), а также наивных образцов.

(В) PCA истощенных/неистощенных CD8 Т-клеток. 3D PCA, показывающий распределение профилей транскрипции модели истощения (C113, треугольники - 30-й день обведены зеленым), с неистощенными образцами (кружочки - 30-й день обведены синим) на разных стадиях и наивными образцами. Стадии: 6 дней (желтый), 8 дней (коричневый), 15 дней (розовый), 30 дней (черный), наивные (зеленый).

Фиг. 25. Подмножество инфляционных клеток памяти экспрессирует определенный генный модуль, отличающийся от других подмножеств Т-клеток памяти.

(А) Анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов инфляционных образцов. Анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов выявил 6 генных модулей (мера связности (merging distance) = 0,25, параметр мягкого порога (soft-thresholding power) $\beta = 9$); гены синего модуля (выделены) обогащены иммунно-релевантными GO терминами и содержат релевантные гены, такие как Tbx21, Eomes, Zeb2 и E2f2.

(В) PCA инфляционных/истощенных образцов на основе генов синего модуля. Диаграмма PCA с использованием первых трех основных компонентов и на основе набора генов из 588 генов, определенных как синий модуль в сетевом анализе коэкспрессии генов только для инфляционных образцов. На диаграмме показано распределение Наивных (зеленый), Неинфляционных и Неистощенных (синий), Инфляционных и Истощенных

(красный) образцов (кружки: исследование истощения; четырехугольники: исследование инфляции) (инфляционные клетки памяти обозначены красными четырехугольниками, обведенными синим).

(С) Иерархическая кластеризация инфляционных/истощенных образцов на основе генов синего модуля. Дендрограмма, показывающая анализ кластеризации образцов (Евклидово расстояние) на инфляционных/истощенных объединенных наборах, основанный на наборе из 469 генов, определенных как синий модуль в повторном анализе сетей коэкспрессии генов инфляционных образцов после удаления выбросов (параметр мягкого порога $\beta=20$). Кластер инфляции памяти обведен прямоугольником.

Фиг. 26. (А) Показана схема аденовируса AdHu5 с кассетой минигенного иммуногена и увеличенный вид кассеты минигенного иммуногена.

(В) Показана схема AAV ITR с кассетой минигенного иммуногена и увеличенный вид кассеты минигенного иммуногена.

Подробное описание настоящего изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано дополнительно. В следующих абзацах более подробно определяются различные аспекты настоящего изобретения. Каждый определенный таким образом аспект может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или дающий преимущество, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или дающие преимущество. При осуществлении настоящего изобретения на практике, если не указано иное, будут использоваться обычные методы иммунологии, молекулярной биологии, химии, биохимии и технологии рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Такие методики полностью описаны в литературе, см., например, Green and Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что аденовирусный вектор, кодирующий одиночный ракоспецифичный эпитоп, приводит к инфляционному ответу CD8⁺ Т-клеток памяти. Термин инфляционный ответ клеток памяти относится к продолжительному, функциональному, стабильному ответу CD8⁺ Т-клеток. Полученный пул CD8⁺ Т-клеток обладает устойчивостью к истощению, которое может возникнуть из-за продолжительной стимуляции TCR. Истощение Т-клеток может характеризоваться активацией таких маркеров, как PD-1, Tim-3 и Lag-3.

Инфляционные CD8⁺ Т-клетки памяти характеризуются уникальным фенотипом по сравнению с другими подмножествами CD8⁺ клеток памяти, включая экспрессию маркеров CX3CR1 и KLRG-1. Клетки также демонстрируют профиль транскрипции, отличающийся как от подгрупп Т-клеток центральной памяти, так и от истощенных Т-клеток памяти. Клетки также демонстрируют такие особенности, как повышенная устойчивость к окислительно-восстановительным процессам, которая может быть связана с изначально более низкими уровнями активных форм кислорода и устойчивостью к окислительному стрессу. В частности, профиль транскрипции управляется фактором транскрипции Tbx21 с минимальным вкладом Eomes. Это приводит к фенотипу долгоживущих CD8⁺ Т-клеток, которые присутствуют в периферических органах в большом количестве, сохраняя при этом эффекторную функцию. Антиген-специфические инфляционные CD8⁺ Т-клетки памяти развиваются благодаря уникальному набору условий процессинга, презентации и костимуляции. Процессинг эпитопа происходит независимо от иммунопротеасомы, а презентация негематопоезическими нетрадиционными APC на более поздних стадиях может способствовать сохранению этого фенотипа. Без связи с какой-либо теорией, можно предположить, что при использовании вектора по настоящему изобретению, который кодирует единственный представляющий интерес эпитоп, удастся обойти требования процессинга антигена, что приводит к инфляционному ответу клеток памяти.

В одном варианте осуществления изобретение относится к аденовирусному вектору, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, при этом вектор способен индуцировать инфляционный ответ CD8⁺ Т-клеток памяти. В еще одном варианте осуществления изобретения аденовирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный эпитоп CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток, например, одиночный ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, и вектор не содержит каких-либо дополнительных ракоспецифичных CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточных эпитопов. Таким образом, вектор по настоящему изобретению кодирует одиночный ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, например, ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп. Настоящее изобретение не распространяется на аденовирусные векторы, кодирующие более одного или несколько ракоспецифичных CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточных эпитопов.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к аденовирусному вектору, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, при этом вектор способен индуцировать инфляционный ответ CD8⁺ Т-клеток памяти. В одном варианте осуществления изобретения

аденовирусный вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, и вектор не содержит каких-либо дополнительных ракоспецифичных CD8⁺ Т-клеточных эпитопов. Таким образом, аденовирусный вектор по настоящему изобретению кодирует одиночный ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп. Настоящее изобретение не распространяется на аденовирусные векторы, кодирующие более одного или несколько одиночных ракоспецифичных CD8⁺ Т-клеточных эпитопов.

Вектор по настоящему изобретению, который кодирует один ракоспецифичный CD8⁺Т-клеточный эпитоп, способен генерировать продолжительный, функциональный, стабильный CD8⁺Т-клеточный ответ после однократной дозы. Полученный пул CD8⁺ Т-клеток обладает устойчивостью к истощению, которое может возникнуть из-за продолжительной стимуляции TCR. Полученный пул CD8⁺ Т-клеток может также демонстрировать повышенную окислительно-восстановительную устойчивость и низкие уровни активных форм кислорода.

Используемый здесь термин «вектор» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, способной транспортировать в клетку другую нуклеиновую кислоту, с которой связана последовательность вектора. Векторы по настоящему изобретению являются аденовирусными и содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп, при этом генная конструкция содержится в форме, подходящей для экспрессии клеткой (например, соединенной с транскрипционным элементом контроля).

Используемый здесь термин «эпитоп» относится к части антигена, распознаваемой иммунной системой, которая может представлять собой короткую белковую последовательность. «Ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп» относится к эпитопу, который может быть презентируван антигенпрезентирующей клеткой, связанной с молекулой МНС, который затем распознается Т-клеточным рецептором (TCR). CD4⁺ Т-клетки экспрессируют корецептор CD4, который связывается с МНС II и распознает пептиды, презентируемые молекулами МНС II. CD8⁺ Т-клетки экспрессируют корецептор CD8, который связывается с МНС I и распознает пептиды, презентируемые молекулами МНС I.

Инфляционные Т-клетки памяти могут быть охарактеризованы наличием специфических маркеров и маркеров клеточной поверхности. Способы идентификации и определения количества этих маркеров хорошо известны в данной области. Примеры подходящих методов включают, но не ограничены следующими: методы разделения на основе аффинности, методы магнитной сортировки клеток, методы сортировки клеток на

основе флуоресценции, такие как FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией). Инфляционные CD8⁺ Т-клетки памяти могут характеризоваться присутствием ряда маркеров, например, включая, но не ограничиваясь CX3CR1, KLRG-1, CD44. Инфляционные CD8⁺ Т-клетки памяти также могут характеризоваться низкой экспрессией ряда маркеров, например, включая, но не ограничиваясь CD62L, CD27, CD127. Термин «низкая экспрессия» может относиться к клеткам, в которых экспрессия маркеров отсутствует, а также к клеткам, в которых экспрессия маркеров ниже, чем в других клетках в этом образце.

В одном из вариантов осуществления изобретения инфляционные CD8⁺ Т-клетки памяти характеризуются маркерами, выбранными из группы, включающей CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺, CD62L⁻, где обозначение (+) указывает на присутствие маркера, а обозначение (-) указывает на низкую экспрессию или отсутствие экспрессии маркера. В тех случаях, когда обозначение (-) означает низкую экспрессию, оно может быть дополнено указанием «(низкий уровень)». Инфляция CD8⁺ Т-клеток памяти может характеризоваться маркерами, выбранными из группы, включающей CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺, CD62L⁻, CD27⁻(низкий уровень), CD127⁻(низкий уровень).

Инфляционные CD8⁺Т-клетки памяти могут характеризоваться фенотипом CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺, CD62L⁻. Инфляционные Т-клетки памяти CD8⁺ могут характеризоваться фенотипом CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺, CD62L⁻, CD27⁻(низкий уровень), CD127⁻(низкий уровень).

CD8⁺ Т-клетки, продуцируемые в ходе инфляционного ответа памяти, могут иметь ряд других характеристик. Например, клетки имеют профиль транскрипции, управляемый Tbx21 (также называемый T-bet). Эти клетки демонстрируют продолжительную экспрессию Tbx21. Клетки могут также демонстрировать продолжительную экспрессию E2f2, фактора транскрипции, обычно участвующего в росте и пролиферации клеток. Клетки также могут не экспрессировать или экспрессировать низкие уровни транскрипционного фактора Eomes.

Инфляционные CD8⁺Т-клетки памяти могут не демонстрировать обычного сокращения после воздействия антигена. Во время классической эволюции памяти после воздействия антигена клетки образуют сокращенный пул клеток центральной памяти, который составляет <1% от общего числа циркулирующих CD8⁺ Т-клеток. Однако инфляционные клетки памяти сохраняются в виде больших пулов клеток, которые циркулируют в крови. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения полученные в результате инфляционные CD8⁺ Т-клетки памяти составляют от приблизительно 2% до приблизительно 20% от общего числа CD8⁺ Т-клеток,

предпочтительно от приблизительно 8% до приблизительно 20% от общего числа CD8+ Т-клеток, более предпочтительно от приблизительно 12% до приблизительно 20% от общего числа CD8+ Т-клеток.

В одном варианте осуществления изобретения большие пулы инфляционных CD8+ Т-клеток памяти сохраняют свой эффекторный фенотип памяти. Образующиеся в результате инфляционные CD8+Т-клетки памяти могут сохранять свой эффекторный фенотип памяти в течение длительного периода, при этом эффекторный фенотип характеризуется CD44+, CD62L-. Инфляционные CD8+ Т-клетки памяти могут сохранять свой эффекторный фенотип памяти до 60 дней после воздействия вектора по настоящему изобретению, до 55 дней после воздействия вектора по настоящему изобретению, до 50 дней после воздействия вектора по настоящему изобретению, до 40 дней после воздействия вектора по настоящему изобретению или до 30 дней после воздействия вектора по настоящему изобретению.

Также в инфляционных CD8+ Т-клетках памяти могут отсутствовать маркеры истощения. Истощение Т-клеток может произойти из-за чрезмерной стимуляции TCR (Т-клеточного рецептора). Маркеры истощения Т-клеток могут включать активацию таких маркеров, как PD-1, Tim-3, Lag-3. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения в инфляционных CD8+ Т-клетках памяти маркеры, выбранные из группы, состоящей из PD-1, Tim-3, Lag-3, могут отсутствовать или демонстрировать низкую экспрессию.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая одиночный ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп, может содержать от приблизительно 12 до приблизительно 45 пар оснований; в другом варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность может содержать приблизительно от 15 до приблизительно 45 пар оснований, в еще одном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность может содержать приблизительно от 18 до приблизительно 45 пар оснований, в еще одном варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность может содержать приблизительно от 21 до приблизительно 45 пар оснований, в предпочтительном варианте осуществления нуклеотидная последовательность может содержать приблизительно от 24 до приблизительно 45 пар оснований. Таким образом, вектор кодирует одиночный ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп, содержащий от приблизительно 5 до приблизительно 15 аминокислот, в другом варианте осуществления изобретения вектор кодирует эпитоп, содержащий от приблизительно 6 до приблизительно 15 аминокислот, в другом варианте осуществления вектор изобретения вектор кодирует

эпитоп, содержащий от приблизительно 7 до приблизительно 15 аминокислот, в предпочтительном варианте осуществления изобретения вектор кодирует эпитоп, содержащий от приблизительно 8 до приблизительно 15 аминокислот.

Одиночный ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп является иммуногенным эпитопом, поскольку он вызывает иммунный ответ. Чтобы инициировать последующий иммунный ответ, Т-клеточные эпитопы связываются с главным комплексом гистосовместимости. Таким образом, в варианте осуществления изобретения эпитоп способен связываться и презентироваться на молекуле МНС. В данной области техники известно множество способов идентификации эпитопов, которые связываются с МНС и, вследствие этого, вызывают иммунный ответ. Такие методы включают в себя модели предсказания связывания пептид-МНС, для которых существует множество общедоступных программ.

В одном варианте осуществления изобретения одиночный ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп получают из антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА - tumour associated antigen). ТАА представляет собой антигенный продукт, продуцируемый при раке, и он является биомаркером для целенаправленной идентификации опухоли. В целом, ТАА можно разделить на абберрантно экспрессируемые аутоантигены, мутантные аутоантигены и опухолеспецифические антигены. Таким образом, ТАА может иметь повышенную экспрессию или быть сверхэкспрессирован в раковой клетке. ТАА может быть мутирован в раковой клетке. ТАА может быть специфичным для раковой клетки и экспрессироваться только внутри раковой клетки, его также можно назвать опухолеспецифичным антигеном.

В одном варианте осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп мутирован в раковой клетке. В одном варианте осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп сверхэкспрессирован в раковой клетке. В одном варианте осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп представляет собой некодирующий опухолеспецифичный эпитоп. Используемый здесь термин «некодирующий опухолеспецифичный эпитоп» относится к пептиду, обнаруживаемому в раковой клетке, при этом пептид получен из нуклеотидной последовательности, которая эпигенетически супрессирована в здоровых клетках. Такие пептидные последовательности абберрантно экспрессируются в опухолевых клетках.

В одном варианте осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп не является скрытым эпитопом. Используемый здесь термин «скрытый

эпитоп» относится к эпитопу, который не является иммуногенным у иммунокомпетентных индивидуумов.

В одном варианте осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может представлять собой вирусный эпитоп, связанный с раком, вызванным вирусами. Рак, вызванный вирусом, может представлять собой HPV (вирус папилломы человека), HTLV (человеческий Т-лимфотропный вирус) или EBV (вирус Эпштейна-Барра).

В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп получен из ассоциированного с опухолью антигена, выбранного из группы, состоящей из TRP-1, CEA, TAG-72, 9D7, Ep-CAM, EphA3, теломеразы, мезотелина, SAP-1 Мелан-А/MART-1, тирозиназы, CLPP, циклина-А1, циклина-В1 MAGE-A1, MAGE-C1, MAGE-C2, SSX2, XAGE1b/GAGED2a, CD45, глипикана-3, IGF2B3, калликреина-4, KIF20A, ленгсина, мелоз, MUC5AC, сурвивина, PRAME, SSX-2, NY-ESO-1/LAGE1, gp70, MC1R, TRP-1/-2, β-катенина, BRCA1/2, CDK4.

Ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может быть частным эпитопом. Используемый здесь термин «частный эпитоп» относится к эпитопу, который обнаружен только на одном антигене единственного человека, больного раком. Ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может быть общим эпитопом. Используемый здесь термин «общий эпитоп» относится к эпитопу, который обнаруживается при раке у двух или более людей.

В одном варианте осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп может представлять собой неозпитоп. Используемый здесь термин «неозпитоп» относится к эпитопам, которые возникли в результате мутаций в опухолевых клетках, в частности, к получению неозпитопов могут привести соматические или «пассажирские» мутации. В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп не является неозпитопом.

В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп специфичен для колоректального рака, рака предстательной железы, рака пищевода, рака печени, рака почки, рака легких, рака молочной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака головного мозга, гепатоцеллюлярного рака, лимфомы, лейкемии, рака желудка, рака шейки матки, рака яичников, рака щитовидной железы, меланомы, карциномы, рака головы и шеи, рака кожи, рака носоглотки, рака, вызванного вирусом Эпштейна-Барра, рака, вызванного вирусом папилломы человека, и саркомы мягких тканей. Используемый здесь термин «рак»

относится к заболеваниям с аномальным ростом клеток, причем используемый здесь термин относится как к первичной опухоли, так и к метастазам первичной опухоли.

В одном варианте осуществления ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп содержит SEQ ID NO:1 (SPSYVYHQF), или SEQ ID NO:2 (SLLMWITQC), или SEQ ID NO:37 (SLLMWITQV). В тех случаях, когда ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп представляет собой вирусный эпитоп, связанный с раком, вызываемым вирусом, эпитоп может содержать SEQ ID NO:7 (RAHYNIVTF). Рак, вызванный вирусом, может быть выбран из рака, вызванного EBV, рака, вызванного HTLV, и рака, вызванного HPV. Рак, вызванный EBV, может включать лимфому Ходжкина (HL), лимфому Беркитта (BL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) и две более редкие опухоли, связанные с глубокими нарушениями иммунитета, плазмобластную лимфому (PBL) и первичную выпотную лимфому (PEL), LPDs и злокачественные лимфомы из Т- или НК-клеток, карциному носоглотки (NPC) и рак желудка эпителиального происхождения, лейомиосаркому. Рак, вызванный HPV, может включать аногенитальный рак, орофарингеальный рак, рак полости рта, плоскоклеточный рак головы и шеи и рак гортани.

В одном из вариантов осуществления изобретения ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп содержит один или несколько эпитопов, указанных в таблице 1.

Таблица 1

тип HLA	Целевой эпитоп	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO	Ген	Целевой рак
<i>Человек</i>					
A*0201	NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	SLLMWITQC	SEQ ID NO:2	<i>CTAG1B</i>	Раки, экспрессирующие NY-ESO-1
<i>Мышь</i>					
H-2Ld	MuLV env gp70 ₄₂₃₋₄₃₁	SPSYVYHQF	SEQ ID NO:1	<i>env gp70</i>	CT26
H-2Dd	MuLV gp90 ₁₄₇₋₁₄₈	GGPESFYCASW	SEQ ID NO:3	<i>env gp70</i>	CT26
H-2Kd	E2f8 ₅₀₉₋₅₃₅	VILPQAPSGPSY ATYLQPAQAQM LTPP	SEQ ID NO:4	<i>e2f8</i>	CT26

H-Kd	Mtch1 ₃₆₁₋₃₇₀	KYLSVQSQLF	SEQ ID NO:5	<i>mtch1</i>	CT26
H-2Kd и H-2Ld	Mtch1 ₃₆₁₋₃₆₉	KYLSVQSQL	SEQ ID NO:6	<i>mtch1</i>	CT26
H-2Db	HPV16 E7 ₄₉₋₅₇	RAHYNIVTF	SEQ ID NO:7		Раки, вызванные вирусом папилломы человека

Кроме того, ракоспецифичные CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточные эпитопы можно определить с использованием методов, известных в данной области, таких как протеомные методы, масс-спектрометрические методы, методы геномного анализа, анализ транскриптома, методы биоинформатики и методы *in silico*. Специалист в данной области может выбрать подходящий эпитоп для кодирования в векторе по настоящему изобретению.

Для применения у млекопитающих может быть проведена оптимизация кодонов нуклеиновой кислоты, кодирующей ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп. Аналогичным образом может быть проведена оптимизация кодонов нуклеиновой кислоты для применения у человека.

Вектор может содержать аденоассоциированный вирус (AAV). Вектор может содержать аденовирус.

Аденовирусный вектор или вектор AAV также может иметь дополнительные признаки, такие как энхансерные и промоторные области. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор может содержать сильный промотор, примеры которого включают, но не ограничиваются следующими: промотор CMV, промотор RSV, промотор EF1 α . В предпочтительном воплощении изобретения вектор содержит промотор CMV, подходящая последовательность для промотора CMV представлена в SEQ ID NO:18. В еще одном варианте осуществления изобретения вектор может содержать ТАТА-бокс. В еще одном варианте осуществления изобретения вектор содержит последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козака. Последовательность Козака имеет консенсусную последовательность (gcc)gccRccAUGG, подходящая последовательность Козака представлена в SEQ ID NO:19. В еще одном варианте осуществления изобретения вектор содержит последовательность терминатора и/или последовательность полиаденилирования. Подходящая последовательность

полиаденилирования представлена в SEQ ID NO:34. Вектор AAV может содержать последовательности инвертированных концевых повторов (ITR). Подходящая последовательность ITR представлена в SEQ ID NO:42.

В одном из вариантов осуществления изобретения вектор не содержит дополнительных ракоспецифичных CD8+ и/или CD4+ Т-клеточных эпитопов. Вектор кодирует только одиночный ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп. В одном из вариантов осуществления изобретения аденовирусный вектор состоит из основы вектора, промоторной области и нуклеотидной последовательности, кодирующей одиночный ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп. Аденовирусная основа может содержать дополнительные элементы, такие как энхансерные области, промоторные области, ТАТА-бокс, последовательность инициации трансляции.

Вектор AAV может относиться к 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 серотипу. В предпочтительном варианте осуществления вектор AAV относится к серотипам 2 или 5. Вектор AAV может содержать последовательности ITR, в предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательности ITR фланкируют кодируемый ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп. Последовательность ITR может находиться со стороны 5'-конца ракоспецифичного эпитопа, и может находиться со стороны 3'-конца ракоспецифичного эпитопа. 5'-ITR-последовательность может содержать SEQ ID NO:39. 3'-ITR-последовательность может содержать SEQ ID NO: 42. Вектор AAV может содержать последовательности со стороны 5'-конца ракоспецифичного эпитопа, например, SEQ ID NO: 38. Вектор AAV может содержать последовательности со стороны 3'-конца ракоспецифичного эпитопа, например, SEQ ID NO:41. Для получения вектора AAV, содержащего ракоспецифичный CD8+ и/или CD4+ Т-клеточный эпитоп, можно использовать хелперные плазмиды. Хелперная плазида или плазмиды могут быть использованы для получения генов, необходимых для репликации или упаковки в AAV. В одном из вариантов осуществления изобретения хелперная плазида кодирует аденовирусные белки E2A, E4 и VA и/или кодирует AAV гены гер и сар.

Аденовирусный вектор может относиться к серотипу вида С. Вид С включает серотипы Ad1, 2, 5 и 6. В предпочтительном варианте осуществления изобретения аденовирусный вектор представляет собой человеческий серотип 5 (AdHu5). Может быть предпочтительно, чтобы аденовирусный вектор был модифицирован, например, для снижения иммуногенности и повышения биобезопасности вектора. Таким образом, аденовирусный вектор может быть неспособным к репликации. В аденовирусном векторе могут отсутствовать белки E1 и E3. Аденовирусный вектор может содержать последовательности на 5'-конце ракоспецифичного эпитопа, например, SEQ ID NO:13.

Аденовирусный вектор может содержать последовательности на 3'-конце ракоспецифичного эпитопа, например, SEQ ID NO:14.

Другие аденовирусные векторы также могут быть пригодными в качестве вектора по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления изобретения вектор может представлять собой аденовирусный вектор животного происхождения, например собачий, обезьяний, в частности, макак-резусов и шимпанзе. В одном варианте осуществления изобретения аденовирусный вектор может представлять собой вектор редкого серотипа, происходящий от примата, отличного от человека. Для вектора по настоящему изобретению могут быть подходящими векторы, происходящие от шимпанзе, примеры включают, но не ограничиваются ChAd63, ChAd3, ChAdY25.

В одном варианте осуществления изобретения предлагается иммуногенная композиция, содержащая вектор, как определено выше. Иммуногенная композиция может дополнительно содержать один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант.

Иммуногенную композицию, содержащую вектор по изобретению, можно применять в комбинации по меньшей мере с одной другой иммуногенной композицией, содержащей вектор по изобретению, где каждый вектор кодирует отличающийся ракоспецифичный CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточный эпитоп. Иммуногенная композиция, содержащая первый вектор по изобретению, может быть введена отдельно, последовательно или одновременно с иммуногенной композицией, содержащей второй вектор по изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуногенная композиция может содержать по меньшей мере два вектора по изобретению. Может быть предпочтительным, чтобы по меньшей мере два вектора кодировали разные ракоспецифичные CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточные эпитопы. Если в композиции присутствуют дополнительные векторы, то такой вектор может кодировать отличающиеся ракоспецифичные CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеточные эпитопы. Иммуногенная композиция может дополнительно содержать один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант. Не желая быть связанными теорией, можно отметить, что применение коктейля векторов, кодирующих разные эпитопы, может привести к более сильному иммунному ответу, кроме того, может иметь место синергетический эффект, усиливающий иммунный ответ.

Если композиция по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два вектора, описанных в настоящем документе, эти векторы могут быть представлены в виде отдельных лекарственных средств для введения в одно и то же время или в разное время.

В варианте осуществления, когда композиция содержит по меньшей мере два вектора, описанных в настоящем документе, векторы могут быть представлены в виде отдельных лекарственных средств для введения в разное время. Если векторы вводятся раздельно и в разное время, любой вектор можно вводить первым. В некоторых вариантах осуществления изобретения оба вектора можно вводить в один и тот же день или в разные дни, они могут вводиться с использованием одной и той же или разных схем в течение цикла лечения.

Альтернативно, если композиция содержит по меньшей мере два вектора, описанных в настоящем документе, введение векторов можно осуществлять одновременно. Если используется одновременное введение, векторы могут быть приготовлены в виде отдельных фармацевтических композиций. В предпочтительном воплощении по меньшей мере два вектора могут быть приготовлены в виде одной фармацевтической композиции.

Композиция по изобретению может быть в форме жидкости, например раствора, эмульсии или суспензии. Жидкие композиции по изобретению, независимо от того, являются ли они растворами, суспензиями или другими подобными формами, могут также включать один или несколько из следующих компонентов: стерильные разбавители, такие как вода, раствор хлорида натрия, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, полиэтиленгликоли, глицерин или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Композиция может быть помещена в ампулу, одноразовый шприц или многодозовый флакон из стекла, пластика или другого материала.

Вектор или композиция по изобретению, предназначенные для внутривенного введения, могут быть в форме стерильного водного или неводного (например, масляного) раствора или суспензии для инъекций. Стерильный инъекционный препарат также может быть в виде стерильного инъекционного раствора или суспензии в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например в растворе 1,3-бутандиола. В число подходящих для применения приемлемых носителей и растворителей входят вода, фосфатный буферный раствор, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или среды для суспендирования можно использовать стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать

любое обычное нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении внутривенного состава по изобретению, могут быть использованы жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Иммуногенные композиции могут быть приготовлены с использованием методологии, хорошо известной в фармацевтической области. Например, композиция, предназначенная для введения путем инъекции, может быть приготовлена путем растворения вектора по настоящему изобретению в воде с образованием раствора. Для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии может быть добавлено поверхностно-активное вещество.

В одном варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор или иммуногенную композицию, описанные в настоящем документе. Клетка-хозяин может быть клеткой млекопитающего, например, человека или мыши. Клетка-хозяин может быть трансдуцирована вектором. Клетка-хозяин может быть использована для получения аденовирусного штамма.

В одном из вариантов осуществления вектор или иммуногенная композиция предназначены для применения в терапии. В предпочтительном воплощении вектор или иммуногенная композиция предназначены для лечения или профилактики рака.

Термин «лечение» относится к медицинскому ведению пациента с целью вылечить, улучшить, стабилизировать или предотвратить заболевание, патологическое состояние или расстройство. Этот термин включает активное лечение, то есть лечение, направленное непосредственно на улучшение при заболевании, патологическом состоянии или расстройстве, а также включает этиотропную терапию, то есть лечение, направленное на устранение причины сопутствующего заболевания, патологического состояния или расстройства. Кроме того, этот термин включает паллиативное лечение, то есть лечение, направленное на облегчение симптомов, а не на лечение болезни, патологического состояния или расстройства; профилактическое лечение, то есть лечение, направленное на минимизацию, частичное или полное ингибирование развития сопутствующего заболевания, патологического состояния или расстройства; и поддерживающее лечение, то есть лечение, применяемое в дополнение к другой специфической терапии, направленной на улучшение сопутствующего заболевания, патологического состояния или расстройства.

Изобретение также относится к способу лечения или профилактики рака, включающему введение терапевтически эффективного количества вектора или композиции по изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к применению вектора или композиции, описанных в настоящем документе, в производстве лекарственного

средства для лечения или профилактики рака. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к применению вектора или композиции, описанных в настоящем документе, для лечения или профилактики рака.

Используемый здесь термин «терапевтически эффективный» относится к количеству используемой композиции, достаточному для облегчения одной или нескольких причин или симптомов заболевания или расстройства. Такое улучшение требует только снижения или изменения, но не обязательно устранения.

Настоящее изобретение также относится к способу индукции инфляционного ответа CD8⁺ Т-клеток памяти, включающему стадию введения терапевтически эффективного количества вектора или композиции по изобретению нуждающемуся в этом субъекту, при этом CD8⁺ Т-клетки характеризуются маркерами, выбранными из группы, включающей CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺ и CD62L⁻.

Предпочтительно CD8⁺ Т-клетки характеризуются фенотипом CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺ и CD62L⁻. Более предпочтительно они характеризуются фенотипом CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺, CD62L⁻, CD27(низкий уровень), CD127(низкий уровень).

Вектор или иммуногенная композиция могут применяться для лечения или профилактики колоректального рака, рака предстательной железы, рака пищевода, рака печени, рака почки, рака легких, рака молочной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака головного мозга, гепатоцеллюлярного рака, лимфомы, лейкемии, рака желудка, рака шейки матки, рака яичников, рака щитовидной железы, меланомы, карциномы, рака головы и шеи, рака кожи и саркомы мягких тканей.

Вектор или композиция, описанные в данном документе, могут быть введены любым подходящим способом. Вектор или композиция могут быть введены любым подходящим способом, включая, но не ограничиваясь следующими: пероральный, местный, парентеральный, подъязычный, ректальный, вагинальный, глазной, интраназальный, легочный, внутрикожный, интравитреальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, внутримозговой, трансдермальный, трансмукозальный, ингаляционный. Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, интраназальное, ректальное, внутрипузырное, внутрикожное, местное или подкожное введение. В одном из вариантов осуществления вектор или композицию вводят внутривенно или внутримышечно. Композиции могут находиться в форме одной или более дозированных единиц.

В конкретных вариантах осуществления изобретения может быть желательным локальное введение вектора или композиции по настоящему изобретению в область, нуждающуюся в лечении, например в участок опухоли. В другом варианте осуществления

изобретения может быть желательным введение вектора или композиции путем внутривенной инъекции или инфузии. Количество вектора по настоящему изобретению, которое является эффективным/активным при лечении конкретного заболевания или состояния, будет зависеть от природы заболевания или состояния и может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, для определения оптимальных диапазонов доз необязательно можно использовать *in vitro* или *in vivo* анализы. Точная доза, которую следует использовать в композициях, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания или расстройства и должна определяться в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами каждого пациента.

Композиции содержат эффективное количество вектора по настоящему изобретению, так что будет получена подходящая доза. Правильная дозировка соединений будет различаться в зависимости от конкретного состава, способа введения и конкретного места введения, хозяина и заболевания, которое лечат. Следует принимать во внимание и другие факторы, такие как возраст, масса тела, пол, диета, время введения, скорость выведения, состояние хозяина, комбинации препаратов, аллергические реакции и тяжесть заболевания. Введение можно осуществлять непрерывно или периодически.

При терапии рака вектор или иммуногенную композицию по настоящему изобретению можно использовать в сочетании с существующей терапией. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор или композицию используют в сочетании с существующей терапией или терапевтическим средством, например, противораковой терапией. Таким образом, в другом аспекте изобретение также относится к комбинированной терапии, включающей введение вектора или композиции по изобретению и противораковую терапию. Противораковая терапия может включать терапевтическое средство или лучевую терапию, и включает генную терапию, вирусную терапию, РНК-терапию, трансплантацию костного мозга, нанотерапию, направленную противораковую терапию или онколитические препараты. Примеры других терапевтических агентов включают ингибиторы контрольных точек, противоопухолевые агенты, иммуногенные агенты, аттенуированные раковые клетки, опухолевые антигены, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, импульсно обработанные опухолевым антигеном или нуклеиновыми кислотами, иммуностимулирующие цитокины (например, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), направленные малые молекулы и биологические молекулы (такие как компоненты путей передачи сигнала, например, модуляторы тирозинкиназ и ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, а также агенты, которые связываются с опухолеспецифическими антигенами, включая антагонисты EGFR), противовоспалительный агент, цитотоксический агент, радиотоксический агент или

иммунодепрессант и клетки, трансфицированные геном, кодирующим иммуностимулирующий цитокин (например, GM-CSF), химиотерапию. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор или композицию применяют в сочетании с хирургическим вмешательством. Вектор или композицию по изобретению можно вводить в то же время или в другое время, что и другие виды терапии, например, одновременно, раздельно или последовательно.

В одном из вариантов осуществления изобретения вектор или композицию используют в сочетании с иммуномодулирующим средством. Иммуномодулирующее средство можно вводить одновременно, последовательно или отдельно с иммуномодулирующим средством. В конкретных вариантах осуществления изобретения иммуномодулирующее средство может представлять собой ингибитор иммунной контрольной точки. Примеры ингибиторов иммунной контрольной точки включают, но не ограничиваются ингибиторами белков иммунных контрольных точек, выбранными из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, LAG-3, B7-H3, B7-H4, B7-H6, A2aR, BTLA, GAL9 и IDO.

Ранее сообщалось, что некоторые типы опухолей не реагируют на монотерапию анти-PD-1 и анти-PD-L1. Неожиданно здесь было показано, что в комбинации с ингибитором контрольной точки, таким как анти-PD-L1 терапия, иммунизация минигенным вектором может привести к усилению контроля над опухолью. Было показано, что она эффективна на моделях опухолей, известных как нереагирующие на стандартную терапию ингибиторами контрольных точек. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения вектор или композиция по настоящему изобретению могут применяться в комбинации с ингибитором контрольной точки для лечения опухолей, нереагирующих на ингибитор контрольной точки.

Вектор или композиция по настоящему изобретению и иммуномодулирующее средство могут быть представлены в виде отдельных лекарственных средств для введения в одно и то же время или в разное время.

В одном из вариантов осуществления изобретения вектор или композиция по настоящему изобретению и иммуномодулирующее средство представлены в виде отдельных лекарственных средств для введения в разное время. При введении раздельно и в разное время, первым можно вводить или вектор, или иммуномодулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения оба препарата могут вводиться в один и тот же день или в разные дни, и их можно вводить согласно одной и той же схеме или разным схемам в течение цикла лечения.

В качестве альтернативы введение иммуномодулирующего агента можно проводить одновременно с введением вектора или иммуногенной композиции. Если применяется одновременное введение, вектор или иммуногенная композиция и иммуномодулирующее средство могут быть приготовлены в виде отдельных фармацевтических композиций. Вектор или иммуногенная композиция и иммуномодулирующее средство могут быть в составе одной фармацевтической композиции.

Вектор или композицию по настоящему изобретению можно вводить профилактически или терапевтически. Термин «профилактически» относится к введению, предназначенному для обеспечения защитного действия против заболевания. Термин «терапевтически» относится к введению, предназначенному для обеспечения лечебного эффекта.

Вектор или композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде однократной дозы. Дозу можно вводить в ходе профилактического или терапевтического плана лечения. В одном из вариантов осуществления изобретения разовая доза может быть представлена в однодозовом контейнере, дополнительно содержащем один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант.

Вектор или композицию по настоящему изобретению можно вводить в виде многократных доз. Когда вводят несколько доз, одну или более доз можно вводить профилактически или одну или более доз можно вводить терапевтически. Когда вводят несколько доз, одну или более можно вводить профилактически, и одну или более можно вводить терапевтически. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор может быть введен по «прайм-буст» схеме, при которой за первым введением аденовирусного вектора (примированием), следует второе введение (бустерное введение).

Отсрочка введения дозы и/или сокращение дозы, а также корректировка схемы введения выполняются по мере необходимости в зависимости от индивидуальной переносимости лечения пациентом.

Когда иммуногенная композиция содержит по меньшей мере два вектора, и векторы кодируют разные эпитопы, как описано выше, между векторами может возникать синергетический эффект. Таким образом, каждый из векторов можно вводить в субоптимальной дозе. Термин «субоптимальная» доза относится к уровню дозы, который не предназначен для полного удаления или уничтожения опухоли, но, тем не менее, приводит к некрозу некоторых опухолевых клеток или тканей. Специалист в данной области способен определить соответствующую дозу, необходимую для достижения этого,

в зависимости от таких факторов, как возраст пациента, статус заболевания, размер и локализация опухоли или метастазов.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложен способ получения описанного выше вектора, включающий стадии:

i) синтез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей эпитоп, в качестве смыслового и бессмыслового праймера,

ii) клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность эпитопа, в первую плазмиду,

iii) клонирование последовательности, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую эпитоп, во вторую плазмиду, содержащую аденовирусную ДНК.

Подходящие способы клонирования известны в данной области техники, примеры способов клонирования включают, но не ограничиваются следующими: способы рестрикционного лигирования, Gateway клонирование, сборка Гибсона, безлигазное клонирование. Специалист в данной области способен определить подходящий способ для клонирования последовательности в плазмиду. Способ клонирования для введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность эпитопа, в первую плазмиду может быть таким же или отличным от ранее используемого способа клонирования. В одном варианте осуществления изобретения способ клонирования для введения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность эпитопа, в первую плазмиду выбирают из способов рестрикционного лигирования, Gateway клонирования, сборки Гибсона, безлигазного клонирования. В одном из вариантов осуществления изобретения способ клонирования для введения эпитопа, кодирующего последовательность нуклеиновой кислоты, во вторую плазмиду, содержащую аденовирусную ДНК, выбирают из способов рестрикционного лигирования, Gateway клонирования, сборки Гибсона, безлигазного клонирования.

В одном из вариантов осуществления изобретения стадия iii) включает клонирование последовательности, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей эпитоп, во вторую плазмиду, содержащую аденовирусную ДНК, при этом последовательность, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей эпитоп, также содержит дополнительные элементы, выбранные из группы, включающей последовательность инициации трансляции, промотор, последовательность терминации, последовательность полиаденилирования.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ получения вектора включает стадии:

- i) синтез нуклеиновой кислоты, кодирующей эпитоп, в качестве смыслового и антисмыслового праймера,
- ii) проведение отжига смыслового и антисмыслового праймеров,
- iii) расщепление отоженных праймеров соответствующими рестрикционными ферментами для получения вставки в донорную плазмиду, и
- iv) перенос донорной плазмиды во вторую плазмиду, содержащую аденовирусную ДНК.

Подходящие рестрикционные ферменты и сайты рестрикции известны специалистам в данной области. Создание подходящих сайтов рестрикции в смысловых и антисмысловых праймерах для получения вставки в донорскую плазмиду находится в рамках возможностей специалиста в данной области.

Кодируемый эпитоп представляет собой ракоспецифичные эпитопы CD8⁺ и/или CD4⁺ Т-клеток. Множество ракоспецифичных эпитопов было определено и известно в данной области. Специалист в данной области может выбрать подходящий эпитоп для кодирования в векторе. В данной области известны дополнительные способы идентификации ракоспецифичных эпитопов, включая методы биоинформатики, анализ транскриптома и методы *in silico*.

Вторая плазида, кодирующая аденовирусный вектор, может содержать любой из следующих элементов. Аденовирусный вектор может содержать области энхансера и промотора, например сильный промотор, такой как CMV промотор, RSV промотор, EF1 α промотор. В предпочтительном воплощении вектор содержит промотор CMV. Вектор может содержать ТАТА-бокс. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор содержит последовательность инициации трансляции, например, последовательность Козака. Последовательность Козака имеет консенсусную последовательность (gcc)gccRccAUGG. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор содержит последовательность терминатора и/или последовательность полиаденилирования. Аденовирусный вектор может относиться к серотипу вида С, такому как серотипы Ad1, 2, 5 и 6. В предпочтительном воплощении аденовирусный вектор представляет собой человеческий серотип 5 (AdHu5). Может быть предпочтительно, чтобы аденовирусный вектор был модифицирован, например, для снижения иммуногенности и повышения биобезопасности вектора. Таким образом, аденовирусный вектор может быть неспособным к репликации. В аденовирусном векторе могут отсутствовать белки E1 и E3.

Перенос донорной плазмиды во вторую плазмиду можно осуществлять любым способом, например, методом лигирования.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предлагается набор, содержащий описанные здесь вектор или иммуногенную композицию, один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант и, необязательно, инструкции по применению.

Дополнительный активный агент может включать ингибиторы контрольных точек, противоопухолевые агенты, иммуногенные агенты, аттенуированные раковые клетки, опухолевые антигены, антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, импульсно обработанные опухолевым антигеном или нуклеиновыми кислотами, иммуностимулирующие цитокины (например, IL-2, IFN α 2, GM-CSF), направленные малые молекулы и биологические молекулы (такие как компоненты путей передачи сигнала, например, модуляторы тирозинкиназ и ингибиторы рецепторных тирозинкиназ, а также агенты, которые связываются с опухолеспецифическими антигенами, включая антагонисты EGFR), противовоспалительный агент, цитотоксический агент, радиотоксический агент или иммунодепрессант и клетки, трансфицированные геном, кодирующим иммуностимулирующий цитокин (например, GM-CSF).

Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант могут включать; стерильные разбавители, такие как вода, раствор хлорида натрия, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, полиэтиленгликоли, глицерин или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции Т-клеточного иммунного ответа у животного против ракоспецифичного CD8+ и/или CD4+ Т-клеточного эпитопа, включающему приведение клетки в контакт с вектором или иммуногенной композицией, как описано в настоящем документе.

Клетка может быть приведена в контакт с вектором или композицией в *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* условиях. Если клетки приводят в контакт с вектором или композицией *in vitro* или *ex vivo*, затем клетки могут быть введены субъекту.

Т-клеточный иммунный ответ может включать инфляционный ответ CD8+ Т-клеток памяти.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, представленному в примерах и/или прилагаемых фигурах.

Если иное не определено в данном документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим раскрытием, должны иметь значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Хотя вышеприведенное раскрытие обеспечивает общее описание объекта изобретения, входящего в объем настоящего изобретения, включая способы, а также наилучший вариант его осуществления, создания и использования настоящего изобретения, следующие примеры приведены для того, чтобы дополнительно помочь специалистам в данной области в практическом осуществлении данного изобретения и предоставить его полное письменное описание. Однако специалисты в данной области поймут, что особенности этих примеров не следует рассматривать как ограничивающие изобретение, объем которого должен быть ясен из формулы изобретения, прилагаемой к настоящему описанию, и ее эквивалентов. Различные дополнительные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

Все документы, упомянутые в данном описании, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Изобретение далее описано в неограничивающих примерах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: **Одиночная конструкция AdHu5, кодирующая доминантный эпитоп АН1, эпитоп CD8, идентифицированный в колоректальной карциноме СТ26, является иммуногенным**

Чтобы выяснить, способна ли вакцинация минигеном повышать Т-клеточный ответ против эндогенного Т-клеточного эпитопа, была проведена серия экспериментов на мышинной модели рака с эндогенным неоантигеном. Мы использовали модель колоректальной карциномы мышей СТ26, где пептидная последовательность SPSYVYHQF (обозначенная как АН-1, SEQ ID NO:1) была получена из белка вируса мышинового лейкоза (MuLV env gp70₄₂₃₋₄₃₂) - эндогенного ретровируса, который распознается мышами Balbc в H2-DL-рестриктированном виде. Также тестировали миниген, кодирующий «скрытый» CD8 Т-клеточный эпитоп, GGPEF₁₄₇₋₁₅₈YCASW (из MuLV env gp90₁₄₇₋₁₅₈, обозначенный как GSW11, SEQ ID NO:3). Этот H-2D^d-рестриктированный эпитоп не индуцирует CD8 Т-клеточный ответ у здоровых иммунокомпетентных мышей BALB/c. Хотя он также происходит от MuLV, он кодируется в открытой рамке считывания, отличающейся от АН-1. Кроме того, он нестабильно связывается с D^d МНС молекулой, поскольку он не соответствует каноническому пептидному мотиву и, таким образом имеет очень короткий

период полужизни, находясь в стабильном состоянии 20 минут, прежде чем он будет потерян с клеточной поверхности. Напротив, период полужизни АН-1 составляет 60 минут; следовательно, специфические ответы CD8 Т-клеток на GSW11 развиваются только тогда, когда регуляторные CD4 Т-клетки (Treg) системно истощаются (James et al., 2010 J. Immunol. 185: 5048-5055), что приводит к очень высокому уровню активации антигенпрезентирующих клеток (Shevach., 2009 Immunity 30(5):636-45). Этот эпитоп был включен в тестирование, чтобы проверить, могут ли ответы против таких нестабильных «скрытых» эпитопов быть вызваны иммунизацией минигеном у иммунокомпетентных животных без необходимости системного истощения Treg. Два эпитопа были сконструированы как отдельные минигены на основе AdHu5, как описано ранее (фиг. 1А).

Инъекция мышам BALB/c минигенного вектора AdHu5-АН1-MG в дозе 1×10^8 или 1×10^7 инфекционных единиц (МЕ) для Ad-АН1 Low индуцировала появление в крови АН1-специфических CD8+ Т-клеток, которые обнаруживали при окрашивании АН1-тетрамером (фиг. 1В), составляющих примерно 25% от общего числа CD8+ Т-клеток на 7-й день после вакцинации (фиг. 1С, слева). Этот уровень со временем постепенно снижался до ~ 5% на 50-й день (фиг. 1С, справа) и ~ 2,5% на 80-й день после вакцинации (данные не показаны). Аналогичные проценты наблюдали после вакцинации Ad-минигеном у мышей C57BL/6, хотя и с плато при более высоких уровнях. У наивных мышей или мышей, вакцинированных минигеном AdHu5, кодирующим нерелевантный эпитоп (I8V, эпитоп, полученный из β -галактозидазы — бактериального фермента), АН1-специфические ответы обнаружены не были (фиг. 1С слева и справа).

GSW11-специфические ответы не могли быть обнаружены с помощью окрашивания GSW11-тетрамером или стимуляции GSW11-пептидом, что указывает на то, что такие «скрытые», нестабильные эпитопы не способны генерировать CD8 Т-клеточный ответ у иммунокомпетентных животных. Тем не менее интересно отметить, что не было различий в величине ответа АН-1+ тетрамера в группах, иммунизированных только AdHu5-АН-1, по сравнению с животными, иммунизированными обоими минигенами, AdHu5-АН-1+AdHu5-GSW11, (фиг. 1С, слева), что указывает на то, что совместная доставка минигенной конструкции AdHu5, кодирующей неиммуногенный эпитоп, не мешает индукции АН-1-специфического ответа.

В то время как количество АН1-специфических CD8+ Т-клеток со временем уменьшалось, их фенотип оставался стабильным – подобно тому, что наблюдается у мышей C57BL/615, которые имеют фенотип эффекторной памяти (CD44+CD62L-, фиг. 1D и 1E, верхний ряд), экспрессируют более низкие уровни CD27 (фиг. 1D и 1E, средний ряд) и более высокие уровни PD-1 (фиг. 1D и 1E, нижний ряд) по сравнению с тетрамер-отрицательной

(тет-) популяцией в крови тех же мышей (фиг. 1D и 1E). Кроме того, в этой популяции также были обнаружены высокие уровни CX3CR1 и низкие уровни CD127. К 50-му дню наблюдалась небольшая потеря фенотипа эффекторной памяти вместе с некоторой активацией маркера активации CD27 и PD-1 (фиг. 1E, левые панели, верхняя, средняя и нижняя соответственно).

Пример 2: Иммунизация минигеном AdHu-5 задерживает рост опухоли CT26 в моделях профилактической и терапевтической иммунизации

Для измерения защитной эффективности схемы профилактической иммунизации иммунизированным животным подкожно (s.c.) вводили опухолевые клетки CT26 через 5 дней после вакцинации Ad-AH1 (фиг. 2A, B-C). Все животные, иммунизированные Ad-AH1, значительно подавляли рост опухоли с полной ремиссией у одного из зараженных животных (1/15) (фиг. 2B и C). Как и ожидалось на основании данных об иммуногенности, в группах, иммунизированных только Ad-GSW11 (фиг. 2B-P1), нерелевантным минигеном, или неиммунизированных (фиг. 2B-P1) защиты не наблюдалось. Интересно, что чуть лучший контроль наблюдался в группе, вакцинированной низкой дозой Ad-AH1 (1×10^7 ME)¹⁷ (фиг. 2C-P2) (хотя и не статистически значимо). Значительная разница в размерах опухоли наблюдалась на 18-й день после заражения опухолью у мышей, вакцинированных Ad-AH1, и контрольных мышей (фиг. 2E и 2G). Кроме того, скорость роста опухолей (определяемая по наклону линии линейной регрессии, соответствующей кривой) ниже у мышей, вакцинированных Ad-AH1, по сравнению с контрольными мышами с того дня, когда опухоли начинают расти (фиг. 2F, 2H и 2K). Можно заключить, что вакцинация Ad-AH1 до и после заражения опухолью CT26 задерживает рост опухоли.

Затем мы протестировали минигенные конструкции в модели терапевтического заражения (фиг. 2D). Группам мышей подкожно вводили опухолевые клетки, а затем, 6 дней спустя, внутривенно вводили Ad-AH1 (фиг. 2A и фиг. 2D). Как и прежде, иммунизация Ad-AH-1 замедляла рост опухоли — у мышей, иммунизированных Ad-AH1, опухоли были значительно меньше по сравнению с наивными и нерелевантно иммунизированными AdHu5 животными на 18-й день после иммунизации (фиг. 2I и 2J), у одного животного опухоль не развилась (1/10).

Пример 3: Иммунизация минигеном AdHu5-AH1 изменяет фенотип специфических CD8+ Т-клеток

Мышей с опухолями забивали, когда была достигнута гуманная конечная точка. В этот момент определяли количество AH-1-специфических CD8 Т-клеток в опухолях (TIL)

и селезенке. Окрашивание АН1-тетрамером (фиг. 3А, верхняя панель) показало высокие уровни АН1-специфических CD8⁺ Т-клеток в опухолях вакцинированных мышей, а также у контрольных мышей (фиг. 3В, верхний ряд, слева и справа). Окрашивание полной панелью антител, конъюгированных с флуорохромом, вместе с другим/нерелевантным H2-Ld-связывающим тетрамером (распознающим эпитоп MCMV pp89) не выявило положительных клеток (фиг. 3А), подтверждая, что высокие уровни АН-1 тетрамерных клеток не являются следствием автофлуоресценции или неспецифического связывания тетрамера H2-Ld. Однако стоит отметить, что на этой стадии произошла потеря контроля над опухолью.

На позднем этапе профилактической иммунизации популяция АН-1-специфических CD8 Т-клеток была обнаружена в селезенке (фиг. 3В, нижний ряд слева) во всех группах с небольшой разницей между группами. В отличие от этого, после заражения опухолью только у животных, иммунизированных Ad-Hu5 АН-1, наблюдались повышенные уровни АН-1 тетрамер-позитивных клеток в селезенке (фиг. 3В, нижний ряд справа) подтверждая, что иммунизация может повышать уровни тетрамер-позитивных клеток в других компартментах.

Фенотипический анализ показал, что в селезенке эти АН1-специфические CD8⁺ Т-клетки от мышей, вакцинированных Ad-АН1, в основном представляют собой эффекторные клетки памяти (CD44⁺ CD62L⁻), в которых активированы клеточные маркеры CX3CR1, CD127, Fas и LFA-1 и подавлены клеточные маркеры CD27 и Trm (CD69⁺ CD103⁺) (фиг. 3С, правая панель). Напротив, АН1-специфические CD8⁺ Т-клетки в опухолях экспрессировали другой фенотип, становясь высоко активированными, но истощенными, о чем свидетельствуют высокие уровни PD-1 (фиг. 3С, левая панель). Активация PD-1, вероятно, связана с сильной стимуляцией TCR, поскольку уровни PD-1 в других CD8 Т-клетках в TIL были не такими высокими (фиг. 3С, средняя панель). Уровни всех указанных маркеров были повышены, за исключением CD127, уровень которого был снижен, а также CD27 и CD69⁺ CD103⁺, которые сохраняют одинаковые уровни как в тетрамер-позитивных, так и в нететрамер-позитивных TIL (фиг. 3С, левая и средняя панели). Следовательно, иммунизация, по-видимому, изменяет уровень тетрамер-позитивных клеток в лимфоидном компартменте и изменяет фенотип в сторону фенотипа эффекторной памяти в TIL.

Пример 4. Процент регуляторных Т-клеток оказался ниже в опухолях мышей, вакцинированных Ad-АН1, по сравнению с контрольными мышами, тогда как количество Trm в TIL увеличилось после иммунизации Ad-АН1.

Чтобы определить, приводит ли иммунизация к другим изменениям в микроокружении опухоли, измеряли уровни Treg и AN-1-специфических резидентных T-клеток памяти (T_{fm}). Мы обнаружили, что в CD4 T-клеточном компартменте доля Treg (CD4⁺ FoxP3⁺) клеток была ниже в опухолях из вакцинированных Ad-AN1 мышей по сравнению с контрольными группами (наивными и нерелевантными Ad-иммунизированными) (фиг. 4A).

Недавно сообщалось, что антиген-специфические CD8 T-клетки, экспрессирующие T_{fm} фенотип, обеспечивали превосходный контроль над опухолью. Эти данные согласуются с тем, что, как мы обнаружили, иммунизация минигенным аденовирусным вектором увеличивает процент AN1⁺ CD103⁺ CD69⁺ T_{fm} в TIL. Это статистически значимо, когда иммунизированные группы объединяют и сравнивают с группами отрицательного контроля (IrrAd и Naive). В наивной группе, несмотря на наличие больших популяций AN1⁺ тетрамеров (фиг. 8A), лишь немногие демонстрировали T_{fm} фенотип CD103⁺ CD69⁺ CD62L low, CD44^{hi} (фиг. 4B). Указанное увеличение было очевидно как при профилактической, так и при терапевтической схемах иммунизации (фиг. 4B). Взятые вместе, в этой модели рака, иммунизации минигеном, по-видимому, изменяют микроокружение опухоли в пользу распознавания и уничтожения опухолевых клеток.

Пример 5: Хотя антиген-специфические CD8 T-клетки в TIL не реагируют на родственный пептид, спленоциты родственных животных сохраняют свою функциональность

Высокий процент AN1-специфических CD8⁺ T-клеток, обнаруженных в опухоли с помощью окрашивания AN1-тетрамером (фиг. 3A), указывает на количество клеток, которые экспрессируют AN1-специфический TCR. Однако это не доказывает, происходит ли при взаимодействии с AN1-пептидом передача сигналов TCR и активация T-клеток. Поэтому мы стимулировали отдельные клетки селезенки и опухоли с помощью (1) AN1-пептида - для измерения эффекта передачи сигналов TCR (2) PMA/IO - для измерения неспецифической активации. Продукция провоспалительного цитокина интерферона-гамма (IFN γ) использовалась в качестве регистрируемого маркера. Спленоциты соответствующих мышей также стимулировали родственным пептидом и PMA/IO.

Как показано на фиг. 5A и 5B, CD8⁺ спленоциты из групп, иммунизированных минигеном, как от профилактически, так и от терапевтически вакцинированных мышей, способны отвечать (т. е. продуцировать IFN γ) при стимуляции AN1- пептидом *ex vivo*, но было зарегистрировано очень мало ответов спленоцитов в отсутствие AN1-иммунизации. Напротив, в TIL соответствующих иммунизированных животных наблюдали очень низкую

продукцию цитокинов или ее отсутствие. Стимуляция РМА/Ю также индуцировала очень небольшую продукцию IFN-гамма иммунизированными ТП, и еще более низкие уровни, наблюдались у животных, не иммунизированных АН-1. В совокупности эти результаты подтверждают, что в поздние сроки антиген-специфические CD8 Т-клетки в опухоли дисфункциональны, хотя аналогичные антиген-специфические CD8 Т-клетки в других компартментах сохраняют свою функциональность. Более того, дисфункция ТП, вероятно, является внутренней, поскольку клетки были также не способны реагировать на стимуляцию РМА/Ю, которая не требует интактных антигенпрезентирующих клеток. Наконец, эти результаты также показывают, что хотя минигенные иммунизации повышают популяцию IFN-гамма-продуцирующих антиген-специфических клеток в других компартментах, например в селезенке, этого не происходит, когда антиген-специфические клетки вырабатываются в ответ на опухолевые клетки.

Пример 6: Иммунизация минигеном индуцирует популяцию АН1-специфических CD8 Т-клеток на периферии, что замедляет рост опухоли.

Когда были подсчитаны скорости роста опухолей, обнаружился дополнительный эффект иммунизации. Скорости роста определяли по наклону линии линейной регрессии, соответствующей кривой, начиная с дня, когда опухоли демонстрируют явный рост опухоли (7-й день после имплантации для отрицательных контролей и 18-й день после имплантации для АН1-иммунизированных животных) (фиг. 6А). Или же рассчитывали удельные скорости роста с использованием тех же исходных данных (фиг. 6В). Мы обнаружили, что даже когда происходило ускользание опухоли из под контроля иммунной системы, опухоли росли медленнее по сравнению с контролем, что позволяет предположить, что давление отбора, оказываемое инфляционными клетками, могло привести к росту менее приспособленной популяции опухолей. Или же, опухоли фактически делятся с той же скоростью, что и контроли, но часть из них всегда уничтожается за счет инфляционных анти-АН1 CD8 Т-клеток. Когда на графике отмечали скорость роста опухолей (из фиг. 2D) в зависимости от процента тетрамер-позитивных клеток в ТП или селезенке после заражения опухолью, наблюдалась сильная обратная корреляция между скоростью роста опухоли и процентом АН1 тетрамер+ спленоцитов (фиг. 3В) как в профилактических, так и в терапевтических исследованиях, свидетельствуя о том, что более высокие уровни этих клеток приводят к лучшему контролю роста опухоли.

Пример 7: Иммунизация с использованием конструкции AdHu5-АН1-миниген может обеспечить лучший контроль опухоли по сравнению с иммунизацией AdHu5-gp90FL

В эксперименте по терапевтической иммунизации сравнивали защиту, обеспечиваемую аденовирусными конструкциями, кодирующими доминантный CD8 Т-клеточный эпитоп, и аналогичной конструкцией, кодирующей полноразмерный белок gp90, из которого получен этот эпитоп. Было обнаружено, что минигенные конструкции обеспечивают лучший контроль по сравнению с AdHu5-gp90-FL, что подтверждается статистически значимыми более низкими скоростями роста опухолей (фиг. 7А). Образцы крови мышей, у которых опухоли исчезли (из фиг. 2В), брали приблизительно через 6 месяцев после заражения, и популяция AN1 Tet⁺ клеток продолжала обнаруживаться в кровотоке, указывая на то, что функциональный ответ CD8 Т-клеток присутствует в течение длительного времени (фиг. 7В).

Пример 8: Иммунизация AdHu5-NY-ESO-1(157-165) (SEQ ID NO:2), HLA:A2-рестриктированным CD8 Т-клеточным эпитопом, приводит к развитию HLA:A2-рестриктированного ответа инфляционной памяти

Минигенную конструкцию, экспрессирующую доминантный HLA-A2-рестриктированный эпитоп из ракового антигена яичка NY-ESO-1, конструировали (фиг. 8А) путем вставки эпитопа под контролем CMV промотора в дефицитный по репликации вектор AduHu5 с удаленными генами E1 и E3. Также был сконструирован контрольный аденовектор, содержащий полноразмерный NY-ESO-1. Их вводили внутривенно трансгенным мышам ННД, экспрессирующим HLA-A2 антиген, на фоне C57BL/6. У мышей ННД также имеется нокаут H-2Db и мышинового бета-2-микроглобулина (b2m) (а также гибридной молекулы HLA-A2 ННDb2m). Это приводит к тому, что только HLA-A2 представляет собой МНС класса I. Ответы CD8 Т-клеток на эпитоп NY-ESO-1 отслеживали в крови с помощью окрашивания тетрамером. Как показано на Фигуре 8А, иммунизированные мыши на любую конструкцию отвечали популяцией тетрамер-специфических клеток, которые можно было измерить на 7-й день. У большинства мышей, иммунизированных полноразмерным белком NY-ESO-1, ответы снижались к 21-му дню и оставались на низком, но детектируемом уровне (приблизительно 2-5%) на протяжении всего эксперимента, хотя некоторые мыши демонстрировали высокие уровни (до 20%) такого ответа даже в поздние моменты времени. Напротив, у большинства мышей, иммунизированных минигенной конструкцией, в последующие моменты времени обнаруживались постоянно повышенные уровни тетрамер-положительных CD8 Т-клеток. Это согласуется с ранее описанной кинетикой после иммунизации минигенными векторами.

Тетрамер-положительные клетки были фенотипированы, и было обнаружено, что они демонстрируют фенотипы инфляционных клеток, представляющие собой преимущественно эффекторную память (CD44⁺ CD62L⁻, фигура 8C), терминально дифференцированные, экспрессирующие KLRG1-hi (фигура 8D) и CX3CR1⁺ (фигура 8E). Эти клетки также имели низкий уровень PD-1 на более поздних стадиях и, что интересно, экспрессировали более низкие уровни PD-1 по сравнению с тетрамер-положительными клетками, которые были получены иммунизацией с использованием полноразмерного конструктора (фиг. 8F). Уровни других маркеров истощения, таких как Tim-3 и Lag-3, также были ниже в индуцированных минигеном тетрамер⁺ CD8 Т-клетках по сравнению с индукцией их полноразмерными аналогами (фиг. 8G и H). В совокупности эти данные показывают, что пептидные эпитопы CD8 Т-клеток на минигенных конструкциях способны подвергаться процессингу и загружаться в человеческие HLA-A2 антигены, которые затем способны инициировать и генерировать инфляцию CD8 Т-клеточного ответа. Кроме того, эти ответы являются сильными и продолжительными с очень низкой экспрессией ингибиторов контрольных точек или ее отсутствием даже в поздние моменты времени после иммунизации.

Пример 9: Иммунизация AdHu5-NY-ESO-1(157-165) обеспечивает контроль над заражением опухолью

Чтобы определить, способны ли эти ответы контролировать опухоли, мышам подкожно (s.c.) инъецировали большое количество клеток саркомы ($0,5-1 \times 10^6$ клеток), полученных от мышей HHD, которые были стабильно трансфицированы белком NY-ESO-1. Рост опухоли отслеживали. Результаты показывают, что мыши, иммунизированные минигеном AdHu5-NY-ESO-1, были способны задерживать рост опухоли на ранних и поздних стадиях (фиг. 9A), при этом у 2/10 животных наблюдалось полное исчезновение опухоли. Кроме того, этот контроль наблюдался как при высокой (сплошные линии), так и при более низкой (пунктирные линии) дозе заражения. Напротив, мыши, иммунизированные FL вектором, были способны контролировать рост опухоли при низкой дозе заражения, но не могли этого сделать при более высокой концентрации клеток (сплошные линии). Стоит отметить, что, поскольку мыши являются трансгенными только по HLA-A2, NY-ESO-1, представляющий собой человеческий белок, вероятно, был иммуногенным и распознавался наивными мышинными CD4 и CD8 Т-клетками при заражении опухолью. Кровь, взятую через две недели после заражения опухолью, анализировали на наличие Tet⁺ клеток. Через 14 дней после заражения опухолью во всех группах развивался обнаруживаемый в кровотоке ответ tet⁺, при этом группа,

иммунизированная MG, демонстрировала наибольшую его величину (фиг. 9B). Животные, у которых было более 2,5% tet⁺ клеток в кровотоке до заражения опухолью, демонстрировали лучший контроль роста опухоли в ранние и поздние моменты времени (фиг. 9C и D). Эта корреляция не наблюдалась у животных, иммунизированных векторами FL. Данные этой части эксперимента показывают, что однократная примирующая иммунизация минигенными векторами способна обеспечить долговременную защиту от заражения опухолью.

Пример 10: Иммунизация AdHu5-NY-ESO-1(157-165) приводит к популяции антигенспецифических Т-клеток в селезенке

Животных умертвляли, когда они достигали своей конечной точки, за которую принимали либо размер опухоли, приближающийся к 1300 мм³, либо развитие язв, которые не улучшались через 48 часов. Опухоли удаляли в промежутке между 17-29 днями для наивных групп, 28-29 днями для MG, 26-29 днями для FL и 22-29 днями для нерелевантных Ad групп. На этой стадии из опухолей и селезенки выделяли лимфоциты, чтобы выяснить, изменила ли иммунизация состав иммунного микроокружения опухоли и функциональность опухолеспецифических клеток. Были выделены спленоциты и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), и было обнаружено, что TIL из всех групп содержат близкие уровни CD8 Т-клеток (фиг. 10A). Уровни CD8 Т-клеток в селезенке были слегка повышены в группе, иммунизированной MG, но это не было статистически достоверно. NY-ESO-1 tet⁺ клетки были обнаружены в TIL всех групп без статистической разницы в процентном содержании Tet⁺ TIL между иммунизированными и неиммунизированными группами (фиг. 10B). Однако наблюдалась разница в процентном содержании Tet⁺ спленоцитов у животных, иммунизированных более высокими концентрациями MG и FL, по сравнению с неиммунизированными животными. Опухоли были удалены, поскольку они достигли конечной точки, и было обнаружено, что в этот момент времени экспрессия ингибитора контрольной точки PD-1 повышена в tet⁺ TIL во всех группах (фиг. 10C). Fas был повышен в спленоцитах, а также в TIL всех групп (фиг. 10D), что указывает на активацию Tet⁺ клеток. Интересно, что CD8 Tet⁺ спленоциты от животных, иммунизированных MG и FL, экспрессировали более высокие уровни PD-1, при этом животные, иммунизированные FL, демонстрировали самую высокую экспрессию PD-1 на спленоцитах. Иммунизация FL также приводила к более высоким уровням Lag-3 на спленоцитах и TIL. Lag-3 и Tim-3 не были повышены на Tet⁺ спленоцитах в других условиях; но их близкие уровни были обнаружены в Tet⁺ TIL во всех группах (фиг. 10E и F).

Пример 11: CX3CR1 повышается в антигенспецифических спленоцитах после иммунизации AdHu5-NY-ESO-1 (-)

ТЛ и спленоциты были дополнительно охарактеризованы маркерами инфляции памяти. Как и ожидалось, в селезенке только антиген-специфические CD8 Т-клетки от мышей, иммунизированных минигеном, показали более крупную популяцию с повышенной экспрессией CX3CR1 (фиг. 11А), но в опухоли антиген-специфические клетки из всех групп показали большой процент CX3CR1hi клеток (фиг. 11В). Большая часть антигенспецифических клеток в селезенке и опухолях всех групп представляли собой клетки эффекторной памяти (фиг. 11С). Чтобы выяснить, изменяет ли аденовирусная иммунизация микроокружение опухоли, измеряли уровни Treg в опухоли и селезенке — уровни Treg в селезенке были слегка повышены в группе полноразмерной иммунизации, хотя уровни Treg в опухоли не отличались между группами (фиг. 11D). Точно так же не было различий в уровнях резидентных антиген-специфических CD8 Т-клеток памяти в опухоли (фиг. 11Е), в отличие от того, что наблюдалось в модели опухоли СТ26.

Пример 12: CX3CR1hi CD8 Т-клетки более устойчивы к окислительному стрессу.

Инфляция клеток памяти активирует ряд молекул, вовлеченных в антиапоптозный путь, включая Bcl-XL. Сообщалось, что экспрессия CX3CR1 на моноцитах человека способствует выживанию клеток за счет снижения антиоксидантного стресса. Поэтому мы изучили, способствует ли экспрессия CX3CR1 выживанию при инфляции клеток памяти. Уровни внутриклеточных активных форм кислорода (ROS - reactive oxygen species) в CX3CR1+/-gfp спленоцитах мышей, инфицированных Ad-lacZ или MCMV, определяли через >50 дней после заражения с помощью CellROX Red анализа. Мы обнаружили, что в стационарном состоянии CX3CR1hi CD8 Т-клетки содержали более низкие уровни ROS по сравнению с популяциями CX3CR1 neg и int CD8 Т-клеток (фиг. 12А и 12С), что свидетельствует о том, что CX3CR1hi клетки изначально имеют более низкие уровни ROS. Интересно, что CX3CR1hi клетки от мышей CX3CR1gfp/gfp также обладают более низкими уровнями ROS по сравнению с субпопуляцией CX3CR1 neg, указывая на то, что этот эффект не зависит исключительно от передачи сигналов CX3CR1. Уровни активных форм кислорода (ROS) в общей субпопуляции CX3CR1+ CD8 Т-клеток (фиг. 12F, середина) и антиген-специфических CX3CR1+ Т-клетках (фиг. 12F, справа) также оставались ниже по сравнению с их CX3CR1neg аналогом в условиях сывороточного голодания, таким образом, демонстрируя повышенную окислительно-восстановительную устойчивость. Кроме того, при инкубации в бессывороточной среде (т.е. при стрессе), наблюдалась заметная

выживаемость большей части популяции CX3CR1+ Т-клеток по сравнению с CX3CR1-отрицательными Т-клетками (фиг. 12D) и антиген-специфическими популяциями (фиг. 12E).

Затем в этих субпопуляциях мы определяли процент деполяризованных митохондрий путем окрашивания лимфоцитов периферической крови мышей, постоянно инфицированных MCMV или аденовектором, с помощью MitoTracker Green, который используется в качестве маркера митохондриальной массы, и MitoTracker DeepRed, который окрашивает только поляризованные, здоровые митохондрии. Деполяризованные митохондрии являются положительными для MitoTracker Green, но не для MitoTracker DeepRed, и их можно отделить от поляризованных митохондрий с помощью проточной цитометрии. CX3CR1hi CD8 Т-клетки C57BL/6 мышей дикого типа содержат более низкий процент деполяризованных митохондрий, чем CX3CR1neg CD8.

Т-клетки (фиг. 12B). В совокупности эти результаты показывают, что мышинные CX3CR1hi CD8 Т-клетки обладают преимуществом в плане выживания по сравнению с их аналогами, CX3CR1neg CD8 Т-клетками, что может способствовать их длительному существованию и накоплению в организме хозяина.

Важно отметить, что рак связан с окислительным стрессом, опосредованным главным образом активными формами кислорода (ROS), генерируемыми злокачественными клетками, гранулоцитами, TAM и MSDC в микроокружении опухоли. Следовательно, когда клетки находятся внутри опухоли, эти свойства могут также защищать и поддерживать их цитотоксические функции.

Пример 13: Иммунизация AdHu5-R9F, кодирующим доминантный эпитоп E7 в HPV, защищает от заражения карциномой шейки матки TC1-HPV E6/E7

Защиту, обеспечиваемую минигенной конструкцией, кодирующей доминантный CD8 Т-клеточный эпитоп белка E7, сравнивали с защитой, обеспечиваемой аналогичной конструкцией, кодирующей полноразмерный белок E7, в модели профилактической иммунизации. Мыши, иммунизированные любой из этих конструкций, генерировали сильные эпитоп-специфические ответы (фиг. 13A), которые обеспечивали полную защиту при заражении опухолью (фиг. 13B). Не наблюдалось различий, наблюдаемых в уровне защиты, который обеспечивался цельным белком по сравнению с одним только эпитопом.

Пример 14: Синергический эффект после иммунизации панелью минигенов, кодирующих CD8 Т-клеточные эпитопы против MCMV в субоптимальной дозе

Была создана панель из 3 минигенов против известных MCMV-специфических CD8 Т-клеточных эпитопов, а именно M45 (⁹⁸⁵HGIRNASFI⁹⁹³, SEQ ID NO:10), M38 (³¹⁶SSPPMFRV³²⁵, SEQ ID NO:11) и m139 (⁴¹⁹TWYGFCLL⁴²⁶, SEQ ID NO:12). Их вводили внутривенно C57BL/6 мышам в виде отдельных минигенов или смешивали вместе и вводили в виде коктейля. Миниген, кодирующий M38 и M139, вводили в субоптимальной дозе 1×10^7 инфекционных единиц (МЕ), тогда как миниген, кодирующий M45, вводили в оптимальной дозе 1×10^8 МЕ. Измеряли уровни M38-специфических клеток в крови на 7 день после иммунизации. Удивительно, но у мышей, которым вводили комбинированную минигенную вакцину, содержащую M38-миниген и m139-миниген в субоптимальных дозах, плюс M45-миниген в оптимальной дозе, вырабатывались более высокие уровни M38-специфических Т-клеток по сравнению с группами, которым вводили только субоптимальную дозу одного M38-минигенного вектора. Этот неожиданный результат позволяет предположить, что доставка смеси минигенных векторов в субоптимальных дозах может иметь аддитивный эффект в отношении увеличения количества антигенспецифических Т-клеток по сравнению с наблюдаемым при иммунизации субоптимальной дозой только одного вектора.

Пример 15: Иммунизация минигеном изменяет окружение опухоли, что приводит к более высоким уровням гранзима В.

Иммунизацию минигеном проводили с последующим анализом уровней гранзима В. Уровни гранзима В в общем количестве CD8+ Т-клеток в опухолях оценивали через 23 дня после имплантации опухоли, через 16 дней после иммунизации минигеном путем окрашивания внутриклеточных цитокинов с последующей проточной цитометрией суспензий отдельных клеток, полученных из опухоли. Как видно на фиг. 15, уровень гранзима В был значительно выше в CD8+ Т-клетках, иммунизированных минигенным вектором, по сравнению с иммунизацией вектором, содержащим полноразмерный эпитоп. Размер опухоли также оценивали через 23 дня после имплантации опухоли, фигура 15 демонстрирует, что иммунизация минигеном значительно сокращала размер опухоли по сравнению с контролем.

Также оценивали уровень факторов транскрипции Eomes и Tbet в тетрамер+ CD8 Т-клетках. Тетрамер+ CD8 Т-клетки, взятые у животных, иммунизированных минигенными векторами, экспрессировали более высокие уровни Tbet и более низкие уровни Eomes по сравнению с тетрамер+ клетками, выделенными из других групп. Это находится в соответствии с фенотипом инфляции памяти.

Пример 16. Комбинация иммунизации минигеном и анти-PD-L1 терапии усиливает контроль над опухолью.

Сообщалось, что опухоли CT26 не отвечают на монотерапию анти-PD-1/PD-L1 (Selby и др., Preclinical Development of Ipilimumab and Nivolumab Combination Immunotherapy: Mouse Tumor Models, In Vitro Functional Studies и Cynomolgus Macaque Toxicology. PLoS ONE. Public Library of Science; 2016 Sep 9;11(9):e0161779–19). Однако представленные здесь данные демонстрируют, что комбинированная терапия минигеном и анти-PD-L1 приводит к усилению контроля над опухолью и повышению выживаемости.

Группы мышей иммунизировали аденовирусными векторами, как показано на фиг. 16. Через 7 дней после заражения опухолью мышам вводили анти-PD-L1 или изотипический контроль. На Фигуре 16А показано, что при введении минигена в комбинации с анти-PD-L1-терапией наблюдается усиленный контроль над опухолью (т.е. уменьшение размера опухоли). Комбинированная терапия также приводит к увеличению времени до достижения гуманной точки у всех подвергнутых лечению животных примерно на 33% по сравнению с нелечеными мышами, иммунизированными IrrAdHu5. Кривые выживания для всех групп мышей показаны на фигуре 16В. Оценивали % GP70₄₂₃₋₄₃₁ Tet⁺ клеток в кровотоке через 15 дней после иммунизации (22 дня после заражения опухолью). Комбинированная терапия повышала уровни тетрамер⁺ клеток в кровотоке по сравнению с лечением одним минигеном (фиг. 16С) и значительно снижала скорость роста опухолей (фиг. 16D).

Пример 17. Анализ продукции IFN γ в клетках опухоли и селезенки.

Отдельные клетки, выделенные из селезенки и опухоли, получали как от профилактически, так и от терапевтически иммунизированных мышей, стимулировали *ex vivo* с помощью АН1-пептида (4 мкг/мл) или РМА-иономицина (IO) в течение 7 часов, а затем окрашивали для определения внутриклеточной продукции цитокина IFN γ . Клетки, секретирующие повышенные уровни IFN γ , были обнаружены только в селезенках профилактически (фиг. 17А) или терапевтически (фиг. 17В) иммунизированных групп, а в опухоли были обнаружены клетки, секретирующие низкие уровни IFN γ или его отсутствие (фиг. 17С и фиг. 17D). В экспериментах, сочетающих терапевтическую вакцинацию с анти-PD-L1, проводили *ex vivo* стимуляцию пептидом АН1 (4 мкг/мл) или РМА-иономицином (IO) в течение 7 часов, а затем окрашивали для оценки внутриклеточной продукции цитокинов IFN γ . Количество CD8 Т-клеток, секретирующих IFN γ , как в селезенке, так и в опухоли было увеличено в образцах, подвергнутых комбинированной терапии, по сравнению с лечением только минигеном (фиг. 17Е и фиг. 17G). В компартменте CD4 Т-

клеток IFN γ -секретирующие CD4 T-клетки могут быть обнаружены в опухолях (фиг. 17H) вакцинированной группы, в которой вакцинация сочеталась с анти-PD-L1, но не в селезенке (фиг. 17F).

Пример 18. Иммунизация комбинацией двух AdHu-5 минигенов (MG), кодирующих два разных опухолевых антигена, обеспечивает улучшенную выживаемость по сравнению с иммунизацией одним минигеном в модели терапевтической иммунизации.

Мышам подкожно имплантировали опухолевые клетки CT26 (5×10^5 клеток/мышь). Через 6 дней мышей вакцинировали индивидуальными минигенными вакцинами, кодирующими разные опухолевые CT26-антигены, AdHu5-AH1-MG или AdHu5-e2F8-27merMG в дозе 1×10^8 ME, или двумя минигенными вакцинами вместе (Combo, обе в дозе 1×10^8 ME). Половине каждой группы вводили ингибитор контрольной точки анти-PD-1 в 12й, 16й и 19й день после имплантации, оставшейся половине группы вводили изотипический контроль. Рост опухоли отслеживали, пока он не приближался к $1,3 \text{ см}^3$.

На Фигуре 18 B-F показано, что вакцинация комбинированными вакцинами (Combo) замедляла рост опухоли по сравнению с отрицательными контролями (невакцинированные или вакцинированные AdHu5-MG, кодирующим нерелевантный антиген).

На Фигуре 19A показано, что лечение комбинированной вакциной плюс анти-PD-1 повышает выживаемость по сравнению с отрицательным контролем, при этом лечение комбинированными вакцинами в целом увеличивает медиану выживаемости по сравнению с отрицательным контролем или группами, вакцинированными только одной минигенной вакциной, как показано на Фигуре 19B.

Скорость роста опухолей определяли с помощью простого линейного регрессионного анализа размеров опухоли с течением времени для расчета наклона кривой (больше угол = выше скорость роста) (фиг. 20). В качестве альтернативы те же данные использовались для расчета скорости роста как удельной скорости роста (фиг. 23). Показаны значения для отдельных мышей в зависимости от типа вакцинации. Комбинированная вакцинация значительно замедляла рост опухоли по сравнению с группами отрицательного контроля (Фигура 20 и Фигура 23). Образцы крови брали через 6 дней после вакцинации и окрашивали поверхностными маркерами против CD8 и тетрамеров, специфичных для антигена AH-1 или e2f8 (фиг. 21). Показан % Tet⁺ в компартменте живых CD8 T-клеток. Вакцинация комбинированными вакцинами увеличивает численность популяции AH-1 tet⁺ клеток по сравнению с группой, вакцинированной только AdHu5-AH-1 MG (фиг. 21). Фигуры 22 и 23 демонстрируют, что

одновременная внутривенная иммунизация двумя минигенными конструктами/вакцинами (combo) приводит к индукции обеих антиген-специфических популяций в тех же количествах и с тем же фенотипом, что и одиночная вакцина, и контролирует рост опухоли.

Методы

Животные

Эксперименты на мышах проводились в соответствии с правилами министерства внутренних дел Великобритании (номер лицензии PVA43A2E4 и PPL 30/3293) и были одобрены местным этическим комитетом Оксфордского университета. Самцов и самок мышей содержали в условиях, свободных от специфических патогенов (SPF), в индивидуально вентилируемых клетках и кормили обычной пищей. Взрослые ННД мыши, трансгенные по HLA-A2, были выведены в университетском центре BSL2 и любезно предоставлены Vincenzo Cerundolo (HIU, Оксфордский университет, Оксфорд). Мышей Balbc в возрасте 6-8 недель получали из Charles River (Маргейт, Великобритания).

Аденовирусные векторы

Для исследований NY-ESO-1 полноразмерный ген NY-ESO-1 или доминантный CD8 Т-клеточный эпитоп SLWTQC клонировали в вектор AdHu5. Для исследований CT-26 полноразмерный ген gp90 вируса мышиноного лейкоза или доминантный CD8 Т-клеточный эпитоп SPSYVYHQF (SEQ ID NO:1) вставляли, как указано выше, для получения конструктов AdHu5-FL и AdHu5-AH1-MG. Конструкты нарабатывали, очищали и количественно определяли с помощью Viral Vector Core Facility (Оксфорд, Великобритания) в клетках 293A, очищали центрифугированием с хлоридом цезия, и стоки хранили при -80°C в PBS. Второй конструкт AdHu5-e2f8-27MG, кодирующий иммуногенную мутацию из опухоли CT26, содержащую предсказанный CD8 Т-клеточный эпитоп, VILPQAPSGPSYATYLQPAQAQMLTPP (SEQ ID NO:4), получали, нарабатывали в 293A клетках и очищали с помощью мембранной очистки (Sartorius).

Для исследований HPV16 E7 полноразмерный ген HPV16 E7 или доминантный CD8 Т-клеточный эпитоп RAHYNIVTF (SEQ ID NO:7) клонировали в вектор AdHu5. Контрольные векторы содержали CD8 Т-клеточный эпитоп ICPMYARV (SEQ ID NO:8) из бактериального фермента β-галактозидазы, встроенный в вектор AdHu5.

Иммунизация мышей, заражение опухолью и лечение антителом против PD-L1

Мышей иммунизировали внутривенно путем инъекции в хвостовую вену $1 \times 10^{7-9}$ инфекционных единиц (МЕ) вируса, как указано. Линии клеток ННД-саркомы,

трансгенные для NY-ESO-1, или CT26 колоректального рака, или TC-1 (экспрессирующие NPV 16 E7), инъецировали подкожно в бок в количестве $0,1-1 \times 10^6$ клеток/200 мкл. Тестирование микоплазмы проводили на клеточных линиях перед инъекцией, и использовали только отрицательные по микоплазме клетки.

После заражения опухолью за мышами наблюдали, и при пальпации диаметр опухоли измеряли каждые 1-2 дня с помощью цифровых штангенциркулей, а объем рассчитывали с использованием модифицированной формулы эллипсов,

объем = (ширина)² x длина/2, чтобы определить скорость роста опухоли.

Для исследований с терапевтическим заражением мышам сначала подкожно имплантировали в бок опухолевые клетки, а через 6-7 дней животных иммунизировали внутривенно через хвостовую вену соответствующими аденовирусными векторами в дозе $1 \times 10^{7-9}$ ME, и измеряли опухоли, как описано выше. В некоторых экспериментах мышам на 14, 17, 20 и 22 день после имплантации опухоли внутривенной инъекцией вводили 0,2 мг антимышиного PD-L1 (клон 10F.9G2, Biolegend), или изотипический контроль.

Выделение лимфоцитов из крови и тканей

Образцы крови, селезенки и опухоли обрабатывали с помощью ферментативного и механического расщепления для получения популяций лимфоцитов с высокой жизнеспособностью. Опухоли вырезали и затем расщепляли коллагеназой и ДНКазой в течение 45 минут при 37°C. Расщепленные опухоли пропускали через 100 мкм клеточное сито, затем промывали полным RPMI и осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 минут. Осадок клеток ресуспендировали и затем пропускали через клеточное сито с размером ячеек 40 мкм, после чего промывали и осаждали, как и раньше. Затем выделенные опухолевые клетки ресуспендировали и подсчитывали.

Обнаружение и анализ опухолевых и вакциносpezifических Т-клеток

Подробная информация о тетрамерах и пентамерах, используемых для обнаружения вируса и вакцин-специфических Т-клеток, представлена в таблице 2.

Таблица 2

тип HLA	Целевой эпитоп	Последовательность аминокислот	Аббревиатура/ SEQ ID NO	Источник
<i>Человек</i>				

тип HLA	Целевой эпитоп	Последовательность аминокислот	Аббревиатура/ SEQ ID NO	Источник
A*0201	NY-ESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	SLLMWITQC	NY-ESO-1 SEQ ID NO: 2	NIH Tetramer Facility
<i>Мышь</i>				
H-2Ld	MuLV env gp70 ₄₂₃₋₄₃₁	SPSYVYHQF	AH1 SEQ ID NO:1	NIH Tetramer Facility
H-2Dd	MuLV gp90 ₁₄₇₋₁₄₈	GGPESFYCASW	GSW11 SEQ ID NO:3	NIH Tetramer Facility
H-2Kd	Mtch1 ₃₆₁₋₃₆₉	KYLSVQSQL	Mtch1 (9mer) SEQ ID NO:6	Immudex
H-2Kd	Mtch1 ₃₆₁₋₃₇₀	KYLSVQSQLF	MTCH1(10mer) SEQ ID NO:5	Immudex
H-2Dd	E2f8 ₅₁₆₋₅₂₄	SGPSYATYL	e2f8 SEQ ID NO:38	Immudex
H-2Kb	β gal ₄₉₇₋₅₀₄	ICPMYARV	I8V SEQ ID NO:8	NIH Tetramer Facility
H-2Ld	MCMV- m123/pp89 ₁₆₈₋₁₇₆	YPHFMPNL	pp89 SEQ ID NO:9	NIH Tetramer Facility
H-2Db	MCMV-M45 ₉₈₅₋₉₉₃	HGIRNASFI	M45 SEQ ID NO:10	NIH Tetramer Facility
H-2Kb	MCMV-M38 ₃₁₆₋₃₂₄	SSPPMFRV	M38 SEQ ID NO:11	NIH Tetramer Facility
H-2Kb	MCMV-m139 ₄₁₉₋₄₂₆	TWYGFCLL	m139 SEQ ID NO:12	NIH Tetramer Facility

тип HLA	Целевой эпитоп	Последовательность аминокислот	Аббревиатура/ SEQ ID NO	Источник
H-2Db	HPV16 E7 ₄₉₋₅₇	RAHYNIVTF	E7 ₄₉₋₅₇ SEQ ID NO:7	NIH Tetramer Facility

Реагенты, перечисленные в таблице 2, были синтезированы в виде мономеров и подвергнуты тетрамеризации добавлением стрептавидина-PE (BD Bioscience) или стрептавидина-APC (Invitrogen, Paisley, UK). Пептиды для получения мономеров были получены от Proimmune (Оксфорд, Великобритания). Аликвоты приблизительно по 50 мкл цельной крови окрашивали с использованием 50 мкл раствора, содержащего комплексы тетрамерных пептидов класса I, при 37 °C в течение 20 минут с последующим окрашиванием моноклональными антителами и фиксируемым красителем NIR LIVE/DEAD.

Окрашивание антител

Суспензии отдельных клеток блокировали FcR-блокирующим реагентом, (CD16/CD32, eBiosciences) (20 минут при 4 °C), чтобы предотвратить неспецифическое связывание антител. Затем клетки иммуноокрашивали тетрамером (как описано выше) и различными антителами, конъюгированными с флуорохромом (20 минут при 4°C). Во все панели антител добавляли фиксируемый краситель для определения жизнеспособности (LIVE/DEAD™ краситель ближнего ИК-диапазона (Invitrogen)) для исключения из анализа мертвых клеток. Для проточной цитометрии использовали следующие антитела в концентрации 1:100 за исключением, отмеченных в списке: CD4-AF700 (RMA4-4, Biolegend), CD8 (53-6.7 eBiosciences or Biolegend), CD11a/CD18/LFA-1 (H155-78, Biolegend), CD25 (PC61.5, eBiosciences), CD27 (LF.3A10, Biolegend), CD44 (IM7, eBiosciences), CD62L (MEL-14, Biolegend), CD69 (H1.2F3, Biolegend, 1/200), CD95/Fas (Jo2 BD), CD103 (2E7, Biolegend, 1/200), CD127 (SB/199, Biolegend), CD279/PD-1 (RMP1-30, Biolegend), CX3CR1 (SA011F11, Biolegend), FoxP3 (FJK-16s, eBiosciences), IFN- γ (XMG1.2, eBiosciences), IL-2 (JES6-5H4, eBiosciences), KLRG1 (2F1, abcam), TNF- α (MP6-XT22, eBiosciences). Перед фиксацией и пермеабелизацией образцов отдельных клеток (с использованием набора буферов для окрашивания FoxP3/Transcription Factor, Invitrogen), необходимых для внутриклеточного окрашивания, проводили внеклеточное окрашивание. Для внутриклеточного окрашивания цитокинов отдельные клетки, полученные из опухоли или селезенки, ex vivo стимулировали пептидом (4 мкг/мл) вместе с положительным (2

мкг/мл РМА и 4,4 мкг/мл Ю) и отрицательным (только среда) контролем в течение 2,5 часов, после чего клетки инкубировали с GolgiPlug (BD, 1 мкл/мл) в течение 4,5 часов при 37°C.

Используемые антитела перечислены в таблице ниже. Их использовали в разведении 1:100, если не указано иное.

Таблица 3:

Антитела	Поставщик	Клон	Каталожный номер	Разбавление
Анти-человеческое/мышинное CD44 FITC	eBioscience	IM7	1929433	
Анти-человеческое/мышинное гранзим-b PB	Biolegend	GB11	B243514	
Анти-человеческое/мышинное T-bet APC	eBioscience	eBio4B10	E12135-1631	
Анти-мышинное CD103 Pacific Blue/BV421	Biolegend	2E7	B227281	1/200
Анти-мышинное CD11a/CD18/LFA-1 PE/Cy7	Biolegend	H155-78	141011	
Анти-мышинное CD127 APC	Biolegend	SB/199	121122	
Анти-мышинное CD223 (LAG-3) PerCP Cy5.5	Biolegend	C9B7W	B261545	
Анти-мышинное CD25 AF700	Biolegend	PC61	B102024	
Анти-мышинное CD25(IL-2R a-chain) FITC	BD Pharmingen	/	M056210	
Анти-мышинное CD27 PerCP/Cy5.5	Biolegend	LF.3A10	124214	
Анти-мышинное CD279 (PD1) PE-Cy7	Biolegend	RMP1-30	B228182	
Анти-мышинное CD4 AF700	eBioscience	GK1.5	4313129	
Анти-мышинное CD4 BV650	Biolegend	GK 1.5	B282965	
Анти-мышинное CD4 Pacific Blue	eBioscience	RM4-5	E08484-1634	

Антитела	Поставщик	Клон	Каталожный номер	Разбавление
Анти-мышинное CD44 BV605	Biologend	IM7	B230511	
Анти-мышинное CD62L AF700	Biologend	MEL-14	B268247	
Анти-мышинное CD62L PE Cy7	eBioscience	MEL-14	E07577-1631	
Анти-мышинное CD69 BV605	Biologend	H1.2F3	B237998	
Анти-мышинное CD69 PerCP Cy5.5	Biologend	H1.2F3	B277659	1/200
Анти-мышинное CD8a AF700	eBioscience	53-6.7	E08952-1632	
Анти-мышинное CD8a APC	Biologend	53-6.7	B244174	
Анти-мышинное CD8a BV650	Biologend	53-6.7	B253266	
Анти-мышинное CD8a FITC	Biologend	53-6.7	B277418	
Анти-мышинное CD8a PB/efluor450	eBioscience	53-6.7	E08488-1632	
Анти-мышинное CD8a PerCP Cy5.5	Biologend	53-6.7	B249622	
Анти-мышинное CD95/Fas	BD	Jo2	554259	
Анти-мышинное CX3CR1 BV421	Biologend	SA011F11	B262849	
Анти-мышинное Fas FITC	Pharmingen	/	M076296	
Анти-мышинное IFN- γ PE	Invitrogen	XMG1.2	2028218	
Анти-мышинное IL-2 APC	Biologend	JES6-5H4	B248052	
Анти-мышинное KLRG1 FITC	Abcam	2F1	ab24867	
Анти-мышинное Tim-3 APC	Biologend	B8.2C12	B228873	

Антитела	Поставщик	Клон	Каталожный номер	Разбавление
Анти-мышинное Tim-3 BV605	Biologend	RMT3-23	B262042	
Анти-мышинное Tim-3 PerCP Cy5.5	Biologend	RMT3-23	B224464	
Анти-мышинное TNF α FITC	Invitrogen	MP6-XT22	1927452	
Анти-мышинное /человеческое CD44 PE/PE-	Biologend	IM7	B250780	
Анти-мышинное /крысиное FoxP3 PE-Cy7	Invitrogen	FJK-16s	4344418	
Eomes PerCP Cy5.5	eBioscience (San Diego,	Dan11mag	E12115-1631	
L/D (near IR fluorescent reactive dye) APC Cy7	Invitrogen	/	1937144	

Проточная цитометрия

Все образцы с иммуноокрашиванием анализировали с помощью проточной цитометрии на проточном цитометре BD LSR II. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения FlowJo v10. Клетки гейтировали по лимфоцитам, одиночным клеткам, живым клеткам и последующим соответствующим маркерам для анализа.

Анализ CellROX red

Одноклеточные спленоциты получали из CX3CR1gfp/+ или gfp/gfp мышей, ранее инфицированных >50 MCMV или Ad-lacZ. Спленоциты высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в полной среде (RPMI+10% FCS) в течение 48 часов. Клетки центрифугировали и промывали 200 мкл стерильной DPBS (Life Technologies). Затем клетки обрабатывали или бессывороточной RPMI, либо RPM+10% FCS (добавляли по 40 мкл на лунку). Инкубировали в течение 1-1,5 часов при 37°C. Реагент CellROX red (Life Technologies) разбавляли 1:50 бессывороточной средой, затем в каждую лунку добавляли по 4 мкл разбавленного реагента и инкубировали в течение 40 минут при 37°C. Затем клетки окрашивали соответствующими поверхностными антителами (подходящим тетрамер-PE, CD8-eFluor 450, CD62L-AlexaFluor 700, CD44-PerCP-Cy5.5 и Fixable Live Dead маркером) в течение 20 минут при 37°C. Клетки промывали PBS, а затем ресуспендировали в PBS и

анализировали на LSRII, среднее геометрическое CellROX red на живых CD8 T-клетках рассчитывали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Анализ MitoTracker

PBL от мышей C57BL/6, инфицированных MCMV или рекомбинантным аденовектором AdHu5 (Ad-I8V) >100 дней назад, окрашивали анти-мышинным CD8, анти-мышинным CX3CR1, фиксируемым маркером ближней ИК области LiveDead. Окрашивание 12,5 нм MitoTracker Green и 12,5 нм MitoTracker DeepRed (Fisher Scientific) в течение 30 мин при 37°C проводили перед окрашиванием поверхности, и затем анализировали на LSRII, а данные рассчитывали на FlowJo.

Статистический анализ

Описательную статистику (средние проценты, стандартные отклонения, количество) рассчитывали с использованием GraphPad PRISM (Graphpad software, Inc., La Jolla, CA). P-значения для сравнения средних определяли с помощью T-критерия, одностороннего и двустороннего дисперсионного анализа ANOVA и корректировали с помощью метода Шидака-Холма для множественных сравнений. Статистическую значимость определяли как $p < 0,05$.

Способ получения рекомбинантного AAV-минигена

Рекомбинантный AAV, кодирующий интересующий миниген, получали путем трансфекции HEK293 клеток тремя плазмидами: (1) плазмидой AAV-ITR, содержащей интересующий миниген [AAV-ITR-minigene], (2) аденовирусной хелперной плазмидой, кодирующей аденовирусные белки E2A, E4 и VA, необходимые для репликации AAV, и (3) хелперной плазмидой, кодирующей гер и сар AAV гены, необходимые для упаковки AAV-ITR минигена внутри вирусных частиц AAV.

Векторные последовательности:

Ниже приведены примеры последовательностей, которые можно использовать в векторе по настоящему изобретению.

SEQ ID NO: 13 Нуклеотидная последовательность аденовируса AdHu5 от 5' к cassette минигенного иммуногена:

SEQ ID NO:14 Нуклеотидная последовательность аденовируса AdHu5 от 3' к cassette минигенного иммуногена:

Минигенная иммуногенная cassette:

SEQ ID NO:15 Нуклеотидная последовательность минигенной иммуногенной cassette от 5' к Т-клеточному эпитопу

Нуклеотидная последовательность минигенной иммуногенной cassette от 5' к последовательности Т-клеточного эпитопа

SEQ ID NO:16 последовательность attR1

SEQ ID NO:17 последовательность attL1

SEQ ID NO:18 последовательность CMV промотора

SEQ ID NO:19 последовательность Козака

SEQ ID NO:20 стартовый кодон

Т-клеточные эпитопы:

SEQ ID NO:2 эпитоп NY-ESO-1

SEQ ID NO:21 нуклеотидная последовательность эпитопа NY-ESO-1 с кодонами, оптимизированными для Homo sapiens

SEQ ID NO:1 эпитоп AH1

SEQ ID NO:22 нуклеотидная последовательность эпитопа AH1 с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:3 эпитоп GSW11

SEQ ID NO:23 нуклеотидная последовательность эпитопа GSW11 кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:4 эпитоп e2f8

SEQ ID NO:24 нуклеотидная последовательность эпитопа e2f8 с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:5 эпитоп Mtch1-10mer

SEQ ID NO:25 нуклеотидная последовательность эпитопа Mtch1-10mer с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:6 эпитоп Mtch1-9mer

SEQ ID NO:26 нуклеотидная последовательность эпитопа Mtch1-9mer с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:8 эпитоп I8V

SEQ ID NO:27 нуклеотидная последовательность эпитопа I8V с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:9 эпитоп pp89

SEQ ID NO:28 нуклеотидная последовательность эпитопа pp89 с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:10 эпитоп M45

SEQ ID NO: 29 нуклеотидная последовательность эпитопа M45 с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:11 эпитоп M38

SEQ ID NO:30 Нуклеотидная последовательность эпитопа M38 с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:12 эпитоп m139

SEQ ID NO:31 нуклеотидная последовательность эпитопа m139 с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:7 эпитоп HPV16 E7₄₉₋₅₇

SEQ ID NO:32 нуклеотидная последовательность эпитопа HPV16 E7₄₉₋₅₇ с кодонами, оптимизированными для Mus Musculus

SEQ ID NO:33 нуклеотидная последовательность минигенной иммуногенной кассеты от 3' к последовательности Т-клеточного эпитопа

Нуклеотидная последовательность минигенной иммуногенной кассеты от 3' к последовательности Т-клеточного эпитопа:

Стоп-кодон

SEQ ID NO: 34 поли-А-последовательность BGH

SEQ ID NO:35 последовательность attL2

SEQ ID NO:36 последовательность attR2

Описанная выше минигенная иммуногенная кассета может быть использована с вектором AAV. Например, можно использовать вектор AAV, содержащий инвертированные концевые повторы. Пример последовательности приведен ниже.

SEQ ID NO:38 Нуклеотидная последовательность AAV от 5' к минигенной иммуногенной кассете

Описание нуклеотидной последовательности AAV от 5' к минигенной иммуногенной кассете:

SEQ ID NO: 39 5'-нуклеотидная последовательность ITR

SEQ ID NO: 40 дополнительные 5'- последовательности к кассете минигенного иммуногена

SEQ ID NO:41 Нуклеотидная последовательность аденовируса AAV от 3' к кассете минигенного иммуногена

Описание нуклеотидной последовательности аденовируса AAV от 3' к кассете минигенного иммуногена:

SEQ ID NO:42 3'-нуклеотидная последовательность ITR

SEQ ID NO: 43 5'-дополнительные последовательности 3' к кассете минигенного иммуногена

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

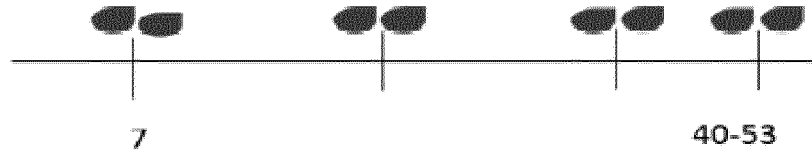
1. Аденовирусный вектор или аденоассоциированный вирусный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую одиночный ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп, при этом вектор способен индуцировать инфляционный ответ CD8+ Т-клеток памяти, причем указанный вектор не содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую дополнительные ракоспецифичные Т-клеточные эпитопы.
2. Вектор по п.1, отличающийся тем, что вектор способен индуцировать продукцию CD8+ Т-клеток, характеризующихся маркерами, выбранными из группы, содержащей CX3CR1+, KLRG-1+, CD44+, CD62L-.
3. Вектор по п.1, отличающийся тем, что вектор способен индуцировать продукцию CD8+ Т-клеток, характеризующихся маркерами, выбранными из группы, содержащей CX3CR1+, KLRG-1+, CD44+, CD62L-, CD27-(низкий уровень), CD127-(низкий уровень).
4. Вектор по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп, содержит от 12 до 45 пар нуклеотидных оснований.
5. Вектор по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп, содержит от 24 до 45 пар нуклеотидных оснований.
6. Вектор по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп получен из ассоциированного с опухолью антигена.
7. Вектор по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что Т-клеточный эпитоп в раковой клетке мутирован.
8. Вектор по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что Т-клеточный эпитоп сверхэкспрессирован в раковой клетке.

9. Вектор по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что Т-клеточный эпитоп получен из ассоциированного с опухолью антигена, выбранного из группы, состоящей из TRP-1, CEA, TAG-72, 9D7, Ep-CAM, EphA3, теломеразы, мезотелина, SAP-1 Melan-A/MART-1, тирозиназы, CLPP, циклин-A1, циклин-B1 MAGE-A1, MAGE-C1, MAGE-C2, SSX2, XAGE1b/GAGED2a, CD45, глипикана-3, IGF2B3, калликреина-4, KIF20A, ленгсина, мелоз, MUC5AC, сурвивина, PRAME, SSX-2, NY-ESO-1/LAGE1, gp70, MC1R, TRP-1/-2, β -катенина, BRCA1/2, CDK4, фетального белка SIM1.
10. Вектор по п.9, отличающийся тем, что Т-клеточный эпитоп содержит SEQ ID NO:2 (SLLMWITQC).
11. Вектор по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что ракоспецифичный CD8+ Т-клеточный эпитоп специфичен в отношении колоректального рака, рака предстательной железы, рака пищевода, рака печени, рака почки, рака легких, рака молочной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака головного мозга, гепатоцеллюлярного рака, лимфомы, лейкемии, рака желудка, рака шейки матки, рака яичников, рака щитовидной железы, меланомы, карциномы, рака головы и шеи, рака кожи, рака носоглотки, рака, вызванного вирусом Эпштейна-Барра, рака, вызванного вирусом папилломы человека, и саркомы мягких тканей.
12. Вектор по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что вектор относится к человеческому серотипу 5 (AdHu5).
13. Вектор по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что вектор содержит CMV промотор.
14. Вектор по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что вектор содержит ТАТА-бокс.
15. Вектор по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что вектор не содержит белков E1 и E3.
16. Иммуногенная композиция, содержащая вектор по любому из пп.1-15.
17. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере два вектора по любому из пп.1-15.

18. Композиция по п.17, в которой каждый вектор кодирует отличающийся ракоспецифичный CD8⁺ Т-клеточный эпитоп.
19. Композиция по любому из пп.16-18, содержащая один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант.
20. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.1-15 или иммуногенную композицию по любому из пп.16-19.
21. Вектор или композиция по любому из пп.1-19 для применения в терапии.
22. Вектор или композиция по любому из пп.1-19 для применения в лечении или профилактике рака.
23. Способ лечения или профилактики рака, включающий введение терапевтически эффективного количества вектора по пп.1-15 или композиции по пп.16-19.
24. Способ индукции инфляционного ответа CD8⁺ Т-клеток памяти, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества вектора по любому из пп. 1-15 или композиции по любому из пп. 16-19 нуждающемуся в этом субъекту, причем CD8⁺ Т-клетки характеризуются маркерами, выбранными из группы, содержащей CX3CR1⁺, KLRG-1⁺, CD44⁺ и CD62L⁻.
25. Вектор или композиция по п.21 или п.22, способ по п.23 или п.24, где вектор или композицию вводят внутривенно или внутримышечно.
26. Вектор или композиция по п.21 или п.22, способ по п.23 или п.24, где вектор или композицию вводят в виде однократной дозы.
27. Вектор или композиция по п.21 или п.22, способ по п.23 или п.24, где вектор или композицию вводят в виде нескольких доз.

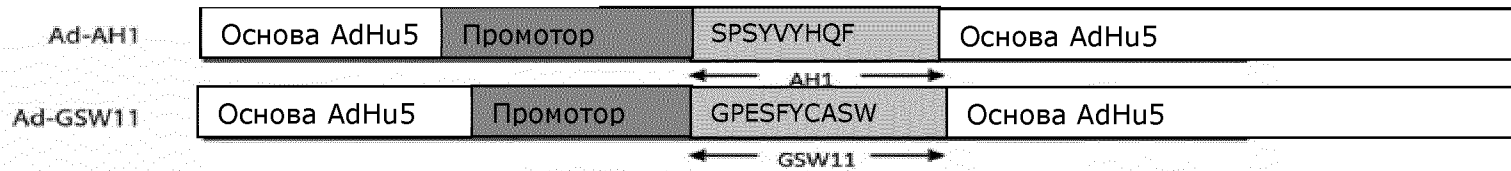
28. Вектор или композиция по п.21 или п.22, способ по п.23 или п.24, где вектор или иммуногенную композицию вводят субъекту профилактически.
29. Вектор или композиция по п.21 или п.22, способ по п.23 или п.24, где вектор или иммуногенную композицию вводят субъекту терапевтически.
30. Вектор или композиция по п.21 или п.22, способ по п.23 или п.24, где вектор или композицию вводят в комбинации с иммуномодулирующей молекулой отдельно, последовательно или одновременно.
31. Способ, вектор или композиция по п.30, где иммуномодулирующая молекула представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки.
32. Способ, вектор или композиция по п.31, где ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор белка иммунной контрольной точки, выбранного из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM3, LAG-3, B7-H3, B7-H4, B7-H6, A2aR, BTLA, GAL9 и IDO.
33. Способ получения вектора по любому из пп.1-15, включающий следующие стадии:
- i) синтез последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей эпитоп, в качестве смыслового и антисмыслового праймера,
 - ii) клонирование последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность эпитопа, в первую плазмиду,
 - iii) клонирование последовательности, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую эпитоп, во второй вектор, содержащий аденовирусную ДНК.
34. Набор, содержащий вектор по любому из пп.1-15 или композицию по любому из пп.16-19, один или несколько дополнительных активных ингредиентов, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или адъювант и, необязательно, инструкцию по применению.
35. Способ индукции Т-клеточного иммунного ответа у животного против эпитопа ракоспецифичного CD8+ Т-клеточного эпитопа, включающий приведение клетки в контакт с вектором по пп. 1-15 или композицией по пп. 16-19.

Мыши BalbC

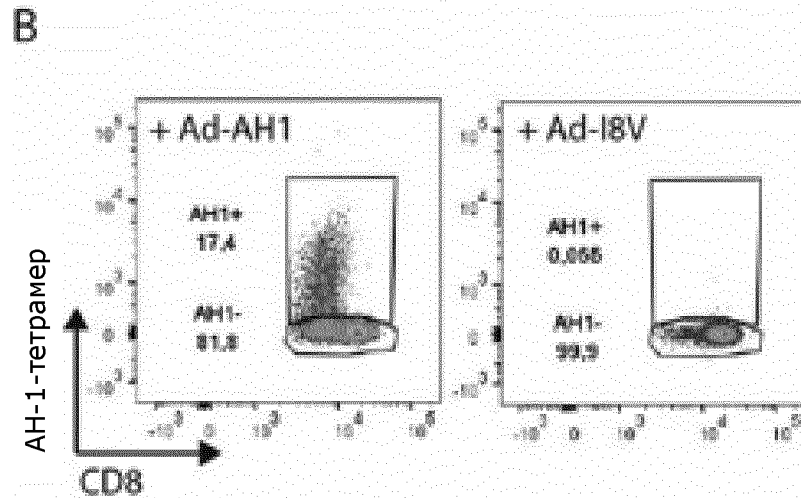


1. $1 \cdot 10^8$ ME Ad-Hu5-AH1 (Dom)
2. $1 \cdot 10^8$ ME Ad-Hu5-AH1 (Dom) + $1 \cdot 10^8$ ME Ad-Hu5-GSW (Sub)
3. $1 \cdot 10^8$ ME Ad-Hu5-I8V (I8V)
4. Наивные – контроль (N=5 на группу)

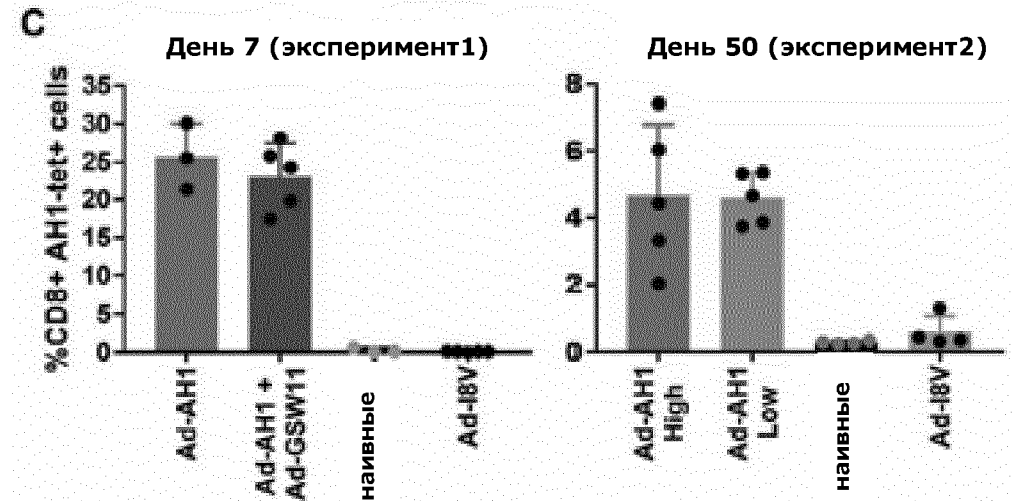
Определяли AH1 и/или GSW-специфичные Т-клетки с использованием тетрамеров. Определяли фенотип клеток – являются ли они эффекторными клетками памяти



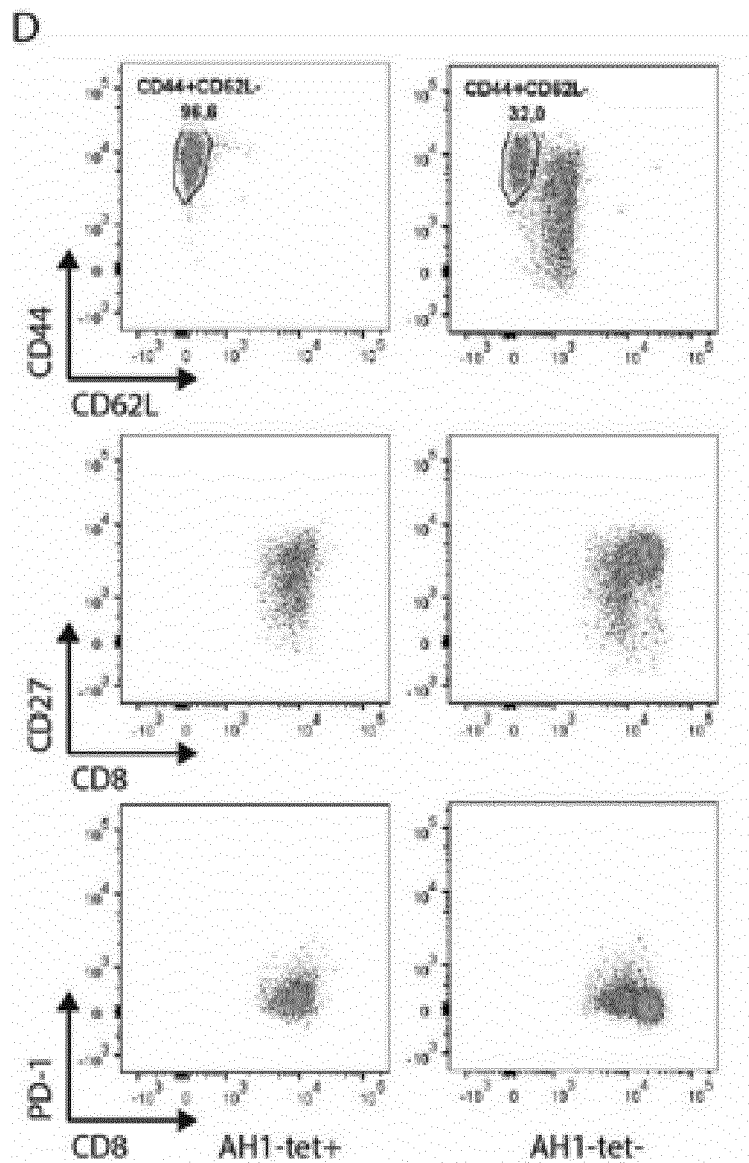
Фиг.1А



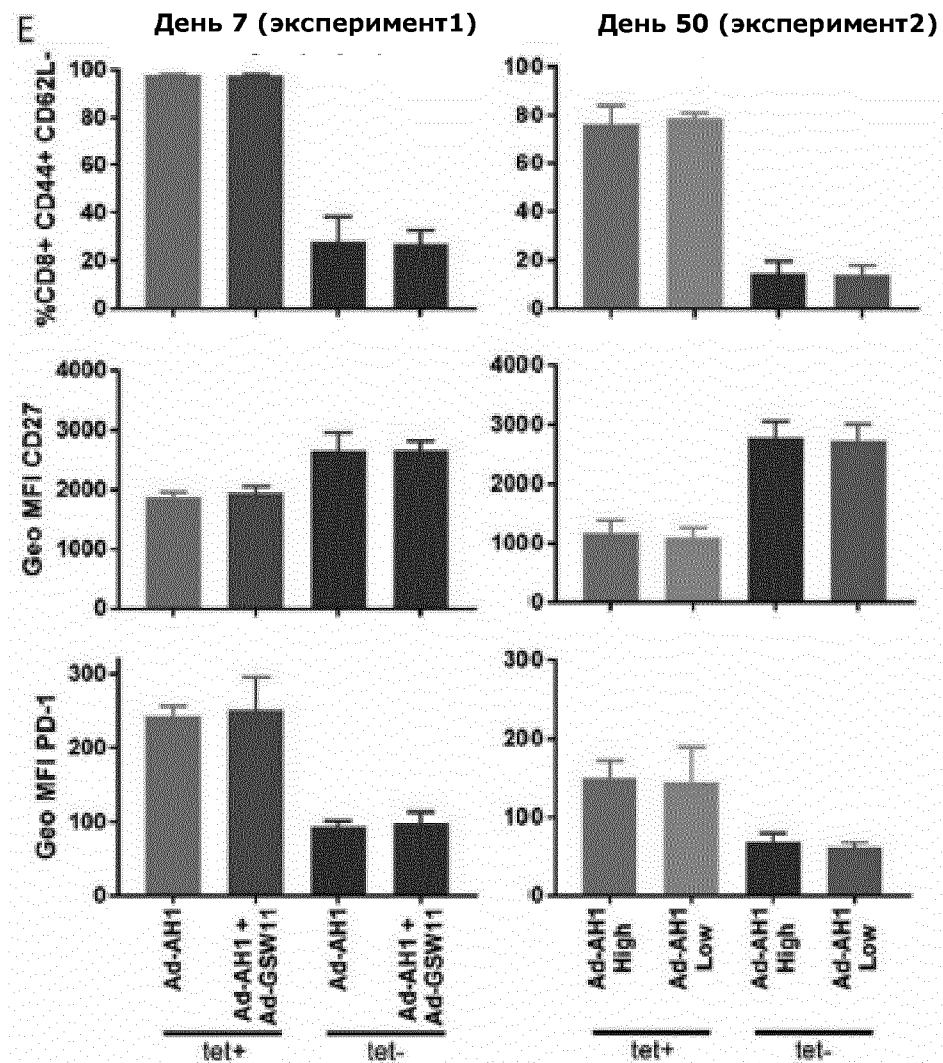
Фиг.1В



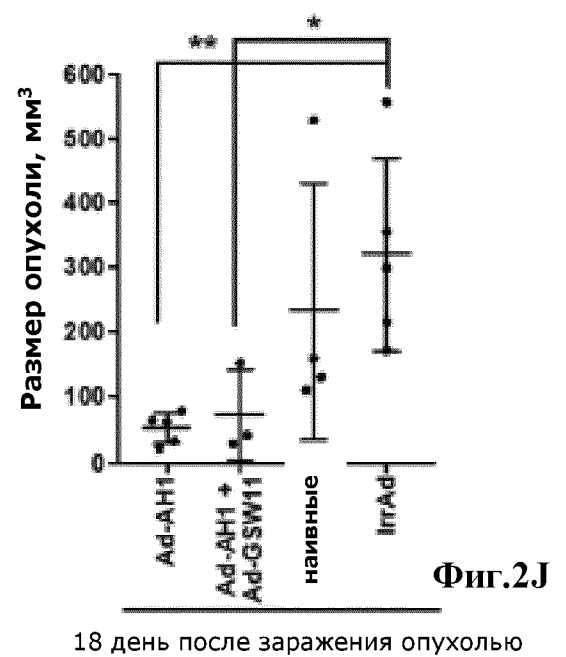
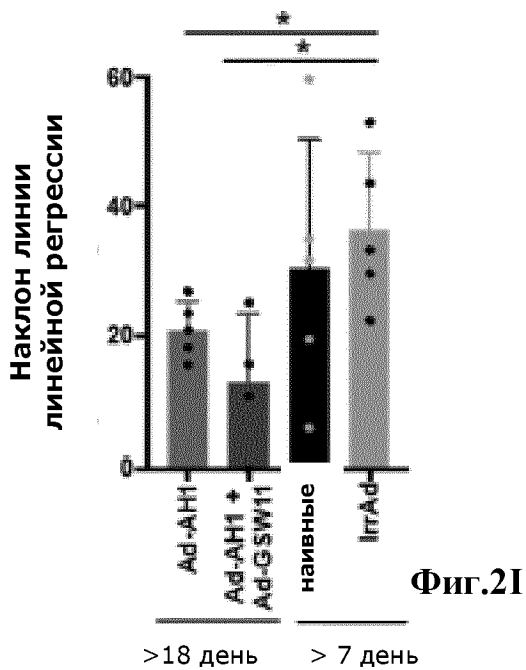
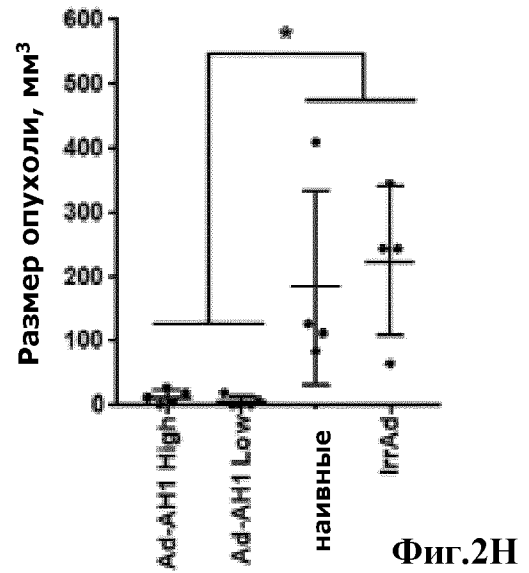
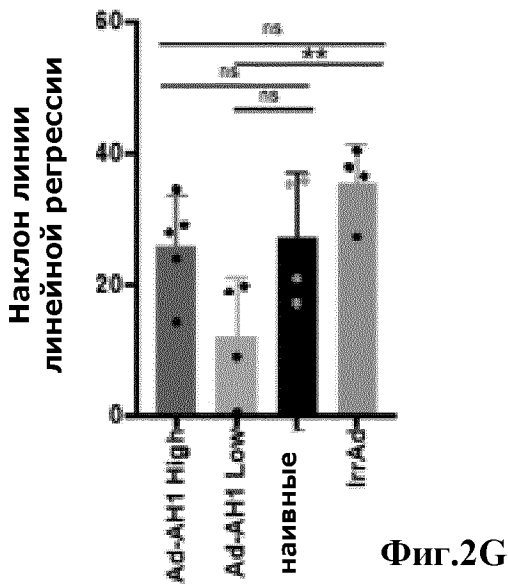
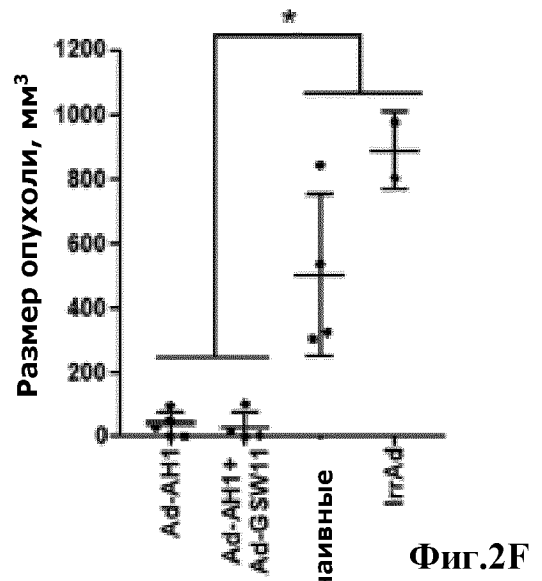
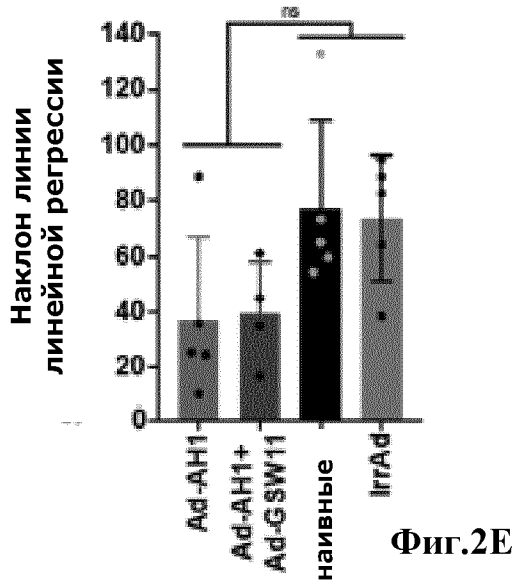
Фиг.1С

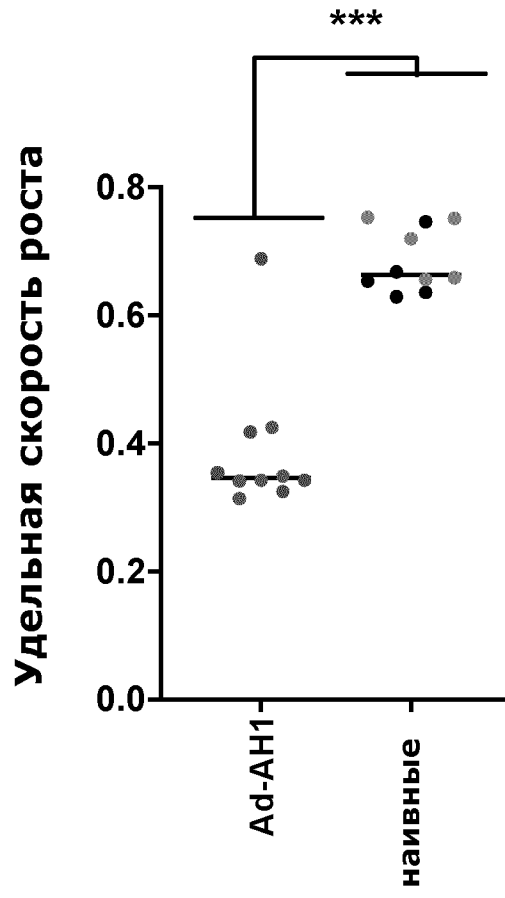


Фиг.1D

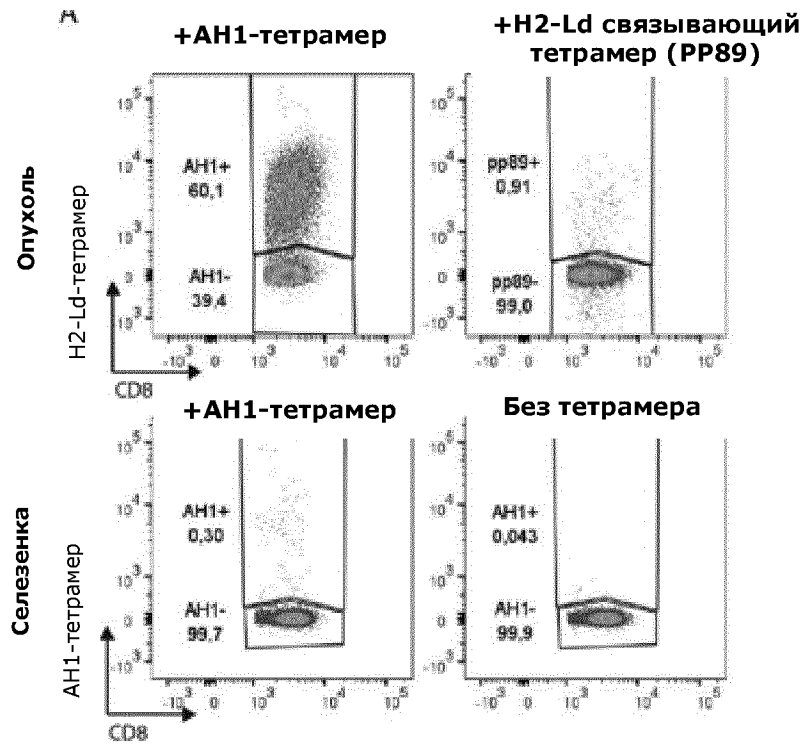


Фиг.1E

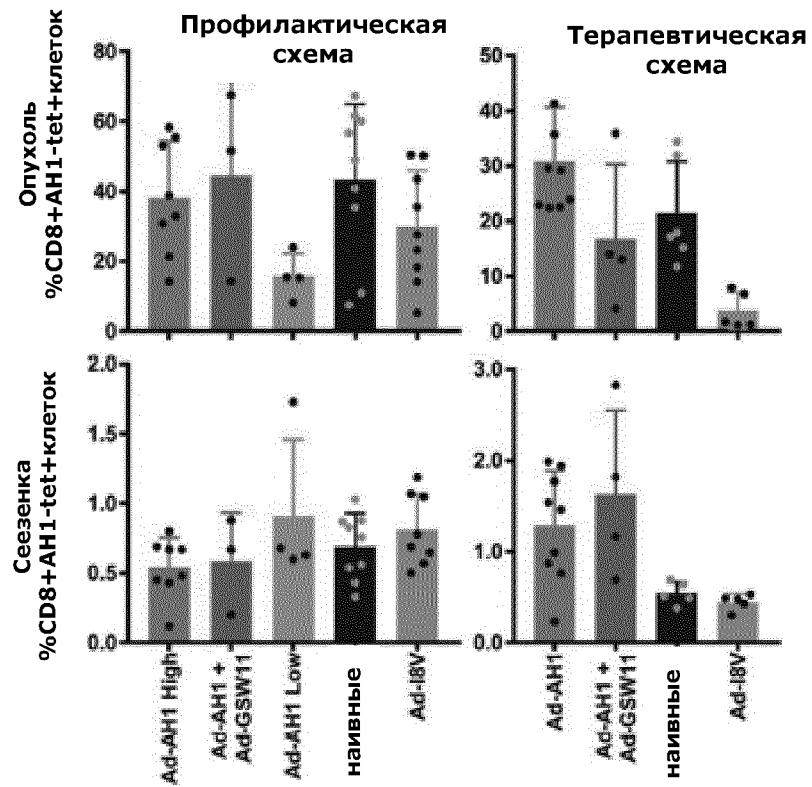




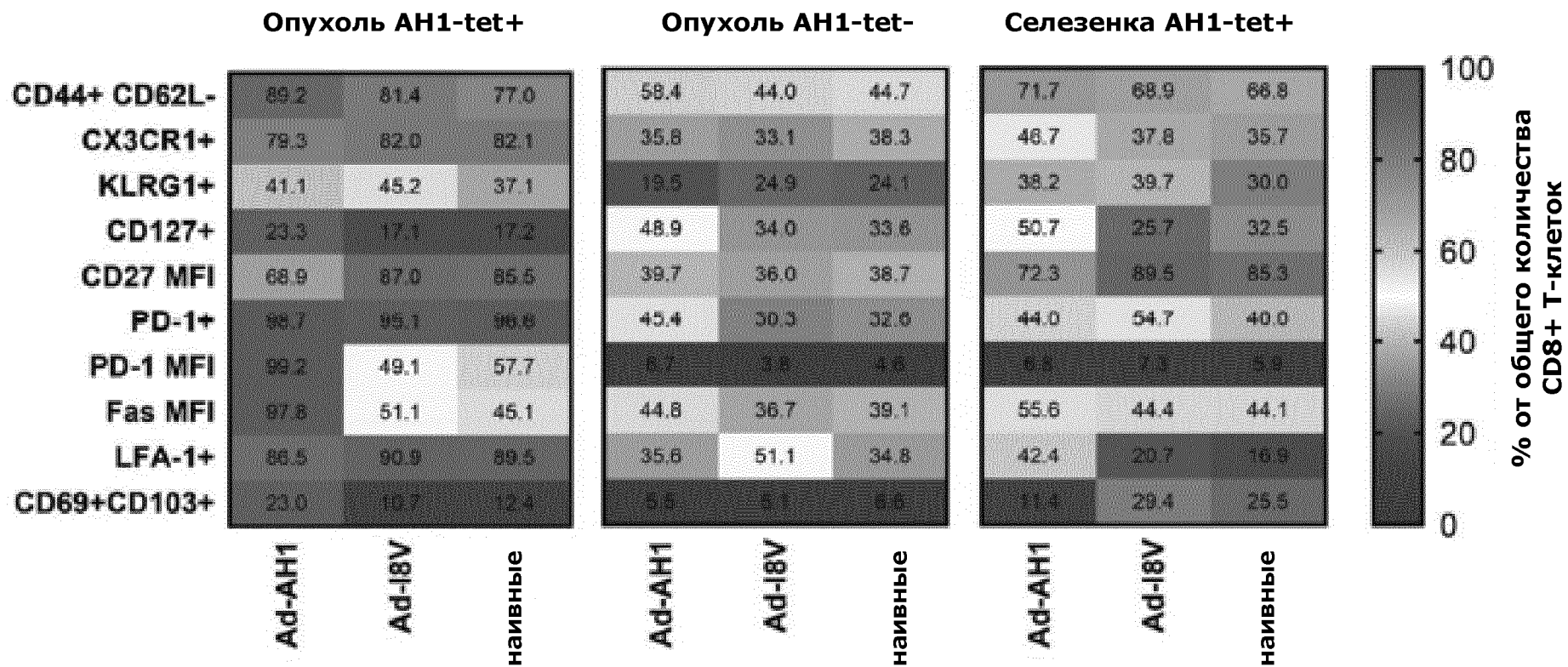
Фиг. 2К



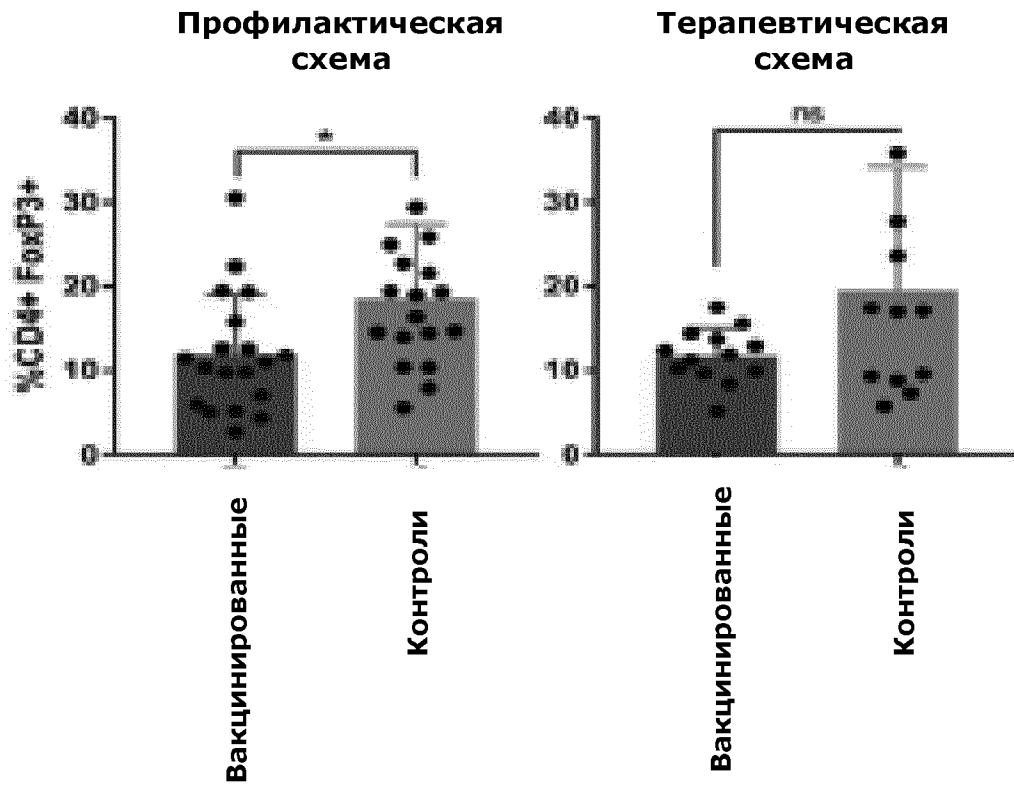
Фиг. 3А



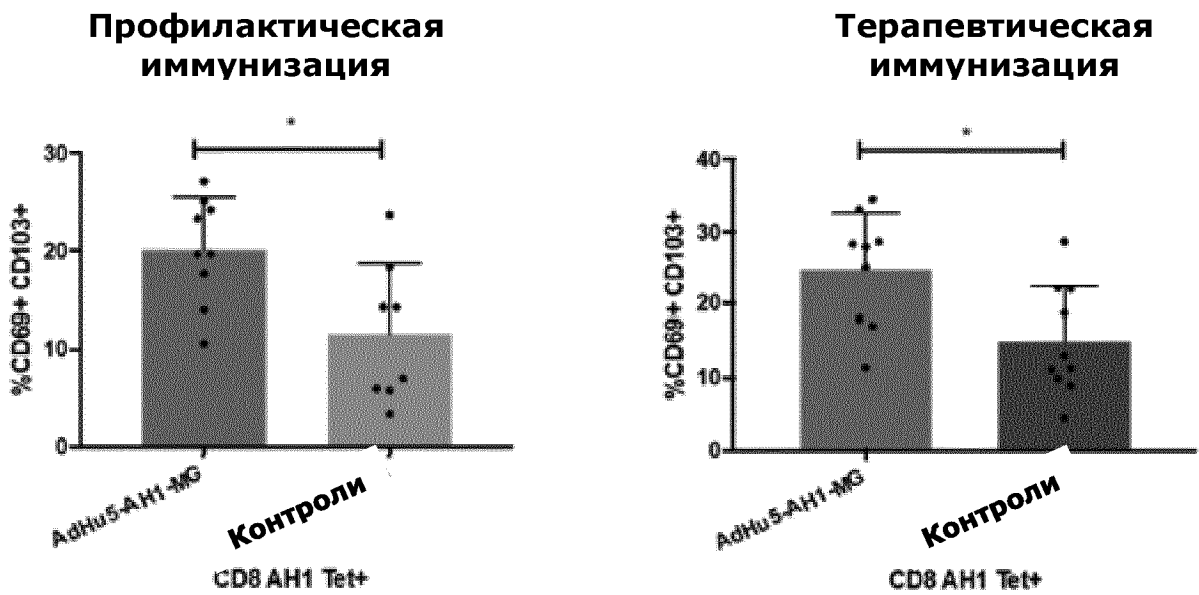
Фиг. 3В



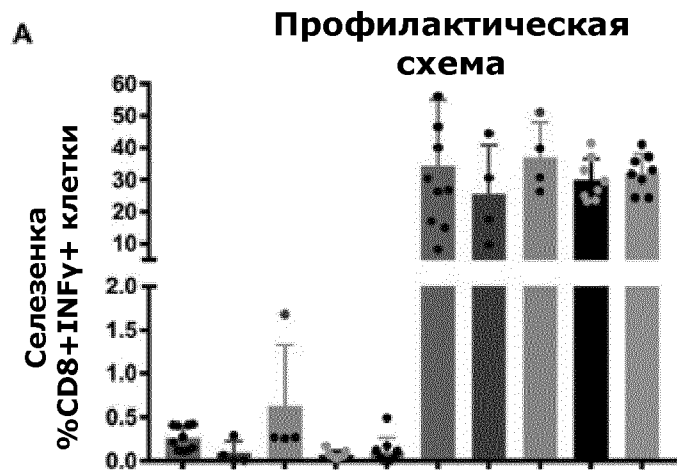
Фиг. 3С



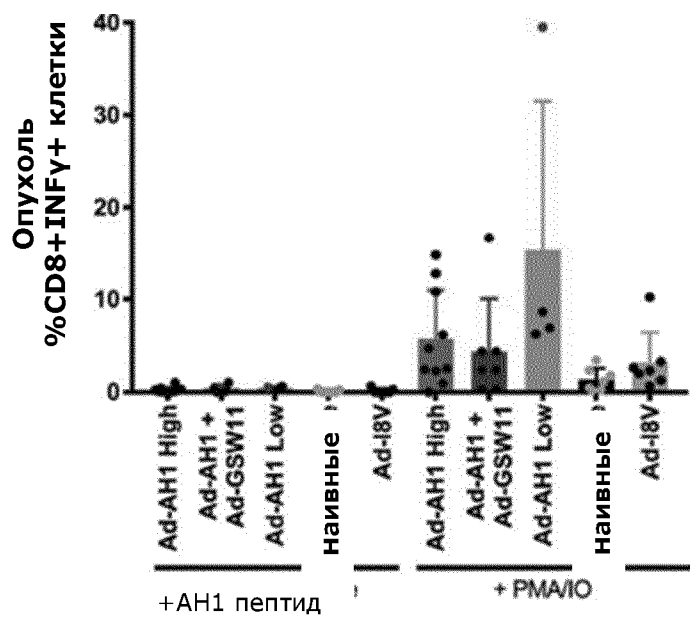
Фиг. 4А



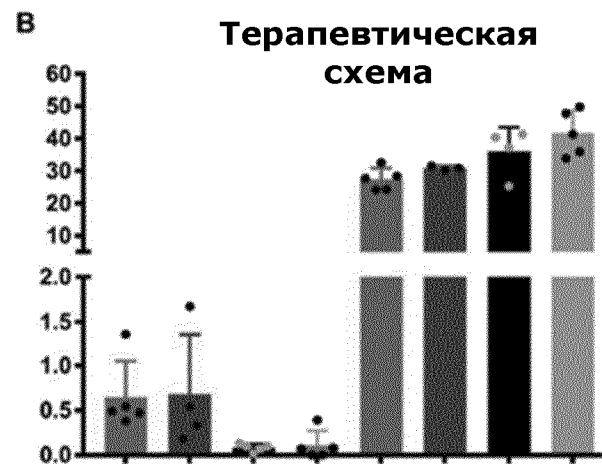
Фиг. 4В



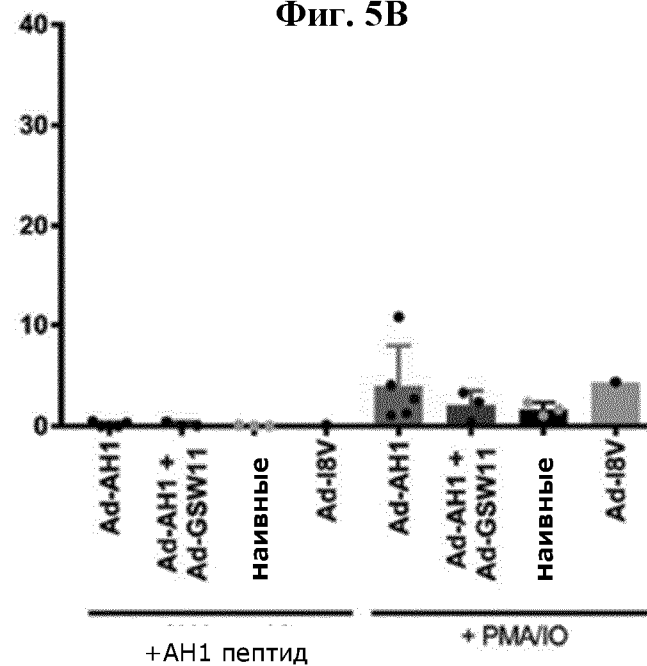
Фиг. 5А



Фиг. 5С



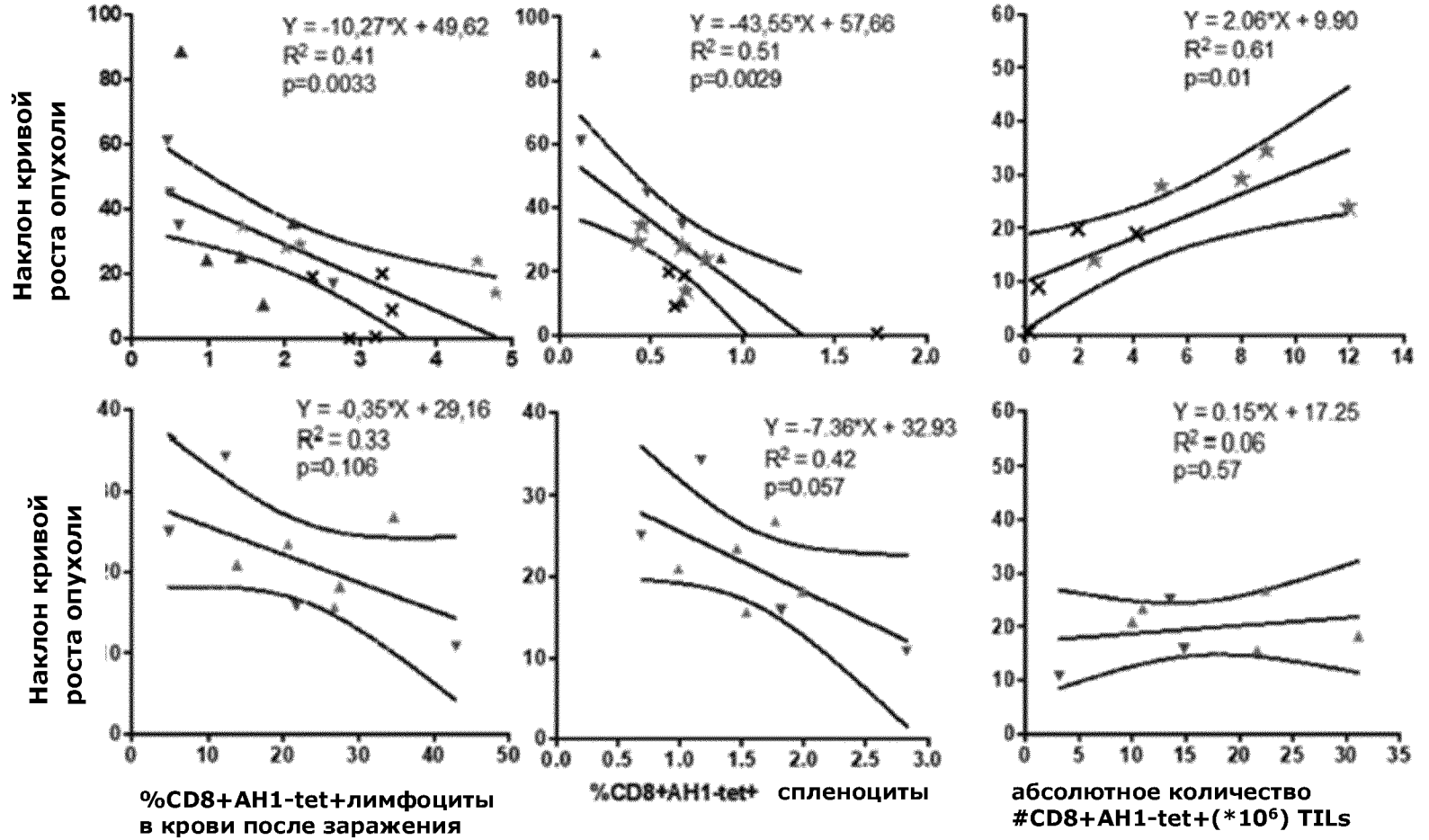
Фиг. 5В



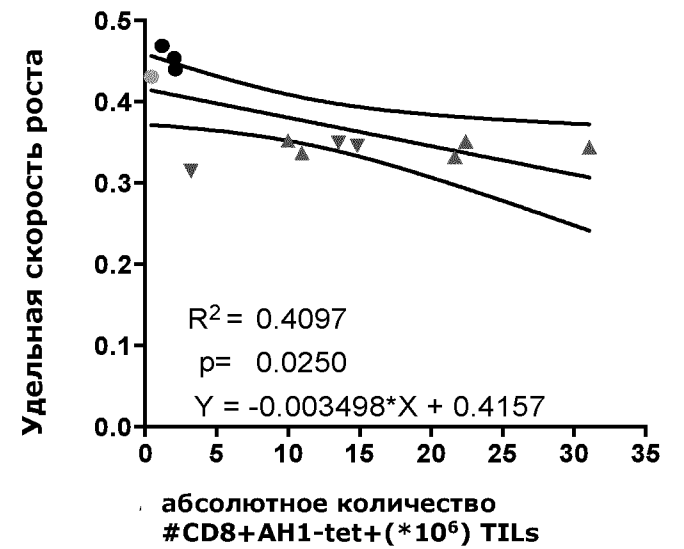
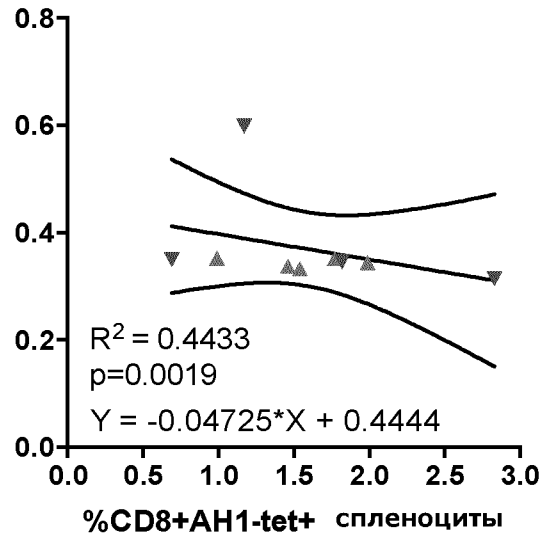
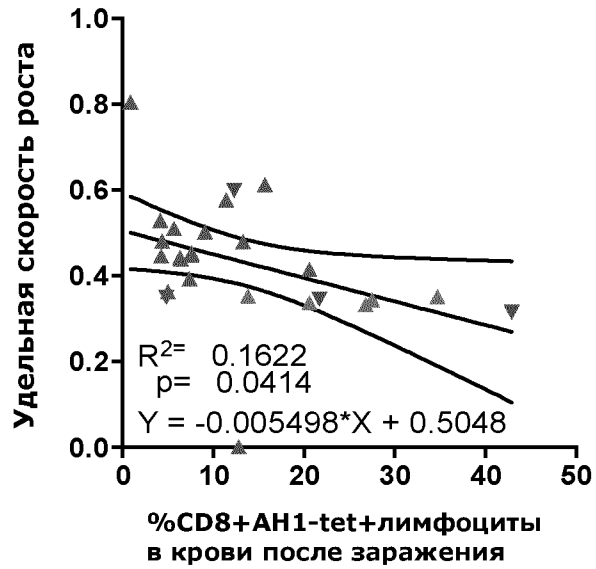
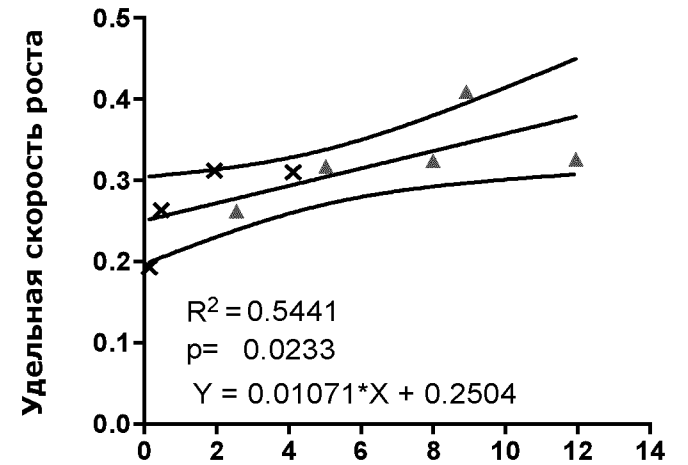
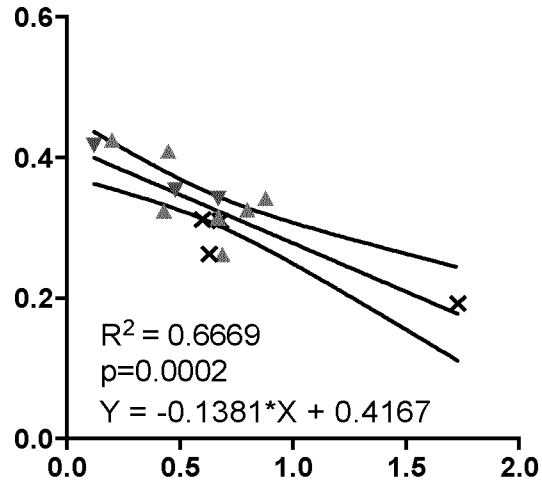
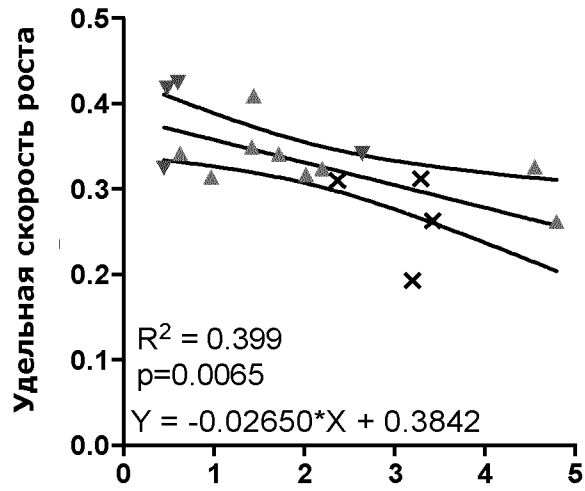
Фиг. 5D

Профилактическая схема

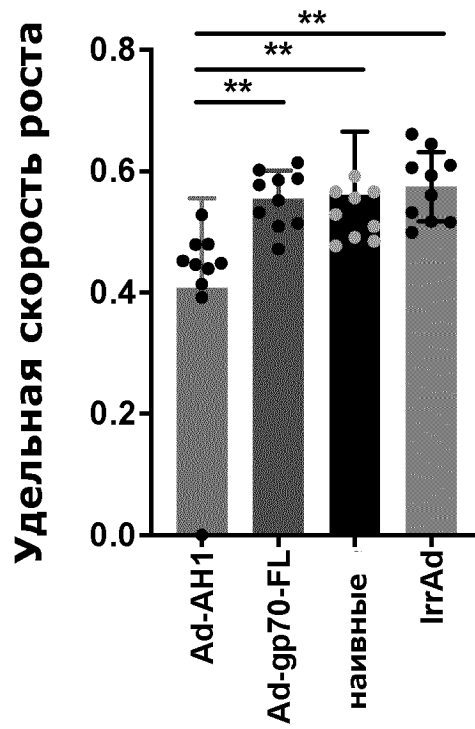
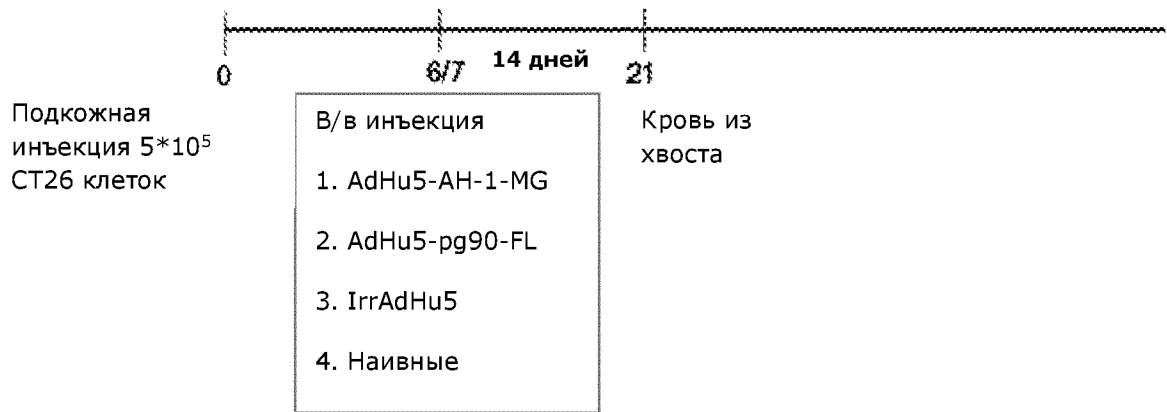
- ▲ Ad-AH1 (P1)
- ▼ Ad-AH1+ Ad-GSW11 (P1)
- ★ Ad-AH1 High (P2)
- × Ad-AH1-Low (P2)



Фиг.6А

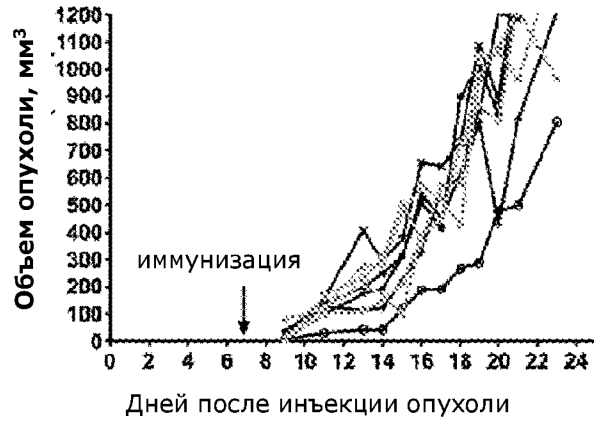


Фиг.6В



Фиг.7А

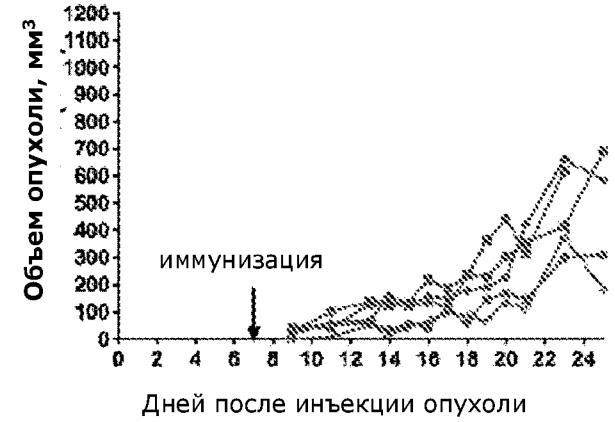
Рост опухоли в зависимости от времени: наивные и IrrAd



Рост опухоли в зависимости от времени: AdHu5-gp90-FL



Рост опухоли в зависимости от времени: наивные и AdHu5-AN1-MG



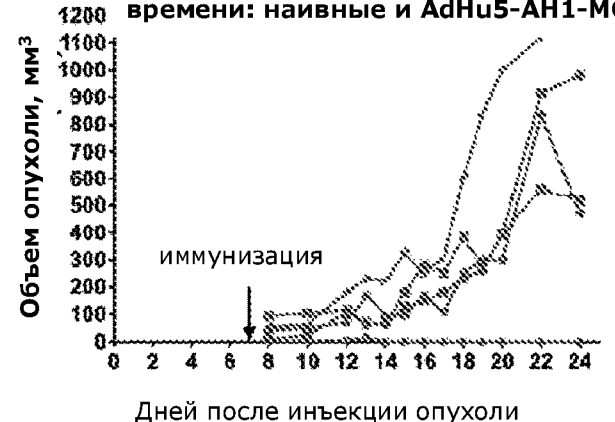
Рост опухоли в зависимости от времени: наивные и IrrAd



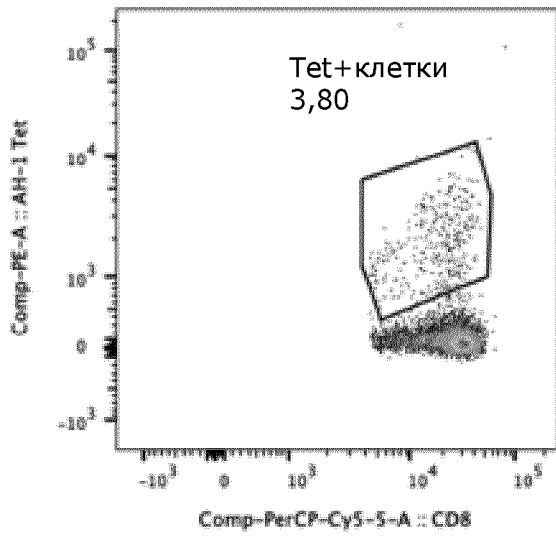
Рост опухоли в зависимости от времени: AdHu5-gp90-FL



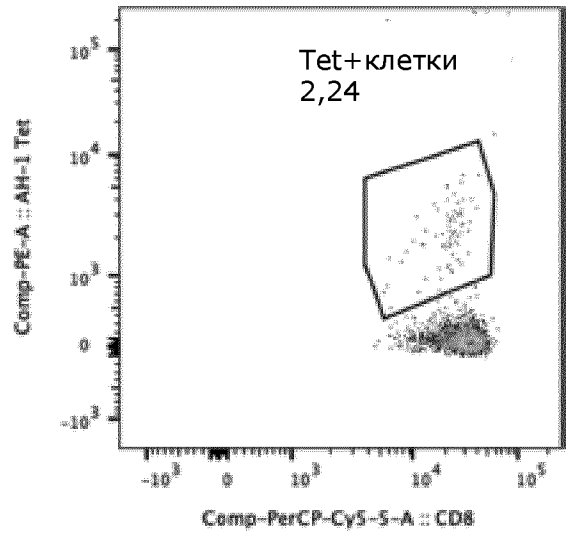
Рост опухоли в зависимости от времени: наивные и AdHu5-AN1-MG



Фиг.7А



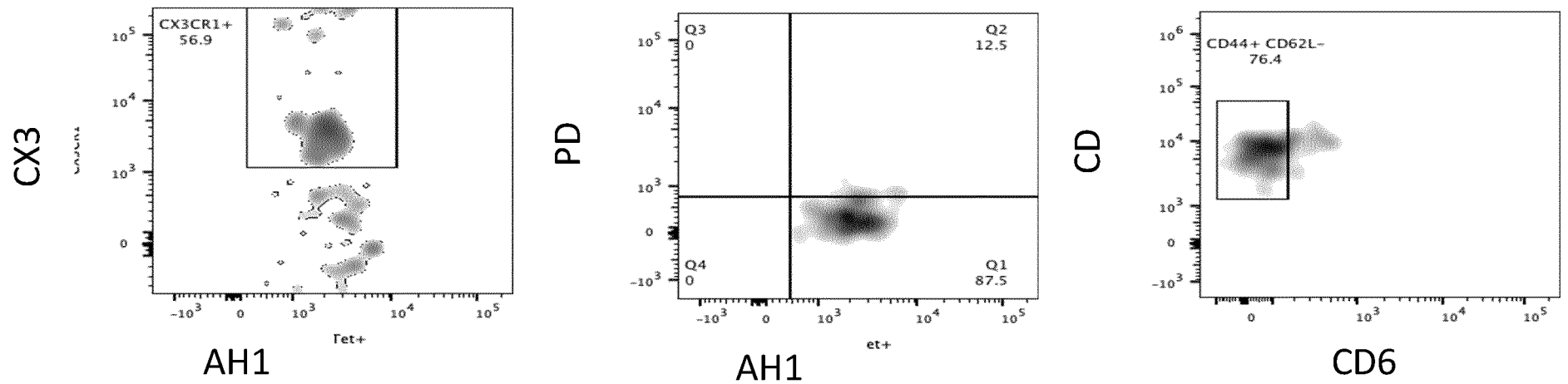
Долговременная защита 1L_1R.fsc
CD8+
8706



Долговременная защита 1R_1L.fsc
CD8+
3209

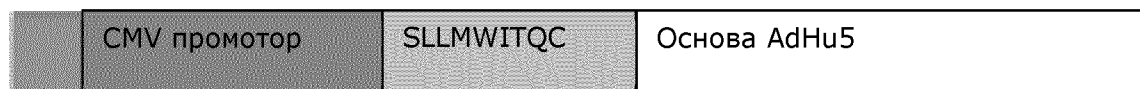
Фиг.7В

Фенотип антиген-специфических клеток у мышей с длительной защитой

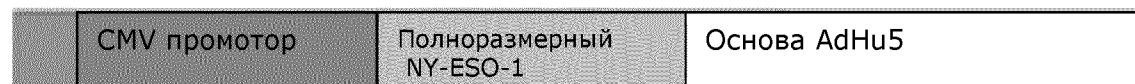


Фиг.7В

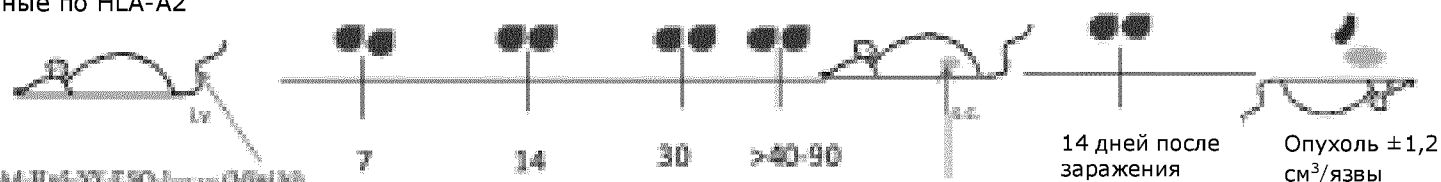
Минигенный вектор



Полноразмерный NY-ESO-1 вектор



ННД мыши,
трансгенные по HLA-A2



1. In 10⁹ ME AdHu5-NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (MSM 10)
2. In 10⁸ ME AdHu5-NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (MSM low)
3. In 10⁹ ME AdHu5-NY-ESO-1 FL (Full length)
4. In 10⁹ ME AdHu5-I8V (I8V)
5. Naive control

1. 1*10⁹ ME AdHu5-NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅
2. 1*10⁸ ME AdHu5-NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (low)
3. 1*10⁹ ME AdHu5-NY-ESO-1 FL (полноразмерный)
4. 1*10⁹ ME AdHu5-I8V (I8V)
5. Наивные контроли

Определяли NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅

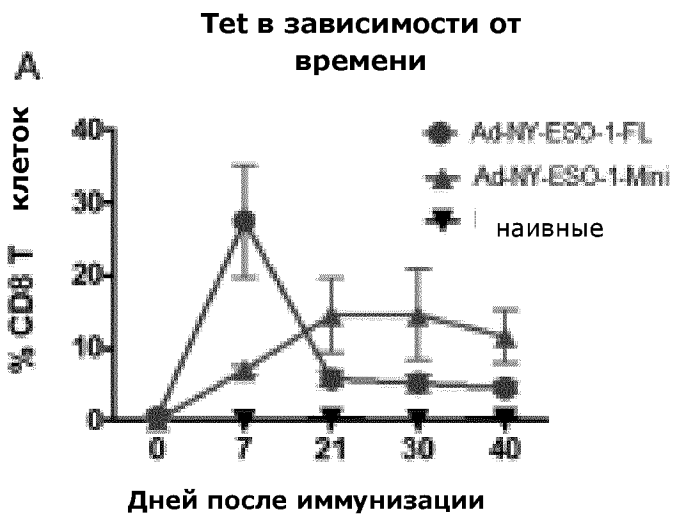
специфичные Т-клетки с использованием окрашивания тетрамерами.

Определяли фенотип клеток – являются ли они PD-1, CX3CR1+, эффекторными клетками памяти

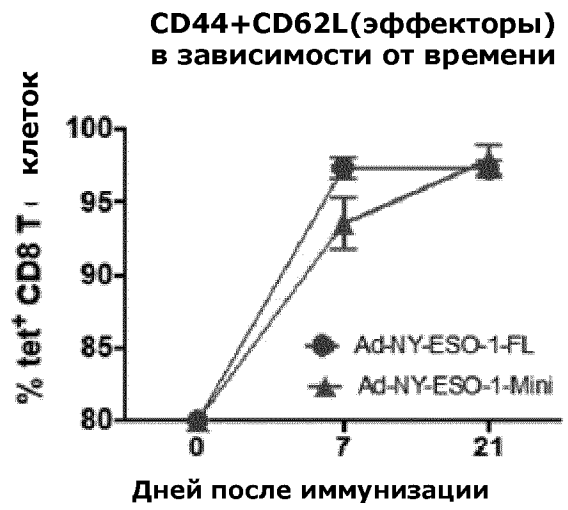
0,5-1*10⁶
HDD-NY-ESO-1
клеток саркомы
подкожно

Опухоли измеряли каждые 2 дня с использованием цифрового циркуля

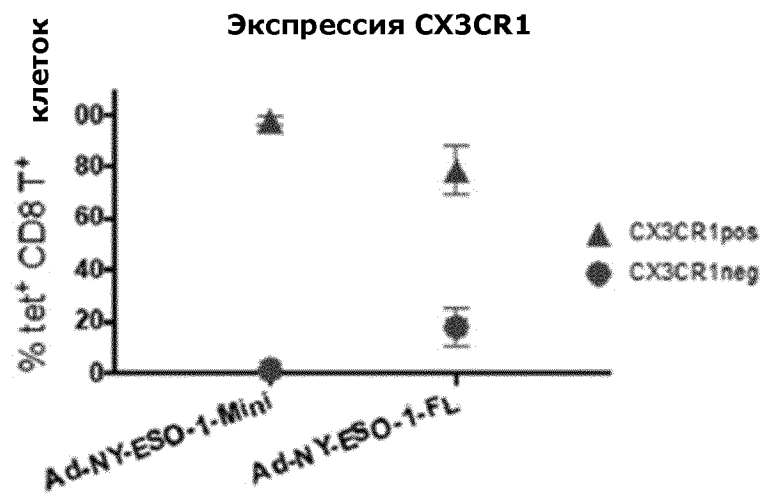
Фиг.8



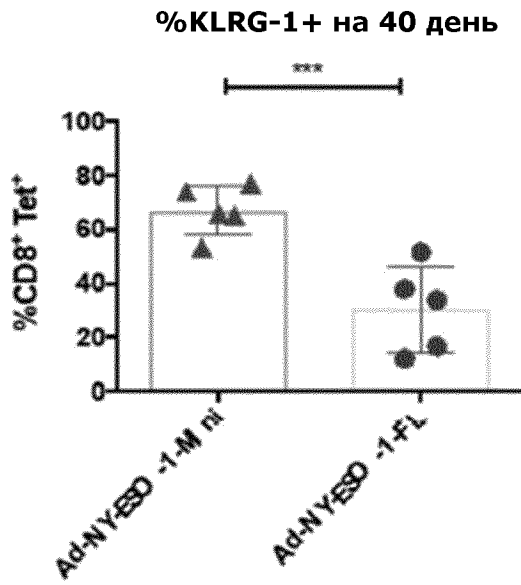
Фиг.8А



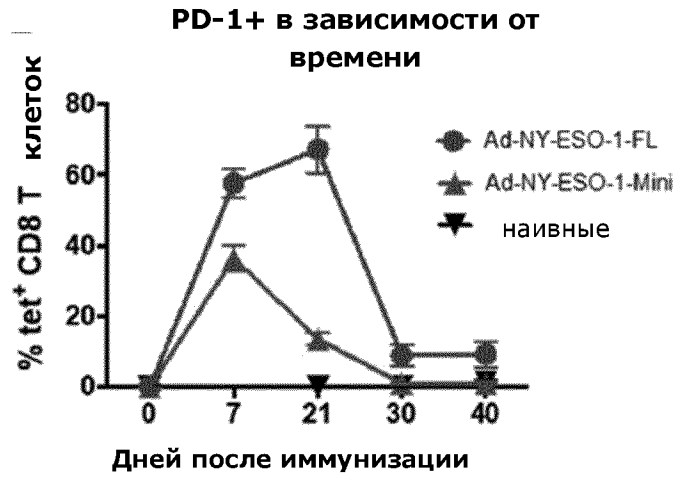
Фиг.8В



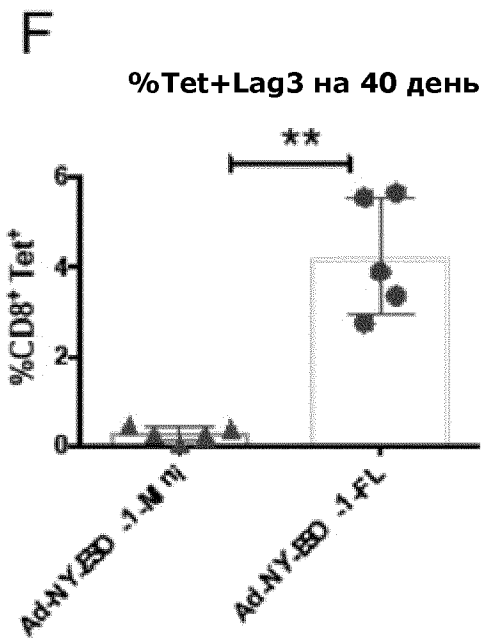
Фиг.8С



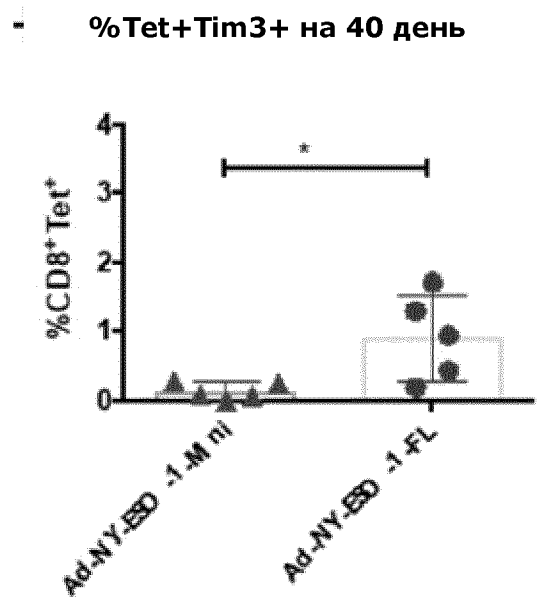
Фиг.8D



Фиг.8E



Фиг.8F

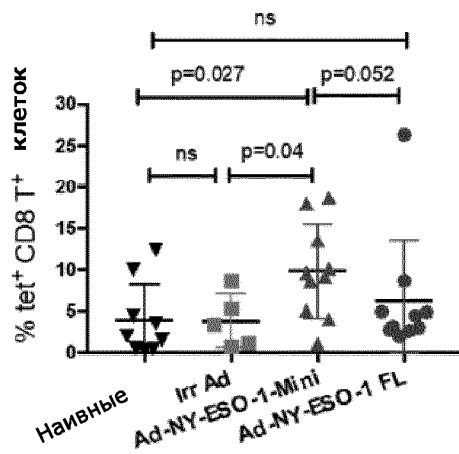


Фиг.8G



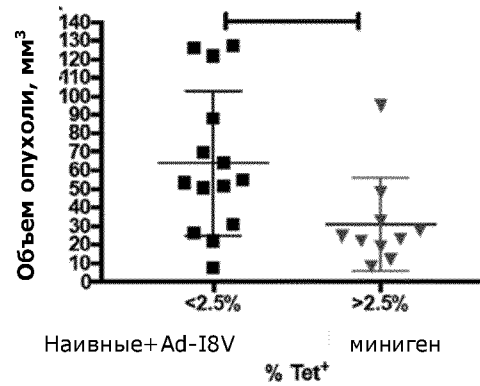
Фиг. 9А

**% Tet в крови на 14 день
после заражения опухолью**



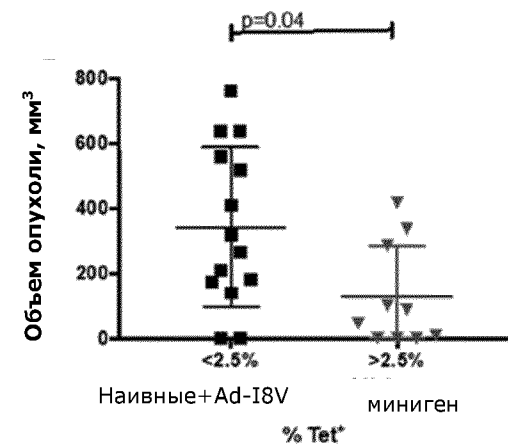
Фиг.9В

Размер опухоли на 14 день

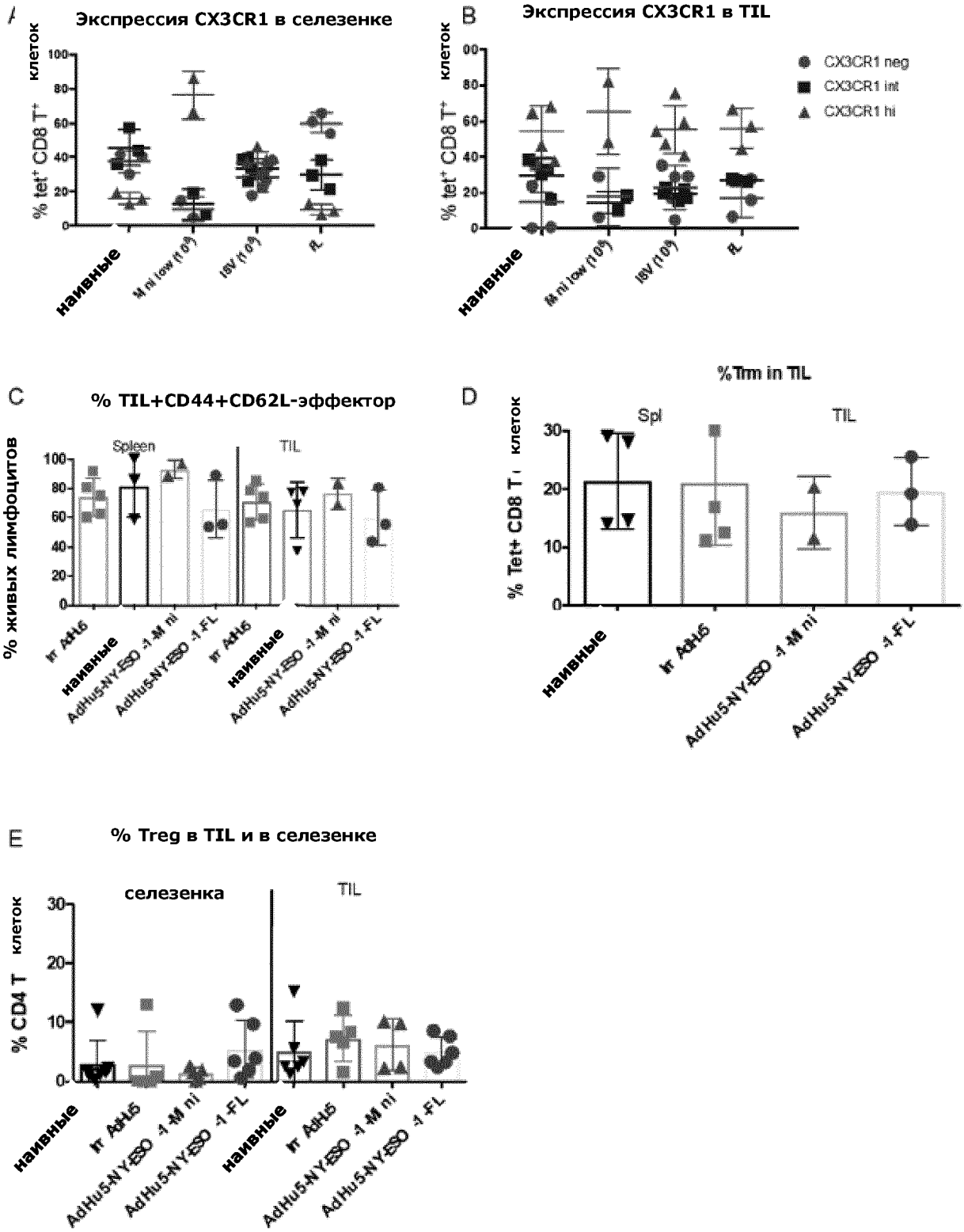


Фиг.9С

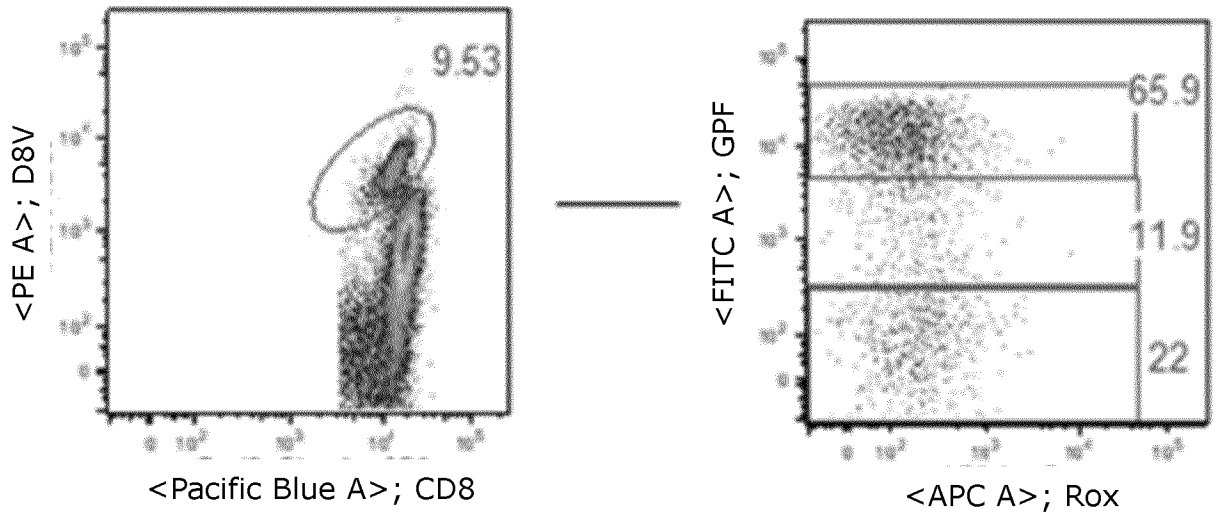
Размер опухоли на 27 день



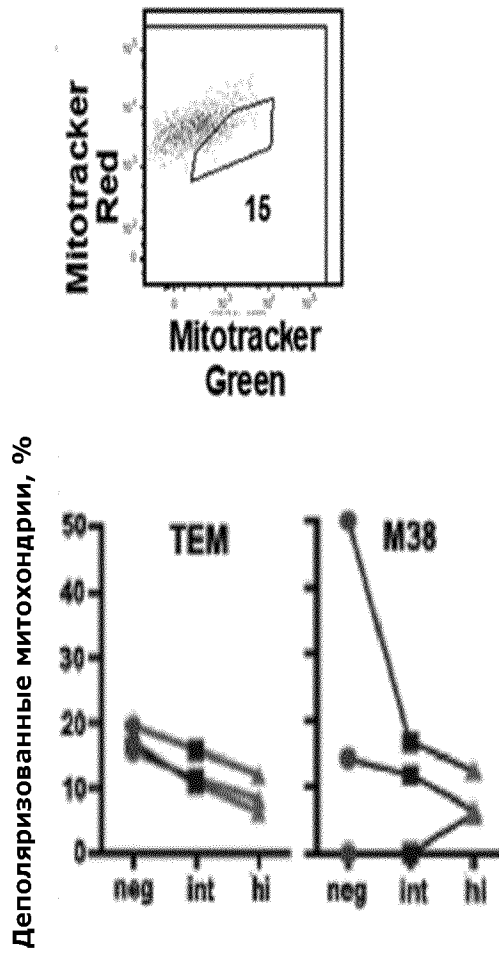
Фиг.9Д



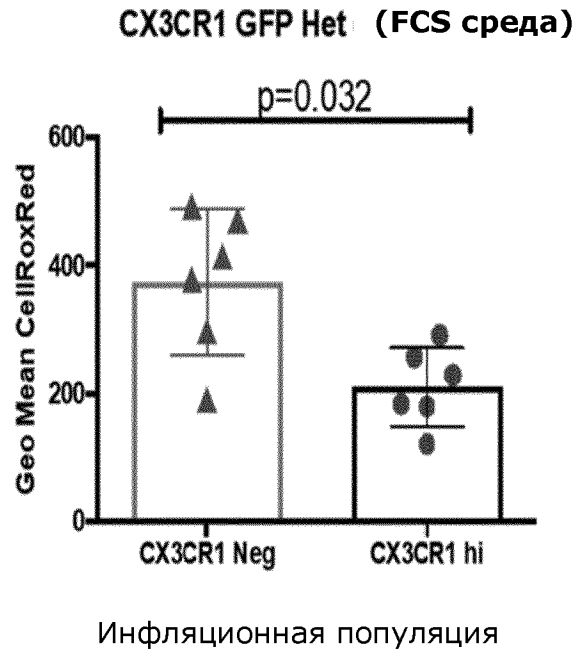
Фиг.11



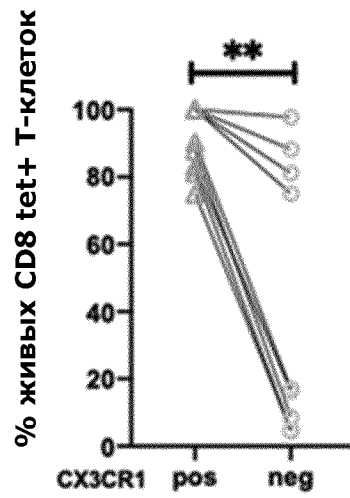
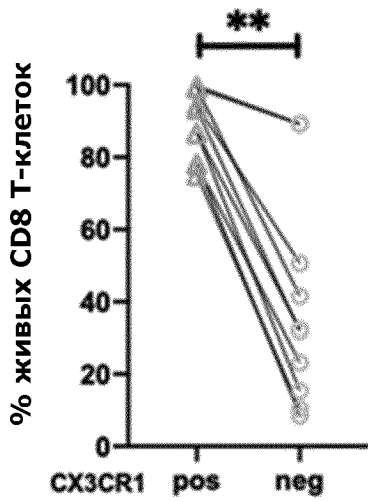
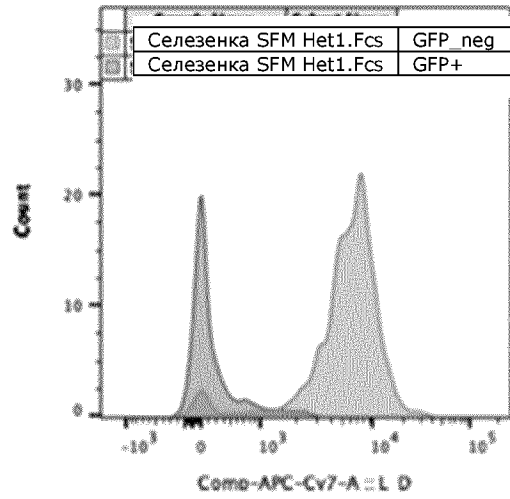
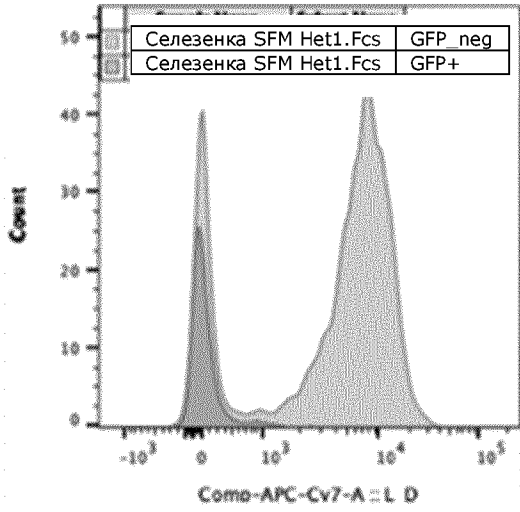
Фиг.12А



Фиг.12В

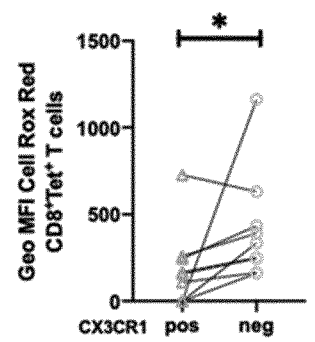
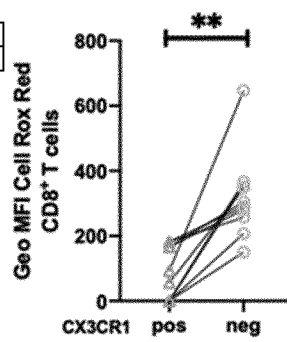
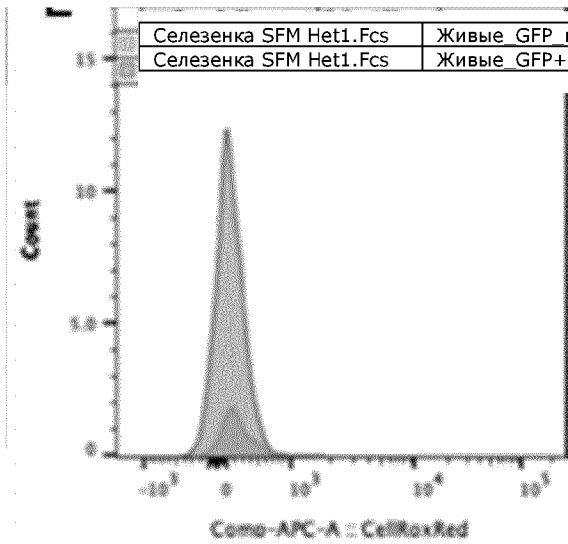


Фиг.12С



Фиг.12D

Фиг.12E



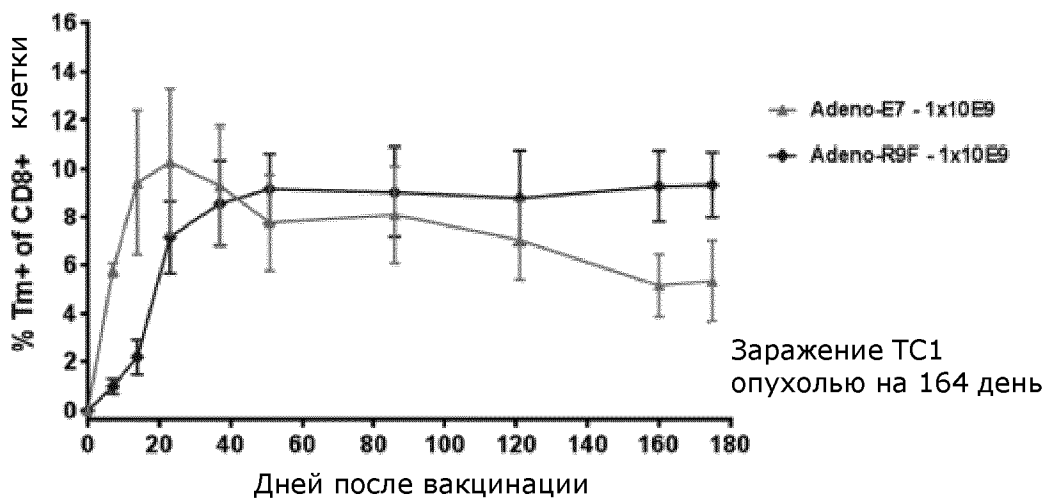
m

Бессывороточная среда

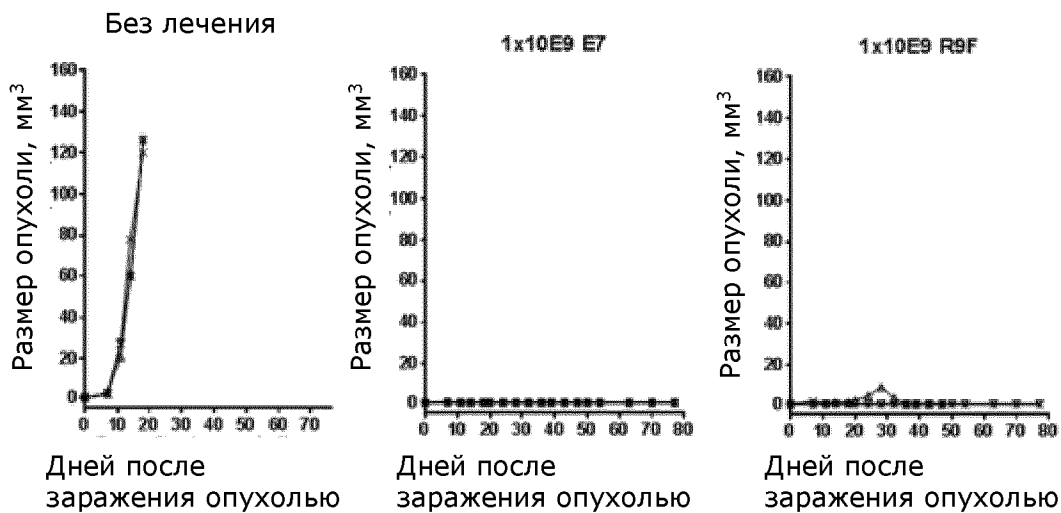
Фиг.12F



Адено-HPV ответы

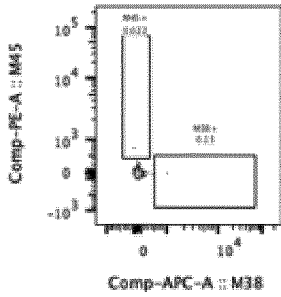


- Большая, долгоживущая популяция эпитоп-специфических клеток
- Заражение TC1-HPV E6/E7 (модель карциномы) подкожно >180 дней после иммунизации

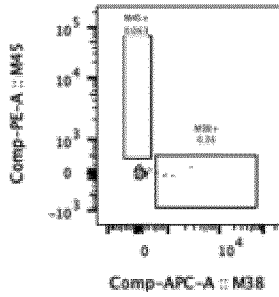


Фиг.13

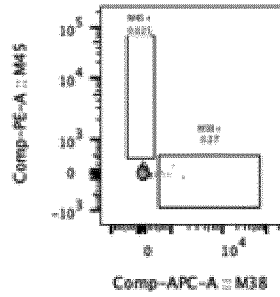
Одиночный миниген против M38 (субоптимальная доза, около 10⁷ ME)



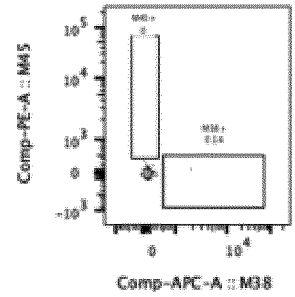
AdHu5 M38 миниген_1.fcs
CD8+
4545



AdHu5 M38 миниген_2.fcs
CD8+
4744

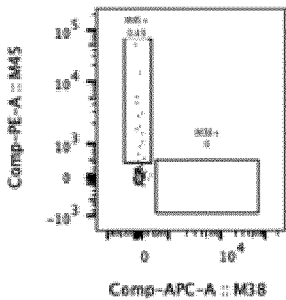


AdHu5 M38 миниген_3.fcs
CD8+
8053

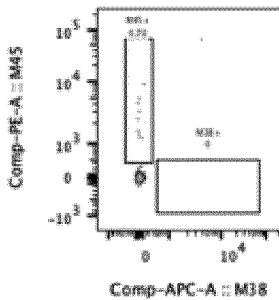


AdHu5 M38 миниген_4.fcs
CD8+
3490

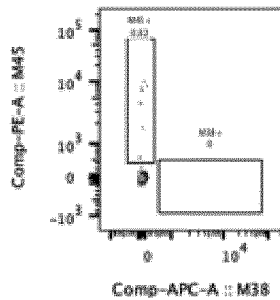
Одиночный миниген против M45 (оптимальная доза, 10⁸ ME)



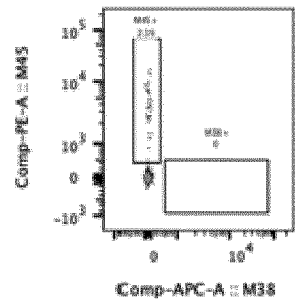
AdHu5 M45 миниген_1.fcs
CD8+
10510



AdHu5 M45 миниген_2.fcs
CD8+
3576

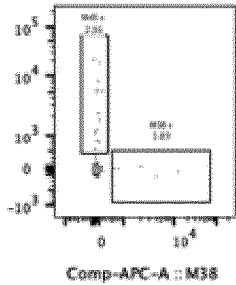


AdHu5 M45 миниген_3.fcs
CD8+
4761

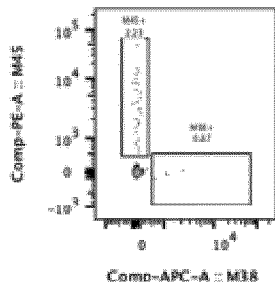


AdHu5 M45 миниген_4.fcs
CD8+
5992

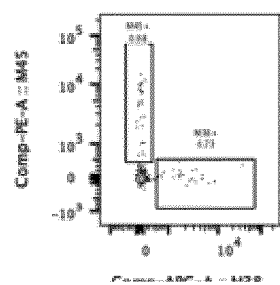
Комбинация минигенов M38 (субоптимальная доза), M45 (оптимальная доза), M139(субоптимальная доза)



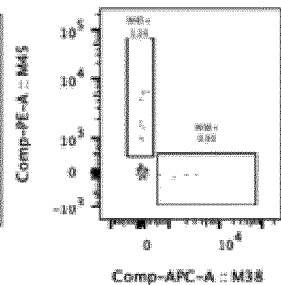
AdHu5 M38+M45 миниген_1.fcs
CD8+
1272



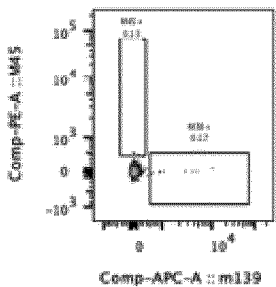
AdHu5 M38+M45 миниген_2.fcs
CD8+
3003



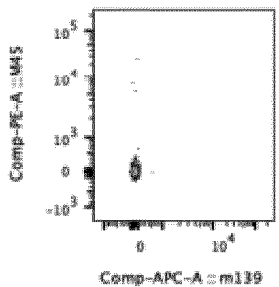
AdHu5 M38+M45 миниген_3.fcs
CD8+
9846



AdHu5 M38+M45 миниген_4.fcs
CD8+
1556



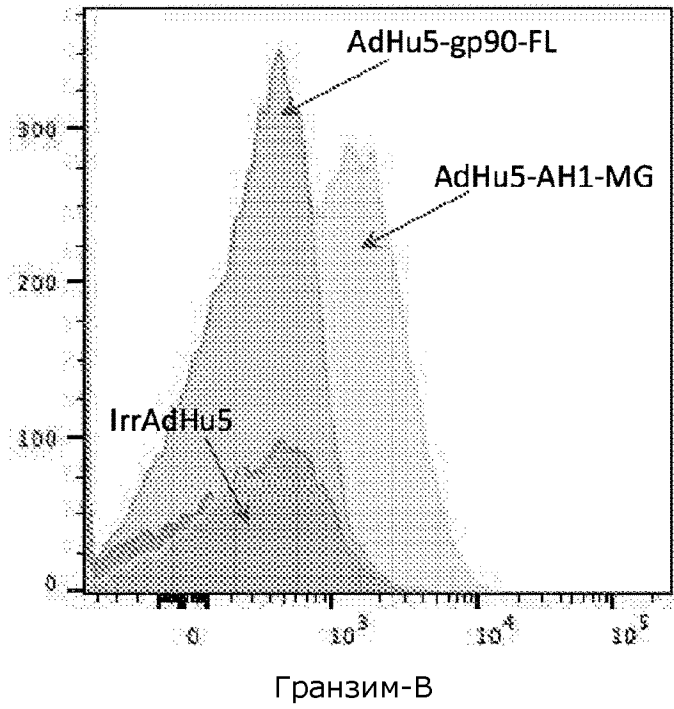
Наивные_M38.fcs
CD8+
14343



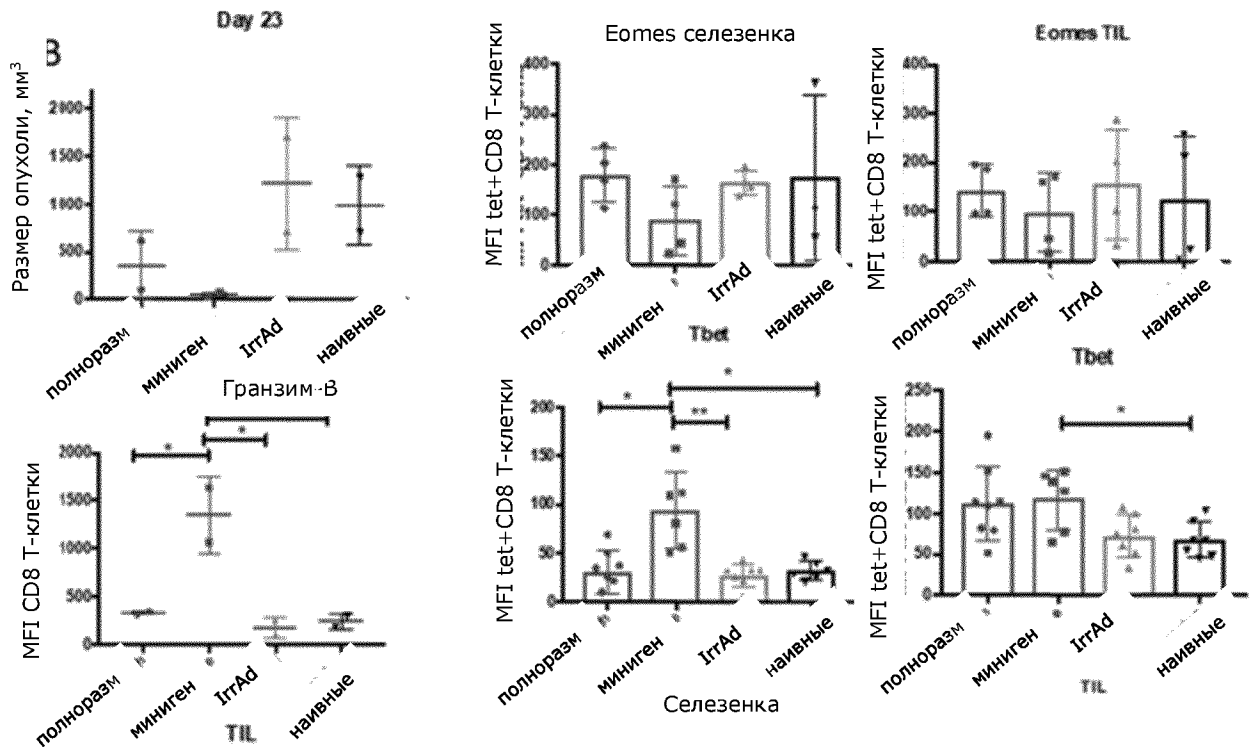
Наивные_M45.fcs
CD8+
6436

6 день после иммунизации

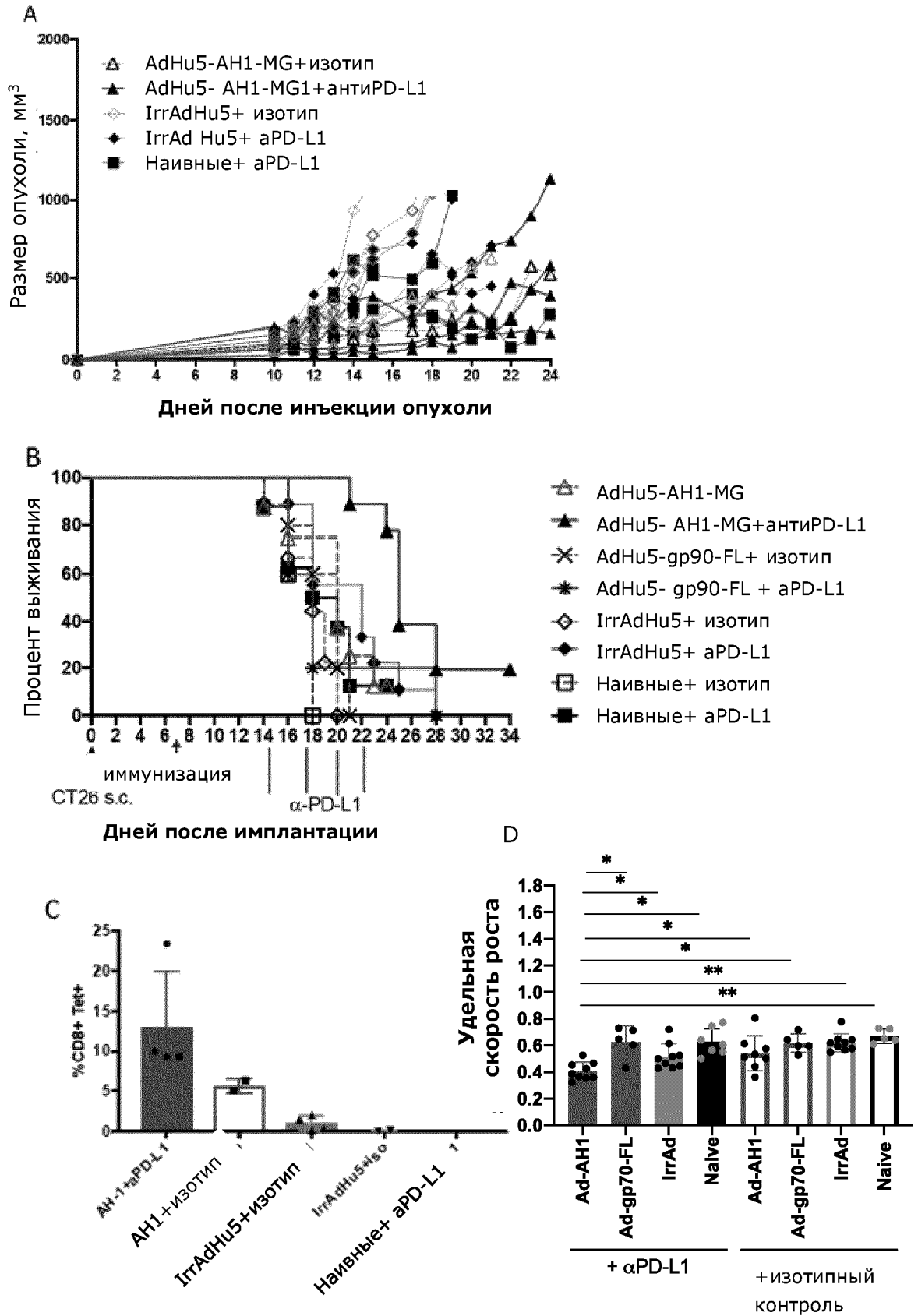
Фиг.14



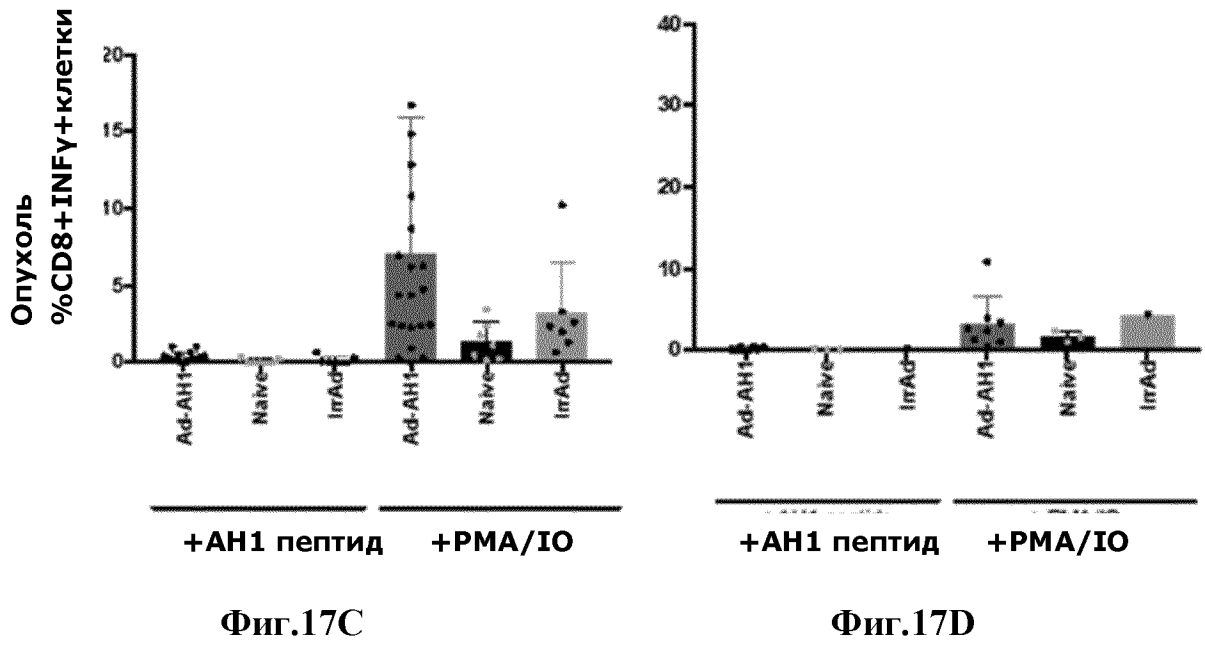
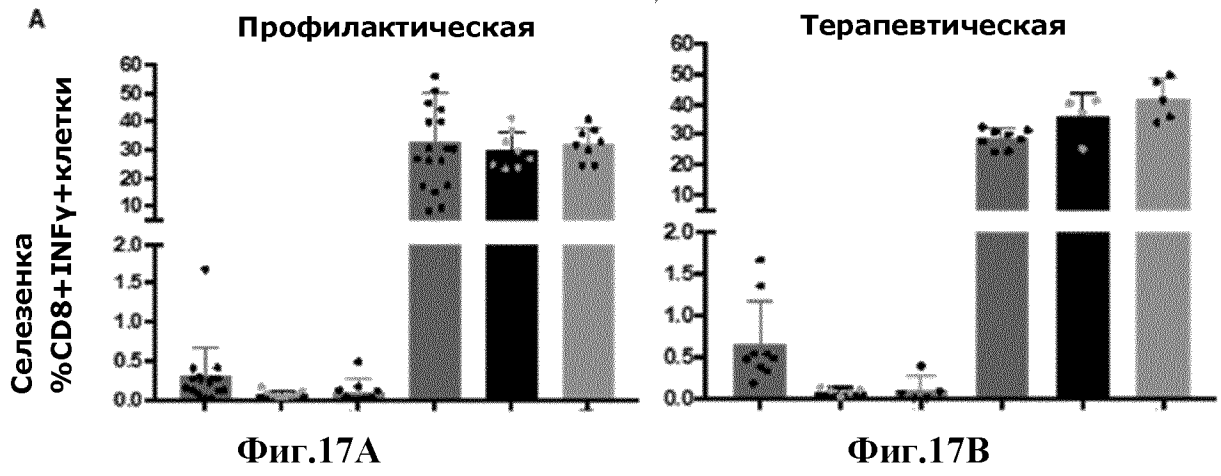
Фиг.15А



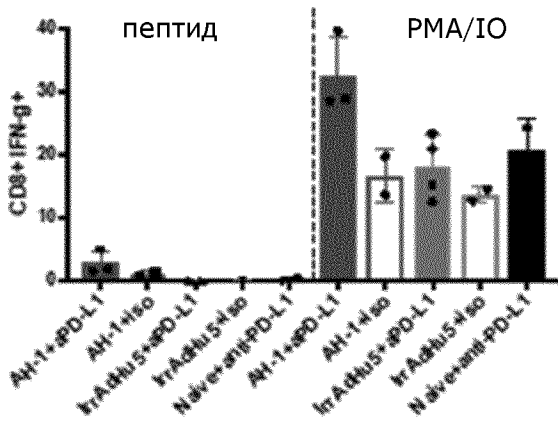
Фиг.15В



Фиг.16

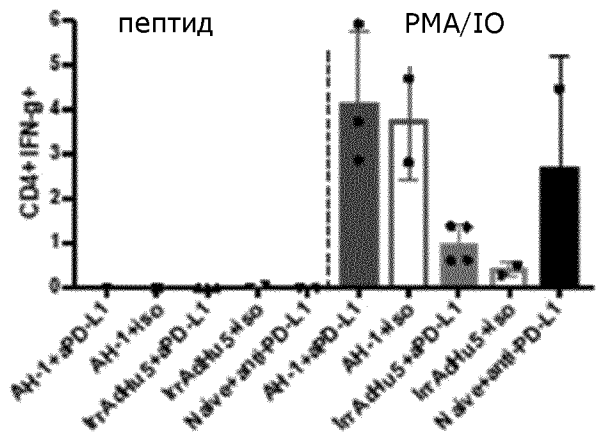


Селезенка CD8 INF-g



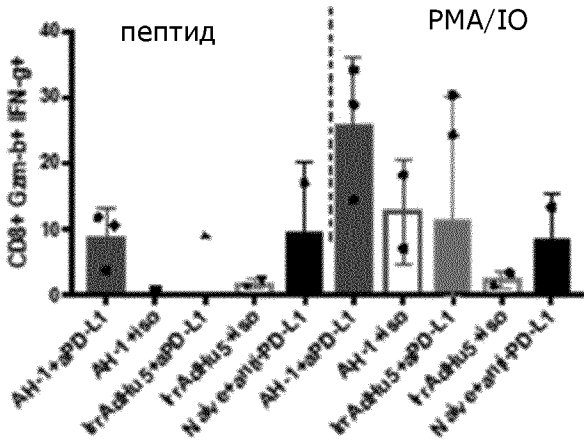
Фиг.17Е

Селезенка CD4 INF-g



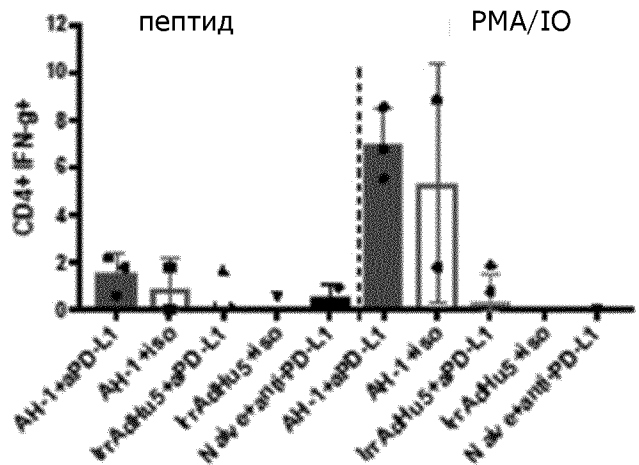
Фиг.17F

Опухоль CD8 INF-g



Фиг.17G

Опухоль CD4 INF-g

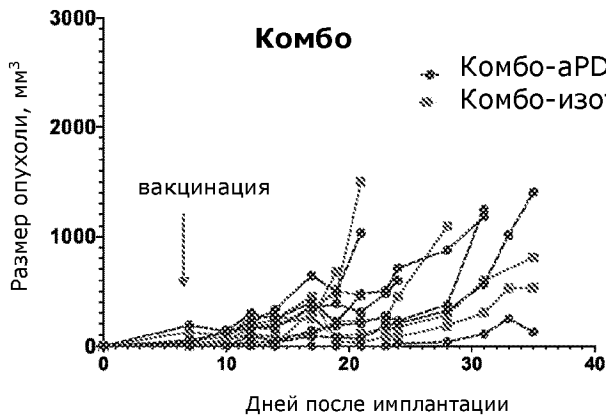


Фиг.17H

0 7 12 13 16 19 20

Имплантация опухоли →
 Вакцинация*
 aPD-1 или изотипный контроль 0,3 мг/мышь каждые 3-4 дня (кровь)

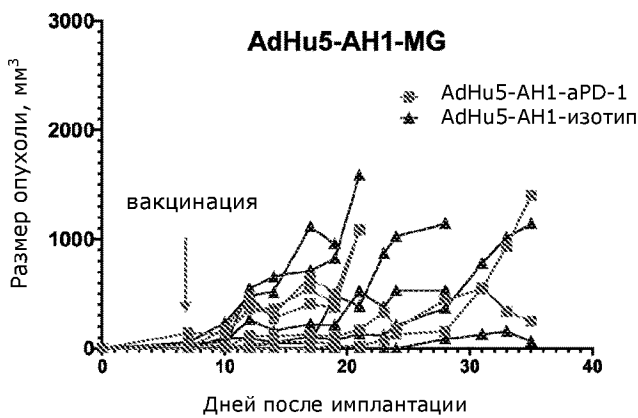
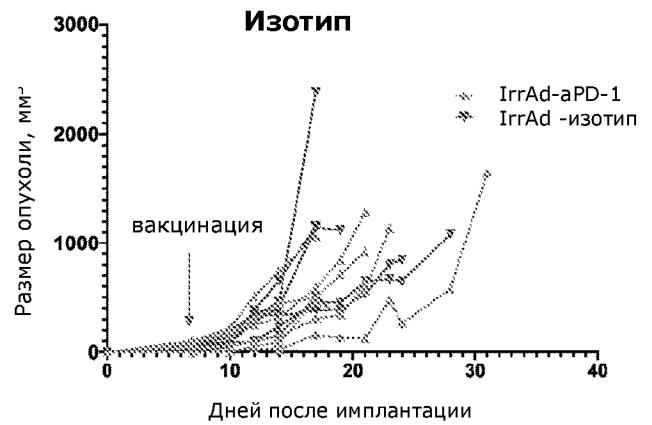
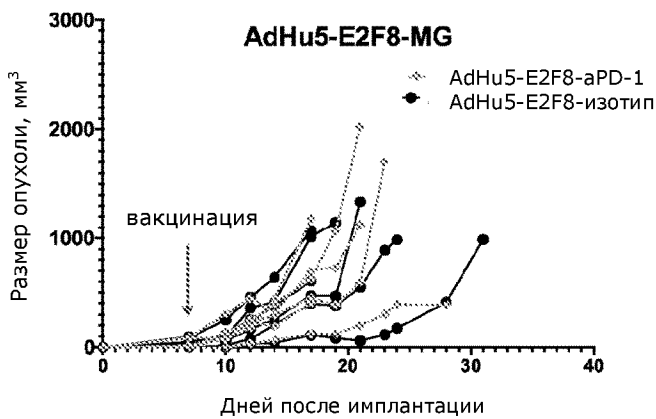
Фиг.18А



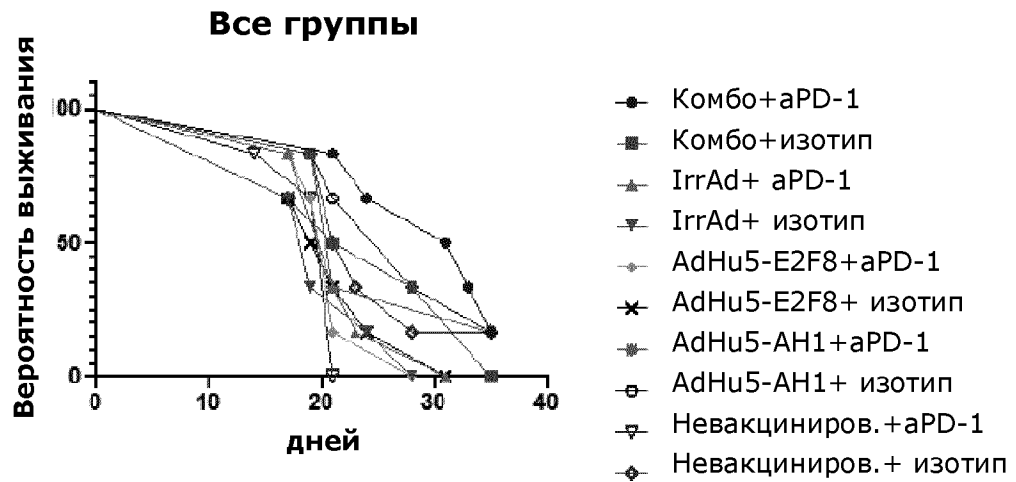
*Вакцины:

1. AdHu5-AH1-миниген (MG)
2. AdHu5-E2F8-27-мер MG
3. Комбо(AdHu5-AH1-MG и AdHu5-E2F8-27-мер MG)
4. Нерелевантный AdHu5-MG
5. Невакцинированные

N=6 на группу лечения

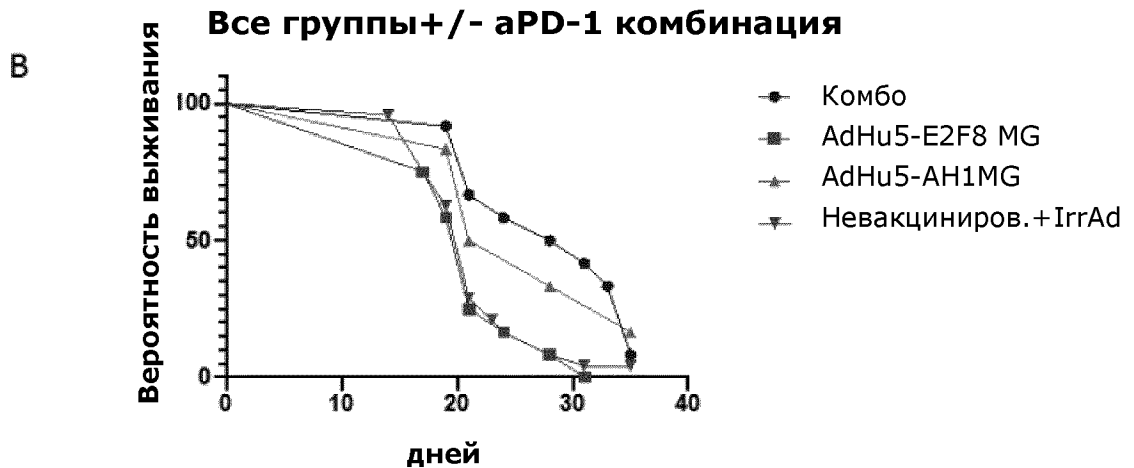


Фиг.18В



	Средняя выживаемость
Комбо+aPD-1	32
Комбо+изотип	24,5
IrrAd+ aPD-1	21
IrrAd+ изотип	19
AdHu5-E2F8+aPD-1	21
AdHu5-E2F8+ изотип	20
AdHu5-AH1+aPD-1	21
AdHu5-AH1+ изотип	28
Невакциниров.+aPD-1	21

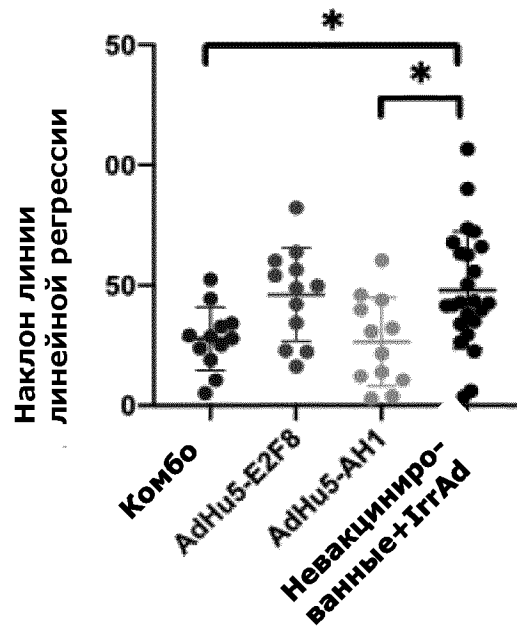
Фиг.19А



	Комбо	AdHu5-E2F8 MG	AdHu5-AH1MG	Невакциниров.+IrrAd
Средняя выживаемость	29,5	21	24,5	21

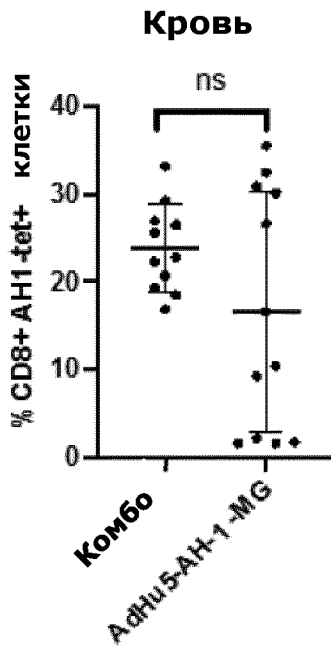
Фиг.19В

Скорости роста во всех группах



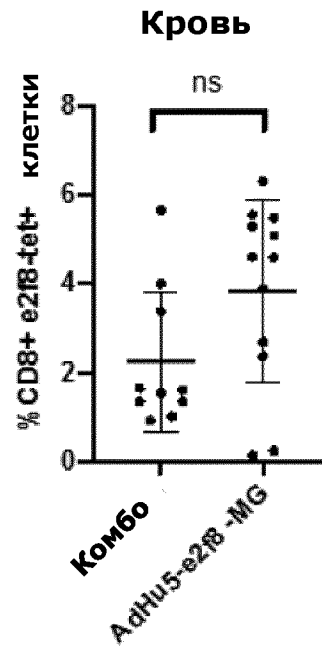
Фиг.20

АН-1-специфическая популяция



6 день после иммунизации

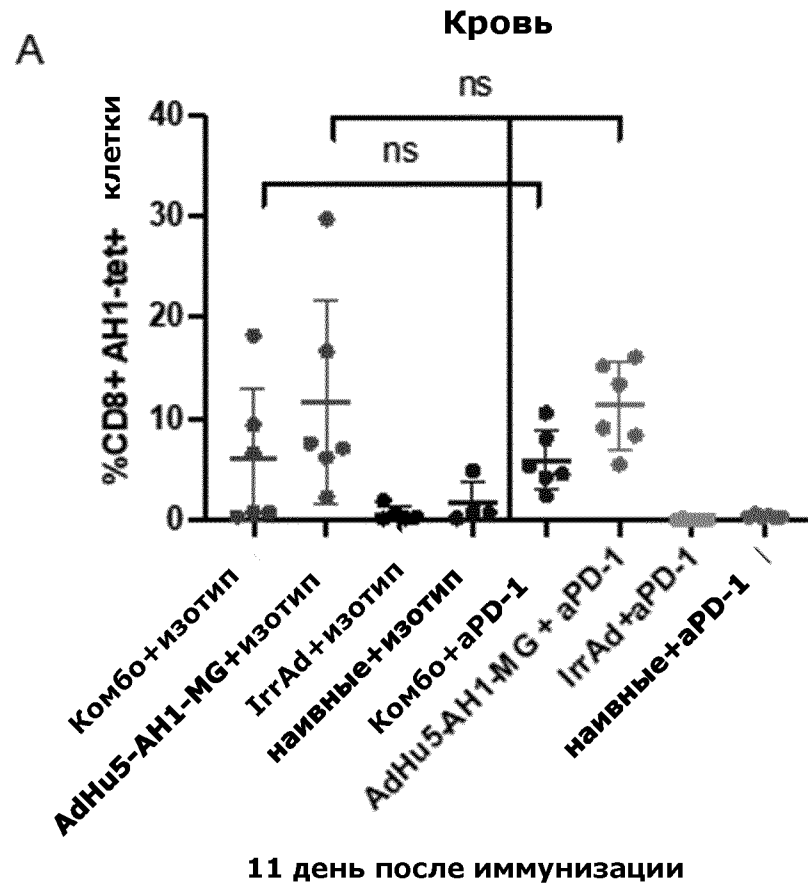
E2f8-специфическая популяция



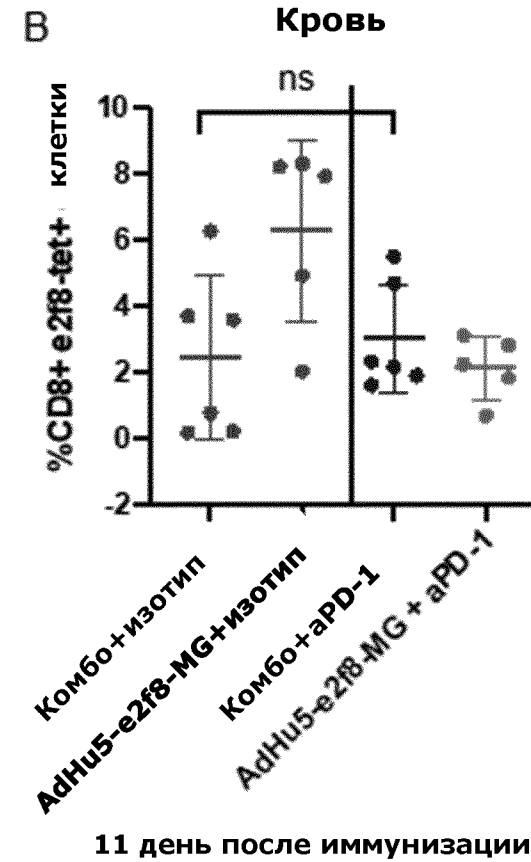
6 день после иммунизации

Фиг.21

АН1-специфический ответ

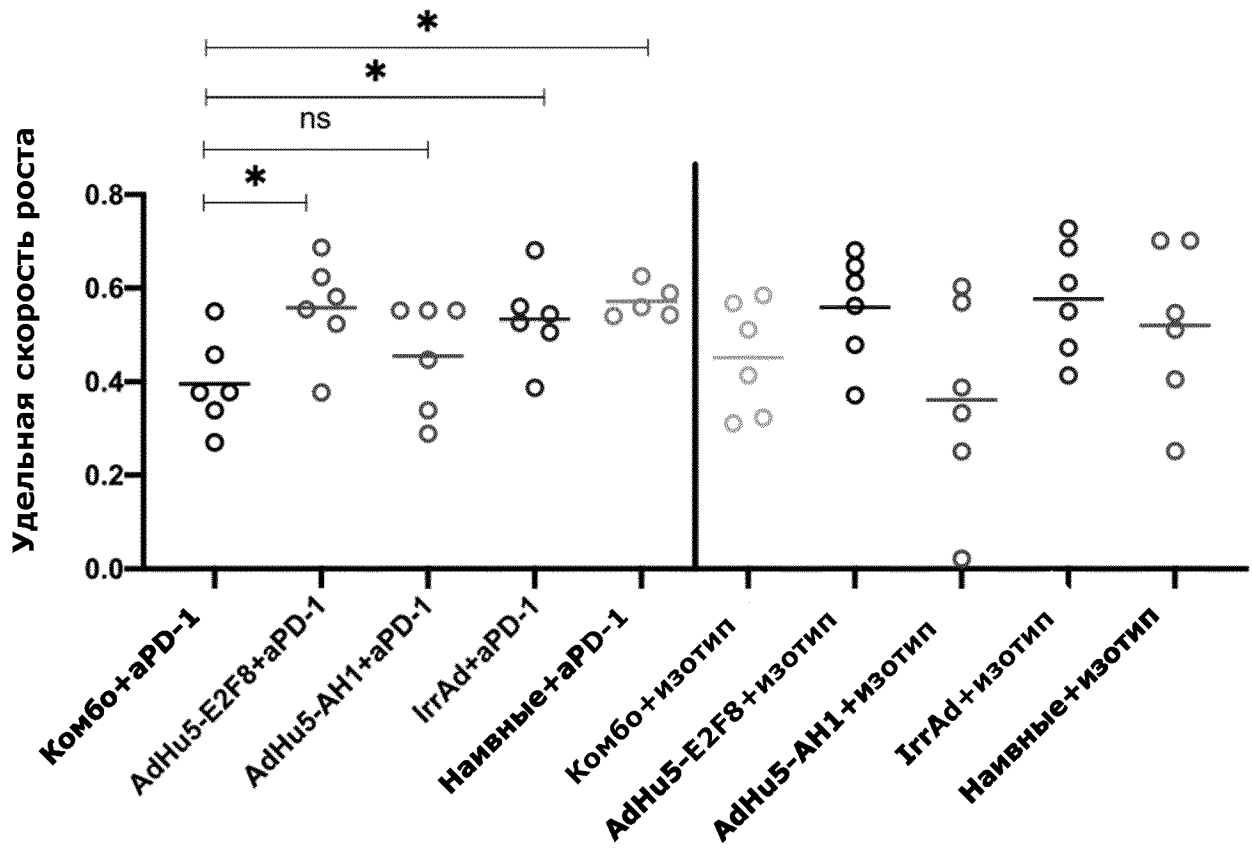


E2f8-специфический ответ

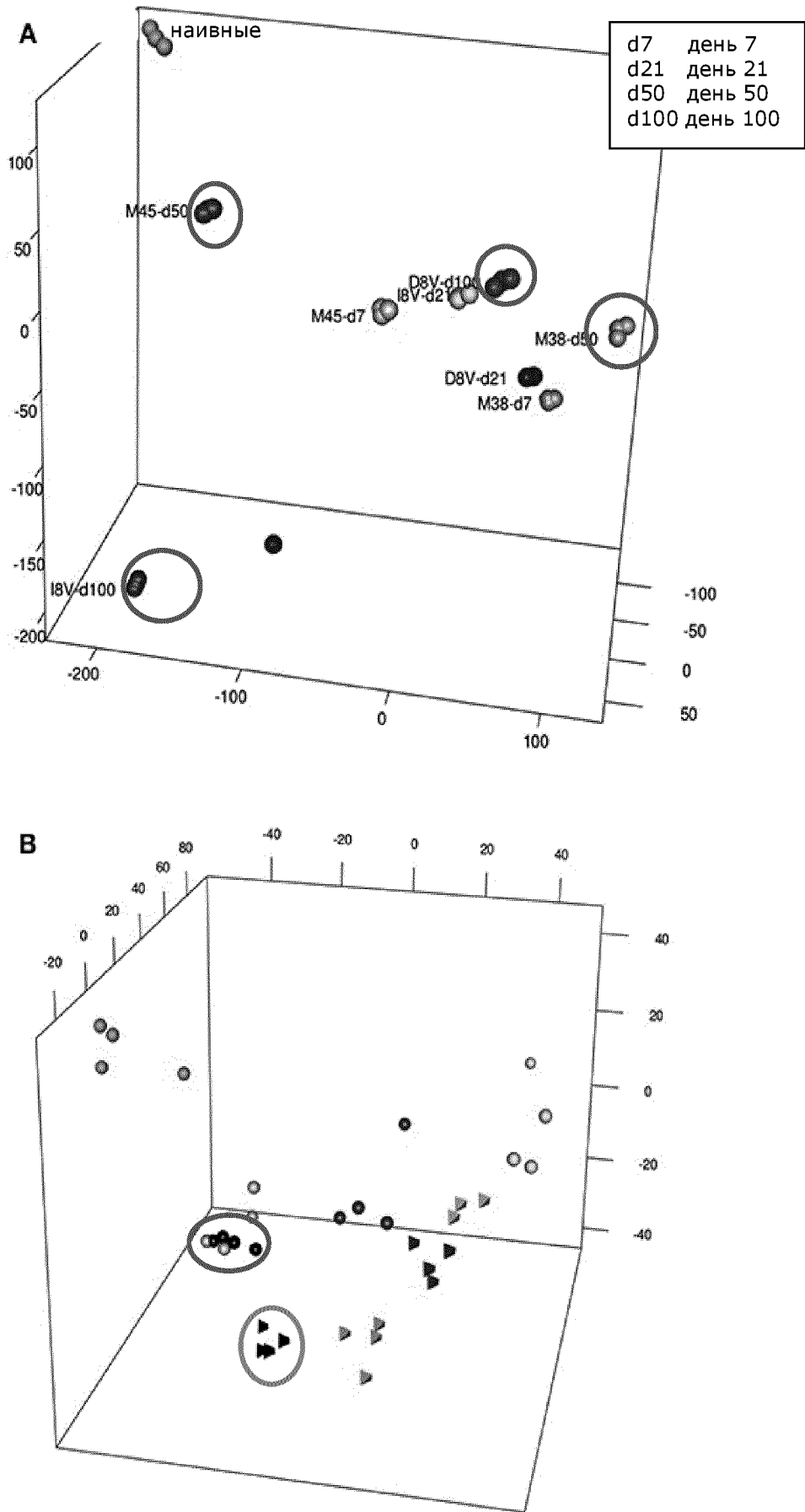


Фиг.22

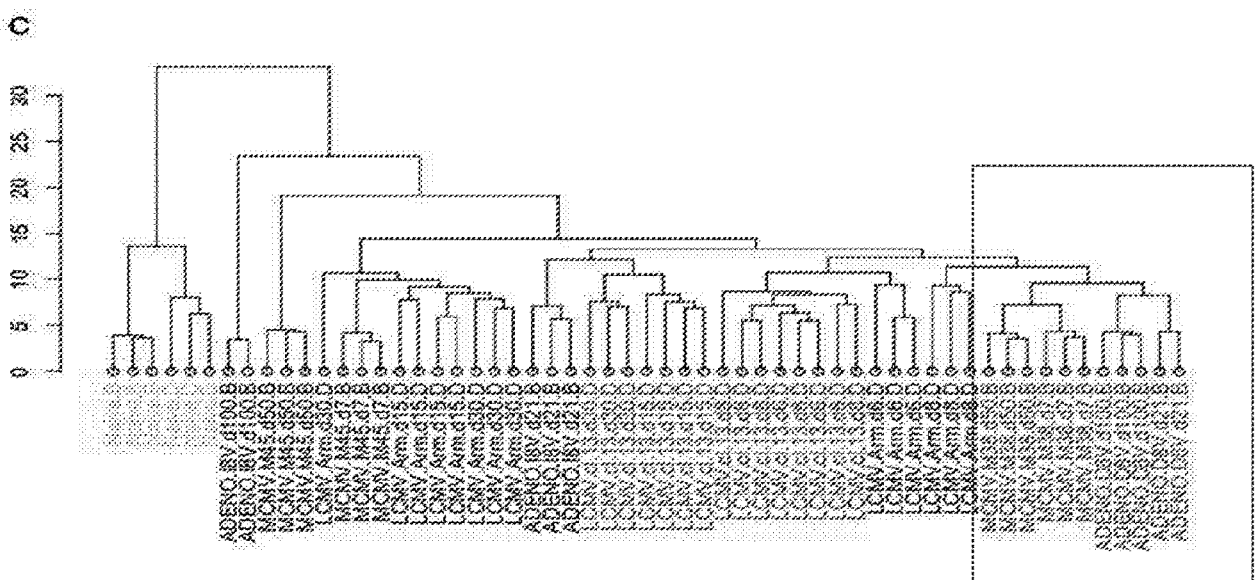
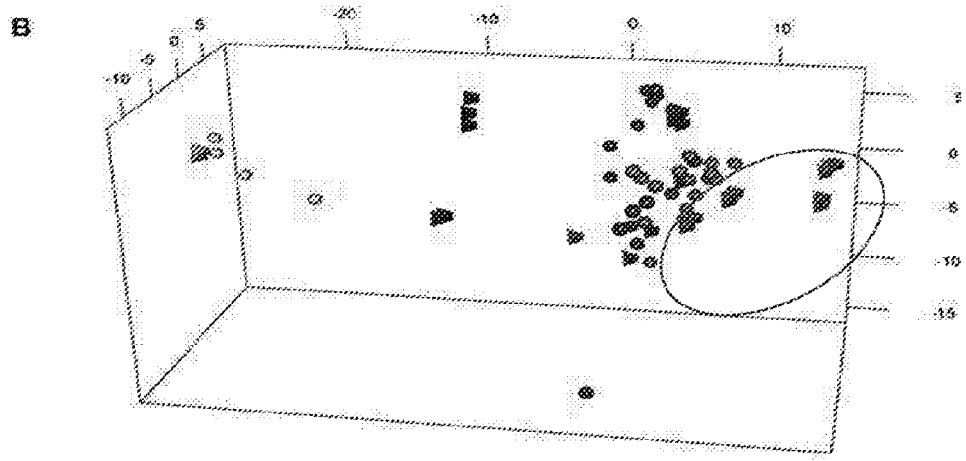
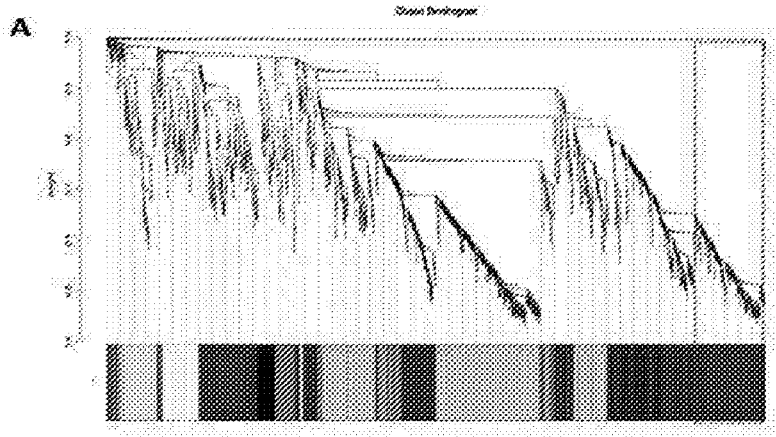
Удельные скорости роста



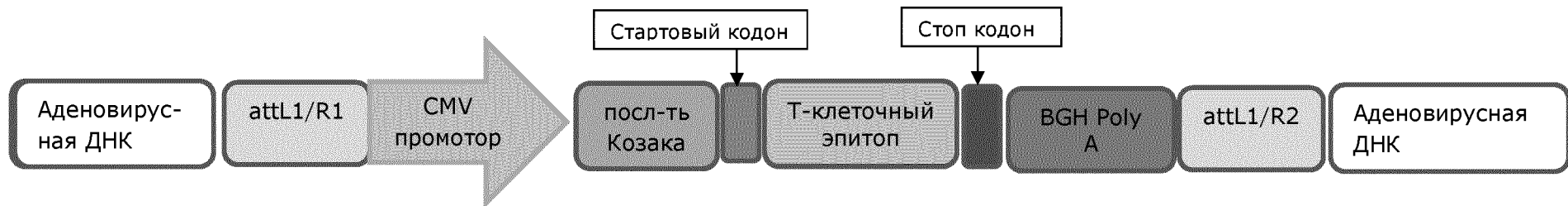
Фиг.23



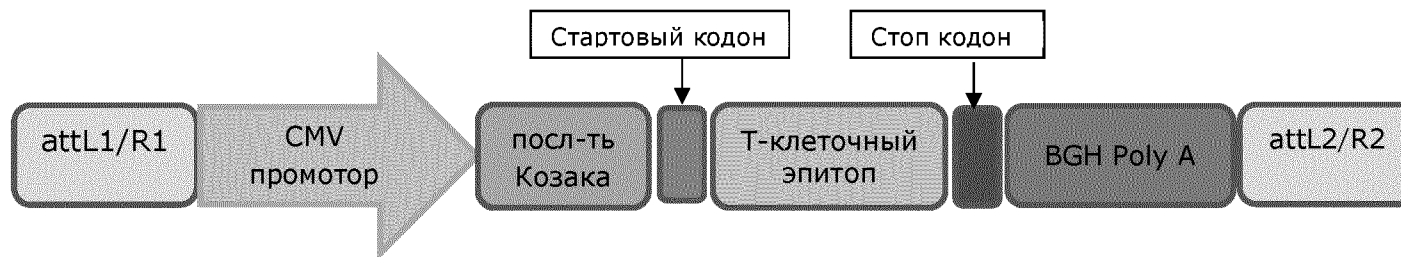
Фиг.24



1. Схема AdHu5 аденовируса, содержащего минигенную иммуногенную кассету

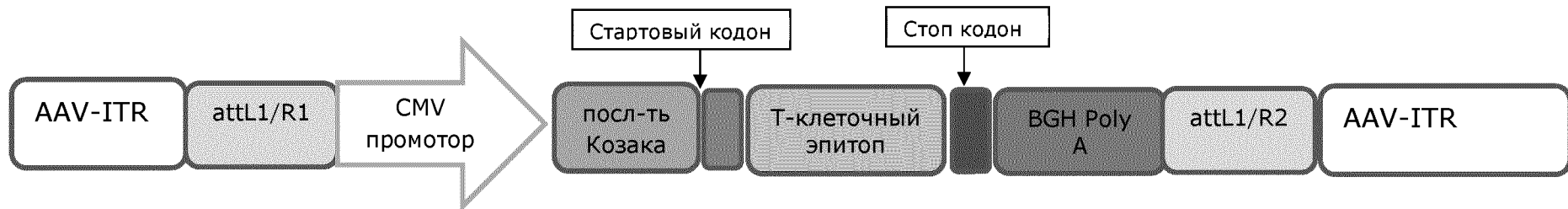


2. Схема минигенной иммуногенной кассеты

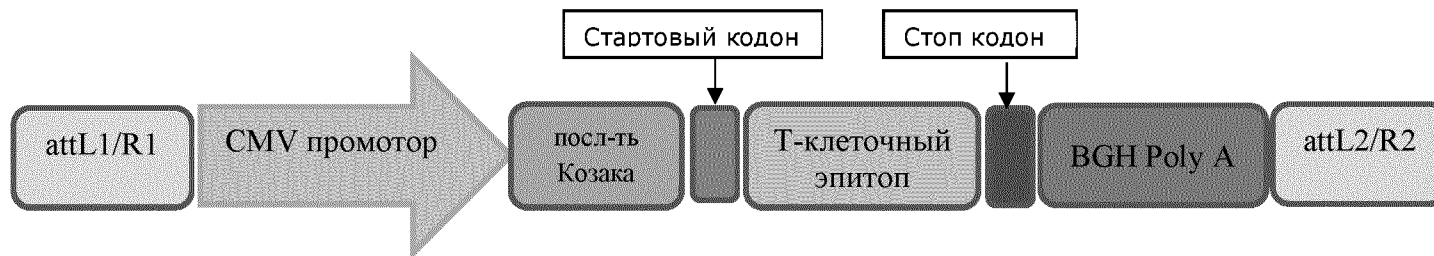


Фиг.26А

1. Схема AAV-ITR, содержащего минигенную иммуногенную кассету



2. Схема минигенной иммуногенной кассеты



Фиг.26В