

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291819 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.11

(51) Int. Cl. A61K 35/12 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.04

(54) ИММУНОТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ Т-КЛЕТОК ПРОТИВ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ОПУХОЛЕЙ

(31) 62/943,930

(72) Изобретатель:
Ивасаки Акико (US)

(32) 2019.12.05

(33) US

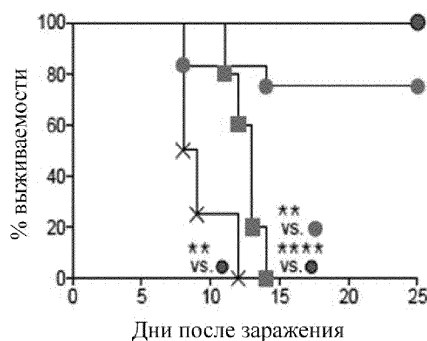
(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(86) PCT/US2020/063211

(87) WO 2021/113574 2021.06.10

(71) Заявитель:
ЙЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ (US)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения или предотвращения заболевания или нарушения головного, спинного мозга или центральной нервной системы. В изобретении описано, что иммуногенная композиция, которая индуцирует CD4 Т-клеточный иммунный ответ, индуцирует проницаемость гематоэнцефалического барьера и обеспечивает доступ терапевтического антитела или агента к головному мозгу, спинному мозгу или центральной нервной системе.



A1

202291819

202291819

A1

ИММУНОТЕРАПИЯ НА ОСНОВЕ Т-КЛЕТОК ПРОТИВ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И ОПУХОЛЕЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/943930, поданной 5 декабря 2019 г., содержание которой во всей полноте включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ФИНАНСИРУЕМЫХ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО 10 БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЙ ИЛИ РАЗРАБОТОК

Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства в соответствии с AI054359, AI062428, AI064705, AI054359, AI127429 и F30CA2394444, присужденными Национальным Институтом Здравоохранения (NIH). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

15

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вирус везикулярного стоматита (VSV) представляет собой нейротропный вирус с отрицательной смысловой РНК, весьма близкий к вирусу бешенства. В моделях на мышах путь воздействия VSV влияет на патогенез, ответ хозяина и последующие клинические проявления (Cuevas et al., 2017, Nat Microbiol, 2:17078). Например, внутривенные (в.в.) инфекции VSV хорошо переносятся штаммами мышей дикого типа, вызывая устойчивые реакции памяти (Iijima and Iwasaki, 2016, Nature, 533:552-556). Напротив, интраназальная (и.н.) доставка высоких доз VSV приводит к диссеминации вируса в головной мозг. VSV поражает обонятельные сенсорные нейроны носового эпителия (Lundh et al., 1987, Neuropathol Appl Neurobiol, 13:11-122) и проникает в центральную нервную систему (ЦНС), двигаясь по аксонам к обонятельной луковице (Reiss et al., 1998, Ann N Y Acad Sci, 855:751-761). Предыдущие исследования показали, что и.н. инфекция мышей VSV часто приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (Iijima and Iwasaki, 2016, Nature, 533:552-556; Bi et al., 1995, J Virol, 69:6466-6472). В стратегиях вакцинации модуляция проницаемости ГЭБ имеет решающее значение для того, чтобы позволить антителам или защитным иммунным клеткам опосредовать вирусную устойчивость в ЦНС.

20

25

30

Таким образом, в данной области техники существует потребность в композициях и способах лечения и предотвращения инфекций центральной нервной системы. Настоящее изобретение направлено на решение этой неудовлетворенной потребности в данной области техники.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения заболевания или нарушения головного мозга, центральной нервной системы или спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта, включающему а) введение иммуногенного агента для индукции иммунного ответа, тем самым индуцируя проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у субъекта; и б) введение по меньшей мере одного терапевтического агента для лечения заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент представляет собой антигенный белок или пептид для индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент включает антигенный пептид MHC класса II. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент включает пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:5 - SEQ ID NO:90.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один терапевтический агент включает ингибитор белка иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления белок иммунной контрольной точки представляет собой PD-1, PDL-1 CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT или CEACAM1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, атезолизумаб, BMS-986016, BMS-936559, MPDL3280A, MDX1105-01, MEDI4736, TSR-022, CM-24 или MK-3475.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение включает опосредованную патогеном инфекцию, выбранную из группы, состоящей из: вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции, прионной инфекции и гельминтной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления способ лечит или предотвращает воспаление, связанное с инфекцией.

В некоторых вариантах осуществления способ лечит или предотвращает состояние, связанное с инфекцией, выбранное из группы, состоящей из:

энцефалита, менингита, менингоэнцефалита, эпидурального абсцесса, субдурального абсцесса, абсцесса головного мозга и прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии (PML).

В некоторых вариантах осуществления способ лечит или предотвращает рак. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с опухолеспецифическим или опухолеассоциированным антигеном.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения или предотвращения заболевания или нарушения головного мозга, центральной нервной системы или спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта, включающая а) антигенный белок или пептид для индукции Т-клеточного иммунного ответа CD-4 у субъекта, индуцирующий тем самым проницаемость ГЭБ; и б) по меньшей мере один терапевтический агент для лечения заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах осуществления антигенный белок или пептид включает антигенный пептид МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления антигенный белок или пептид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:5 - SEQ ID NO:90.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один терапевтический агент включает ингибитор белка иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления белок иммунной контрольной точки представляет собой PD-1, PDL-1 CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT или CEACAM1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ипилиумаб, ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, атезолизумаб, BMS-986016, BMS-936559, MPDL3280A, MDX1105-01, MEDI4736, TSR-022, CM-24 или MK-3475.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, которые связываются с антигеном, ассоциированным с заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, протозойную инфекцию, прионную инфекцию, гельминтную инфекцию, энцефалит, менингит, менингоэнцефалит, эпидуральный абсцесс, субдуральный абсцесс, абсцесс головного мозга, прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию (PML) или рак.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующее подробное описание вариантов осуществления изобретения будет лучше понятно при чтении вместе с приложенными чертежами. Следует
5 понимать, что настоящее изобретение не ограничивается точными схемами и инструментами вариантов осуществления, показанных на чертежах.

Фигура 1, включающая Фигуры 1A-1G, представляет собой набор изображений, на которых изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что интраназальная иммунизация обеспечивает защиту
10 нейронов, зависящую от В-клеток, после генитального заражения HSV-2. Фигура 1A – Фигура 1D: мышей C57/BL6 иммунизировали посредством ТК-HSV-2 (10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ)) интраназальным (и.н.; $n = 12$), интраперитонеальным (и.п.; $n = 5$) или интравагинальным (и.ваг.; $n = 11$) путями. Через пять-шесть недель этим мышам и наивным мышам ($n = 4$) вводили
15 летальную дозу HSV-2 дикого типа (WT) (10^4 БОЕ). Смертность (Фигура 1A), клиническую оценку (Фигура 1B) и титр вируса в вагинальном смыве (Фигура 1C) измеряли в указанные дни после заражения. Фигура 1D: Через шесть дней после заражения измеряли титр вируса в гомогенатах тканей, включая ганглии дорсальных корешков (DRG) и спинной мозг. Фигура 1E – Фигура 1G: мышей
20 BALB/c ($n = 10$) или мышей J_HD с дефицитом В-клеток ($n = 6$) интраназально иммунизировали посредством ТК - HSV-2 (5×10^4 БОЕ.). Через шесть недель этих мышей и наивных мышей ($n = 4$) заражали летальной дозой WT HSV-2 (10^5 БОЕ). Определяли смертность (Фигура 1E) и клиническую оценку (Фигура 1F). Фигура 1G: Через шесть дней после заражения измеряли титр вируса в гомогенатах тканей,
25 включая ганглии дорсальных корешков (DRG) и спинной мозг с помощью анализа бляшкообразования. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ (двухсторонний непарный критерий Стьюдента).

Фигура 2, включающая фигуры 2A-2G, представляет собой набор
30 изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих нейтропротекцию, опосредованную антителами, на CD4 Т-клетки, но не на FcR η -опосредованный транспорт. Фигура 2A и Фигура 2B: Мышей C57/BL6 (WT) ($n = 4$) и мышей FcR $\eta^{-/-}$ ($n = 10$) интраназально иммунизировали посредством ТК- HSV-2 (10^5 БОЕ), а через 6 недель заражали летальной дозой WT HSV-2 (10^4 БОЕ).

Определяли смертность (Фигура 2А) и клиническую оценку (Фигура 2В). Фигура 2С и Фигура 2D: Мышей μ MT иммунизировали посредством ТК - HSV-2 (10^5 БОЕ) интраназально. Через пять-шесть недель наивных мышей ($n = 3$), наивных мышей, получавших иммунную сыворотку внутривенно ($n = 4$), мышей μ MT ($n = 23$) и мышей μ MT, получавших иммунную сыворотку внутривенно ($n = 10$), заражали летальной дозой WT HSV-2, и оценивали смертность (Фигура 2С) и клиническую оценку (Фигура 2D). Иммунную сыворотку, приготовленную из мышей, иммунизированных за 4 недели, посредством ТК- HSV-2 (200 мкл на мышь), вводили за 3 ч до заражения, и через 3 и 6 дней после заражения. Фигура 2Е и Фигура 2F: Мышей WT C57/BL6 ($n = 5$) и мышей $IFN-\gamma R^{-/-}$ ($n = 8$), иммунизированных интраназально посредством ТК- HSV-2 (10^5 БОЕ) за 6 недель, заражали летальной дозой WT HSV-2, и оценивали смертность (Фигура 2Е) и клиническую оценку (Фигура 2F). Истощение CD4 Т-клеток ($n = 4$) или нейтрализацию $IFN-\gamma$ ($n = 5$) осуществляли на -4, -1, 2 и 4 дни до/после заражения путем внутривенной инъекции анти-CD4 (GK1.5) или анти- $IFN-\gamma$ (XMG1.2) соответственно. Фигура 2G: Через шесть дней после заражения измеряли титр вируса в гомогенатах тканей, включая ганглии дорсальных корешков (DRG) и спинной мозг с помощью анализа бляшкообразования (Фигура 2Е). Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (двухсторонний непарный критерий Стьюдента).

Фигура 3, включающая Фигуру 3А - Фигуру 3D, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что память CD4+ Т-клеток необходима для доступа антител к нейрональным тканям. Наивных мышей WT или мышей WT и μ MT, интраназально иммунизированных посредством ТК- HSV-2 (10^5 БОЕ) за 6 недель до этого, заражали летальной дозой HSV-2 WT интравагинально. Через шесть дней после заражения, после интенсивной перфузии, с помощью ELISA анализировали уровни, специфичные для HSV-2 (Фигура 3А, Фигура 3С) и общего Ig (Фигура 3В, Фигура 3D) в гомогенатах тканей DRG и спинного мозга. Для истощения CD4 Т-клеток в дни -4, -1, 2 и 4 до/после заражения вводили CD4-специфическое антитело. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (двухсторонний непарный критерий Стьюдента).

Фигура 4, включающая Фигуру 4А - Фигуру 4F, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что $\alpha 4$ --интегрин-зависимое рекрутирование CD4⁺ Т-клеток памяти необходимо для доступа антител к нейрональным тканям. Мышей WT, иммунизированных интраназально посредством ТК⁻ HSV-2 за 6 недель до этого, заражали летальной дозой WT HSV-2. Нейтрализацию $\alpha 4$ --интегрин проводили на 2-й и 4-й дни после заражения путем внутривенной инъекции антитела против $\alpha 4$ --интегрин (CD49d).

Фигура 4А: Через шесть дней после заражения, после обширной перфузии, с помощью проточной цитометрии были обнаружены HSV-2-специфические IFN- γ ⁺CD4⁺ Т-клетки в DRG и спинном мозге. Фигура 4В: Изображено количество IFN- γ ⁺-секретирующих Т-клеток CD4 среди 50 000 клеток лейкоцитов CD45^{hi} в DRG и спинном мозге. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (двухсторонний непарный критерий Стьюдента). Фигура 4С: Замороженные срезы DRG окрашивали антителами против CD4, VCAM-1 или CD31. Ядра изображены окрашиванием 4',6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI) (синий). Изображения были сняты с использованием объектива $\times 10$ или $\times 40$. Масштабные полосы, 100 мкм. Стрелкой указаны клетки VCAM-1⁺ в паренхиме DRG. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере для трех подобных экспериментов. HSV-2-специфические антитела в DRG (фигура 4D) и спинном мозге (фигура 4Е) анализировали с помощью ELISA. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$ (двухсторонний парный критерий Стьюдента). Уровень альбумина в гомогенатах тканей анализировали с помощью ELISA (Фигура 4F). Истощение CD4 Т-клеток или нейтрализацию IFN- γ осуществляли на -4, -1, 2 и 4 дни до/после заражения путем внутривенной инъекции анти-CD4 (GK1.5) или анти-IFN- γ (XMG1.2) соответственно. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (двухсторонний парный критерий Стьюдента).

Фигура 5, включающая Фигуру 5А - Фигуру 5Н, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что в отсутствие TRM В-клетки необходимы для защиты хозяина от генитального заражения HSV-2. Фигура 5А: Мышей C57BL/6 и мышей μ MT иммунизировали интравагинально или интраназально посредством ТК- HSV-2. Через пять недель

срезы вагинальной ткани окрашивали на наличие клеток CD4⁺ (красный цвет) и клеток МНС класса II⁺ (зеленый цвет). Синяя маркировка изображает ядерное окрашивание с помощью DAPI (синий). Изображения были сняты с использованием объектива ×10 или ×40. Масштабные полосы, 100 мкм. Данные являются репрезентативными для трех подобных экспериментов. Фигура 5В – Фигура D: Мышей BALB/c и мышей J_HD иммунизировали посредством ТК- HSV-2 (10⁵ БОЕ) интраназально или интравагинально. Через шесть недель количество общих CD4⁺ Т-клеток и HSV-2-специфических IFN-γ⁺ CD4⁺ Т-клеток во влагалище (Фигура 5В), селезенке (Фигура 5С) и периферической крови (Фигура 5D) анализировали с помощью проточной цитометрии. Показаны проценты и общее количество клеток IFN-γ⁺ среди клеток CD4⁺CD90.2⁺. Данные представляют собой средние значения ± стандартная ошибка среднего. *P < 0,05; **P < 0,001; ***P < 0,001 (двухсторонний непарный критерий Стьюдента). Фигура 5Е: Мышей C57/BL6 иммунизировали интравагинально (наивные→D7) или интраназально (WT/и.н. → D0) вирусом ТК - HSV-2. В указанные моменты времени (D7: 7 дней после иммунизации; WT/и.н. → D0: 6 недель после иммунизации) с помощью количественной ПЦР измеряли общую вирусную геномную ДНК в тканях влагалища, DRG и спинном мозге. Фигура 5F - Фигура 5H: Интравагинально иммунизированные мыши C57BL/6 (WT), μMT и HEL-BCR Tg (левый партнер) были хирургически соединены с наивными мышами WT (правый партнер). Через три недели после парабиоза наивному партнеру вводили летальную дозу WT HSV-2 интравагинально. Изображены смертность (Фигура 5Е), клиническая оценка (Фигура 5F) и титр вируса в вагинальном смыве (Фигура 5G) после заражения вирусом.

Фигура 6, включающая Фигуру 6А и Фигуру 6В, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что иммунизация посредством ТК- HSV-2 слизистой оболочки создает более высокие уровни вирус-специфических IgG2b и IgG2c по сравнению с внутрибрюшинной иммунизацией. Мышей дикого типа иммунизировали посредством ТК HSV-2 (10⁵ БОЕ на мышью) интравагинальным, внутрибрюшинным или интраназальным путем. Через шесть недель этим мышам интравагинально вводили летальную дозу WT HSV-2. В указанные дни после заражения с помощью ELISA анализировали HSV-2-специфический Ig (фигура 6А) и общий Ig (фигура 6В) в сыворотке. Данные

представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

5 Фигура 7, включающая Фигуру 7А и Фигуру 7В, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих усиление доступа антител к DRG с помощью IFN- γ . Мышей WT, иммунизированных посредством ТК - HSV-2 (10^5 БОЕ на мышь) интраназально за 6 недель до этого, интравагинально заражали летальной дозой WT HSV-2. Через шесть дней после заражения, после обширной перфузии, HSV-2-специфический (Фигура 7А) и общий Ig (Фигура 7В) в гомогенатах DRG анализировали с помощью
10 ELISA. Истощение CD4 Т-клеток или нейтрализацию IFN- γ . осуществляли на -4, -1, 2 и 4 дни до/после заражения путем внутривенной инъекции анти-CD4 (GK1.5) или анти- IFN- γ (XMG1.2) соответственно. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ (двухсторонний непарный критерий Стьюдента).

15 Фигура 8, включающая Фигуру 8А - Фигуру 8D, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов по изучению нейтрализации IFN- γ , демонстрирующих, что $\alpha 4$ -интегрин или истощение CD4 Т-клеток не влияет на уровни циркулирующих иммуноглобулинов. Фигура 8А и Фигура 8В: Мышей WT, иммунизированных интраназально посредством ТК⁻ HSV-2 за 6-8 недель до этого, заражали летальной дозой WT HSV-2. Истощение CD4 Т-клеток или нейтрализацию IFN- γ осуществляли на -4, -1, 2 и 4 дни до/после заражения путем внутривенной инъекции анти-CD4 (GK1.5) или анти- IFN- γ (XMG1.2) соответственно. В указанные моменты времени измеряли HSV-2-специфический Ig в крови ($n = 4$) (Фигура 8А) и общий Ig в крови ($n = 4$) (Фигура 8В).
20 Фигура 8С и Фигура 8D: Мышей WT, иммунизированных интраназально посредством ТК⁻ HSV-2 за 6 недель до этого, заражали летальной дозой WT HSV-2. Нейтрализацию $\alpha 4$ -интегрина проводили на 2-й и 4-й дни после заражения путем внутривенной инъекции антитела против $\alpha 4$ -интегрина/CD49d. Через шесть дней в крови измеряли антитела, специфичные к HSV-2 (Фигура 8С), и общие антитела (Фигура 8D). Данные являются репрезентативными для трех подобных экспериментов.
30

Фигура 9, включающая фигуры 9А-9D, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что

нерелевантная иммунизация не привела к повышению уровней общих антител в нейрональных тканях. Фигура 9A: Мышей C57BL/6 иммунизировали сублетальной дозой вируса гриппа A/PR8 (10 БОЕ на мышь) интраназально. Через три недели после совместного культивирования с нагруженными HI-Flu/PR8 спленоцитами (CD45.1⁺) Т-клетки IFN- γ ⁺ CD4⁺, специфичные для гриппа, в селезенке и нейрональных тканях (DRG и спинной мозг) (CD45.2⁺) анализируют с помощью проточной цитометрии. В качестве контроля для совместного культивирования использовали лимфоциты, выделенные из селезенки мышей, иммунизированных ТК⁻ HSV-2 интраназально через 6 недель после вакцинации. (*** $P < 0,001$; двусторонний непарный критерий Стьюдента). Фигура 9B – Фигура 9D: мышей C57BL/6 иммунизировали сублетальной дозой вируса гриппа A/PR8 (10 БОЕ на мышь). Через четыре недели этим мышам интравагинально вводили летальную дозу WT HSV-2 (10⁴ БОЕ на мышь). Через шесть дней после заражения, с помощью ELISA измеряли общее количество антител в лизате DRG (Фигура 9B), спинного мозга (Фигура 9C) и крови (Фигура 9D).

Фигура 10, включающая Фигуру 10A и Фигуру 10B, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что большинство CD4 Т-клеток, рекрутированных в DRG и спинной мозг иммунизированных мышей, локализованы в паренхиме нейрональных тканей. Фигура 10A: Мышей C57BL/6 интраназально иммунизировали посредством ТК⁻ HSV-2. Через шесть дней после заражения иммунизированных за 6 недель до этого мышей, срезы нейрональной ткани (DRG и спинной мозг) окрашивали на наличие клеток CD4⁺ и клеток VCAM-1⁺ или клеток CD31⁺ (красный или зеленый). Синяя маркировка изображает ядерное окрашивание с помощью DAPI (синий). Изображения были сняты с использованием объектива $\times 10$ или $\times 40$. Масштабные полосы, 100 мкм. Фигура 10B: Мышей C57BL/6 интраназально иммунизировали посредством ТК⁻ HSV-2. Через шесть недель мышей интравагинально заражали посредством WT HSV-2, и нейрональные ткани собирали через 6 дней. DRG и спинной мозг окрашивали на наличие клеток CD4⁺ (красные) и клеток МНС класса II⁺, клеток CD11b⁺ или клеток Ly6G⁺ (зеленые). Синяя маркировка изображает ядерное окрашивание с помощью DAPI (синий). Изображения были сняты с использованием объектива $\times 10$ или $\times 40$. Масштабные полосы, 100 мкм. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере для трех подобных экспериментов.

Фигура 11, включающая Фигуру 11А и Фигуру 11В, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что внутрисосудистое окрашивание выявляет локализацию CD4 T-клеток в паренхиме нейрональных тканей. Фигура 11А и Фигура 11В: Мышей C57BL/6, иммунизированных интраназально посредством ТК⁻ HSV-2 за 6 недель до этого, заражали летальной дозой вируса WT HSV-2. Через шесть дней после заражения иммунизированным мышам внутривенно (в хвостовую вену) вводили конъюгированное с Alexa Fluor 700 антитело против CD90.2 (3 мкг на мышь). Через пять минут этих мышей умерщвляли для флуоресцентно-активированного анализа сортировки внутрисосудистых и внесосудистых лимфоцитов. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере для двух подобных экспериментов.

Фигура 12, включающая Фигуру 12А - Фигуру 12С, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих повышенную эпителиальную и сосудистую проницаемость в тканях влагалища с использованием рекомбинантного IFN- γ . Фигура 12А: WT мышам, иммунизированным посредством ТК⁻ HSV-2 (10^5 БОЕ) интраназально за 6 недель до этого, интравагинально вводили рекомбинантный мышиный IFN- γ (10 мкг на мышь) ($n = 3$) или PBS ($n = 3$). В указанные моменты времени с помощью ELISA измеряли HSV-2-специфический Ig (Фигура 12А) и общий Ig (Фигура 12В) во вагинальном смыве. Фигура 12С: Через два дня после лечения посредством rIFN- γ срезы вагинальной ткани окрашивали на наличие клеток VCAM-1⁺ (красный цвет) или клеток CD4⁺ (зеленый цвет) и клеток CD31⁺ (зеленый цвет). Синяя маркировка изображает ядерное окрашивание с помощью DAPI (синий). Изображения были сняты с использованием объектива $\times 10$ или $\times 40$. Масштабные полосы, 100 мкм. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере для трех подобных экспериментов.

Фигура 13, включающая Фигуру 13А и Фигуру 13В, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих, что проницаемость сосудов в DRG и спинном мозге увеличивается после заражения посредством WT HSV-2. Фигура 13А: Мышей C57BL/6 интраназально иммунизировали посредством ТК⁻ HSV-2. Через шесть дней после заражения иммунизированных за 6 недель до этого мышей, срезы нейрональной ткани (DRG и спинной мозг) окрашивали на наличие CD4⁺ клеток

(красный) и мышинового альбумина (зеленый). Синяя маркировка изображает ядерное окрашивание с помощью DAPI (синий). Фигура 13В: Мышей C57BL/6 интраназально иммунизировали посредством ТК⁻ HSV-2. Через шесть недель этих мышей заражали летальной дозой WT HSV-2. Через шесть дней после заражения интраназально иммунизированным мышам внутривенно вводили декстран, конъюгированный с Oregon green 488 (70 кДа) (5 мг/мл⁻¹, 200 мкл на мышь). Через сорок пять минут этих мышей умерщвляли для иммуногистохимического анализа. GM, серое вещество; BM, белое вещество. Данные являются репрезентативными для трех подобных экспериментов.

Фигура 14, включающая Фигуру 14А - Фигуру 14D, представляет собой набор изображений, отображающих результаты экспериментов, демонстрирующих потребность в CD4⁺ Т-клетках памяти для повышения уровней антител и проницаемости сосудов в головном мозге после иммунизации посредством VSV и заражения. Фигура 14А: Мышей C57BL/6 иммунизировали внутривенно посредством WT VSV (2×10^6 БОЕ на мышь). Через пять недель этих мышей интраназально заражали посредством WT VSV (1×10^7 БОЕ на мышь). Через шесть дней после заражения VSV-специфические IFN- γ ⁺ CD4⁺ Т-клетки в селезенке (CD45.2⁺) после совместного культивирования со спленоцитами, нагруженными HI-VSV (CD45.1⁺), или спленоцитами, нагруженными HI HSV-2, анализировали с помощью потоковой цитометрии. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ (двухсторонний непарный критерий Стьюдента). Фигура 14В и фигура 14С: Через пять недель после иммунизации посредством VSV этих мышей интраназально заражали посредством WT VSV (1×10^7 БОЕ на мышь). Через шесть дней после заражения с помощью ELISA измеряли VSV-специфичные антитела и общие антитела в лизате головного мозга (Фигура 14В) и сыворотке (Фигура 14С). Истощение CD4 Т-клеток осуществляли в дни -4, -1, 2 и 4 до/после заражения путем внутривенной инъекции анти-CD4 (GK1.5). Фигура 14D: Уровни альбумина в гомогенатах тканей анализировали с помощью ELISA. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $P < 0,05$; * $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни).

На Фигуре 15, включающей Фигуру 15А - Фигуру 15Н, представлены примерные экспериментальные результаты, демонстрирующие, что временная проницаемость ГЭБ, индуцированная иммунизацией VSV, обеспечивает

эффективный вирусный контроль в ЦНС. Мышей C57BL/6 иммунизировали
 посредством VSV (2×10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ)) подкожно. Через пять-
 шесть недель этим мышам (иммунизированным VSV) и наивным мышам
 (неиммунизированным) ($n=2-9$) вводили летальную дозу VSV (10^7 БОЕ). На
 5 Фигуре 15A представлены данные, демонстрирующие наличие копий вирусной
 РНК в обонятельных луковицах, головном мозге и мозжечке, определенные с
 помощью qRT-PCR на 1, 2, 3, 4, 6 и 10 дни после интраназального заражения
 посредством VSV. Результаты выражены как относительная экспрессия РНК и
 нормализованы с помощью HPRT. Сывороточный альбумин (Фигура 15B),
 10 смертность (Фигура 15C), общий IgG в ткани мозга (Фигура 15D) и VSV-
 специфический IgG (Фигура 15E) измеряли в указанные дни после заражения. Для
 Фигуры 15F - Фигуры 15H мышей AID slgM DKO иммунизировали посредством VSV
 (2×10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ)) подкожно. Через пять-шесть недель
 этим мышам (AIDslgGM Imm) и наивным мышам (AIDslgGM N.Imm) ($n=6-10$)
 15 вводили летальную дозу VSV (10^7 БОЕ). На Фигуре 15F показана смертность,
 наблюдаемая в течение 20 дней после заражения. Мышей BC57BL/6,
 иммунизированных посредством VSV (WT Imm.), и неиммунизированных мышей
 (WT N.Imm), использовали в качестве экспериментального контроля. Через пять-
 шесть недель мышам, иммунизированным или не иммунизированным посредством
 20 VSV, внутрибрюшинно вводили 5 мкг/500 мкл/мышь mAb против VSV или
 иммунной сыворотки против VSV в дни -1, 1 и 3 до/после интраназального
 заражения VSV. В качестве контроля использовали контрольное антитело изотипа
 IgG2a. На Фигуре 15G показаны копии вирусной РНК в обонятельных луковицах,
 головном мозге и мозжечке, определенные с помощью qRT-PCR на 6-й день после
 25 интраназального заражения VSV. Проточную цитометрию проводили на
 лейкоцитах, выделенных из головного мозга из C57BL/6 или AID slgM DKO,
 которые были либо иммунизированы посредством VSV (WT Imm. и AIDslgGM Imm
 соответственно), либо не иммунизированы (WT N.Imm.). В качестве контролей
 использовали неинфицированных мышей дикого типа (WT NI) и мышей C57BL/6,
 30 первично инфицированных VSV, но не иммунизированных VSV (первичный VSV
 WT). Для выявления цитокинов лейкоциты головного мозга повторно
 стимулировали *in vitro* с помощью PMA и иономицином в присутствии
 брефельдина А в течение 10-12 часов. На фигуре 15H показана частота IFN γ
 среди CD4 $^{+}$ Т-клеток.

На Фигуре 16, включающей Фигуру 16А - Фигуру 16F, представлены иллюстративные экспериментальные данные, демонстрирующие, что локальная доставка TCR-специфических антигенных пептидов HSV-2 открывает ГЭБ и обеспечивает эффективный приток антител в ЦНС. Фигура 16А - Фигура 16F: WT

5 мыши были иммунизированы посредством ТК- HSV-2 (2×10^6 БОЕ) подкожно или получили адоптивный перенос HSV-2-специфических CD4 Т-клеток (10^6 клеток/мышь/в.в.) от трансгенных мышей-доноров с gDTII-специфичным DsRed. Через пять-шесть недель после первичной инфекции посредством HSV-2 или

10 через 24 часа после переноса клеток этим мышам интраназально вводили 1 дозу пептидов gDTII, RVG-gDTII или RVG-OVA (100 мкг/мышь в 10 мкл, по 5 мкл в каждую ноздрю). На Фигуре 16А схематично представлен протокол иммунизации HSV-2 или адоптивного переноса. Через четыре дня после введения пептидов мышам, иммунизированным ТК, вводили (ретроорбитально) 488-конъюгированный декстран. Через 1 час мозг собирали, и проводили иммуногистохимический анализ,

15 как описано. На фигуре 16В замороженные срезы ткани головного мозга после инъекции декстрана окрашивали антителами против CD31. Ядра изображены окрашиванием DAPI. Количественное определение сывороточного альбумина (Фигура 16С) и общего IgG (Фигура 16D) через 4 дня после обработки пептидами в ткани головного мозга мышей, иммунизированных ТК, или мышей-реципиентов

20 адоптивного переноса CD4 Т-клеток. Мышам, иммунизированным ТК, внутрибрюшинно вводили козий антимышиный IgG на 3, 4 и 5 день после введения пептидов. На 6 день мышам в.в. вводили Qtracker 565 для окрашивания сосудов, и через 2 часа головной мозг собирали и анализировали. На Фигуре 16Е показан замороженный срез обонятельной луковицы, окрашенный ослиным антикозьим

25 IgG. Ядра изображены окрашиванием DAPI. Проточную цитометрию проводили на лейкоцитах, выделенных из головного мозга, от мышей, иммунизированных ТК, или мышей-реципиентов адоптивного переноса CD4 Т-клеток. Для детекции цитокинов клеточные суспензии из тканей головного мозга мышей, иммунизированных HSV-2, стимулировали в присутствии 5 мкг/мл брефельдина А

30 наивными спленоцитами (CD45.1+ CD45.2+), нагруженными антигеном HSV-2 (эквивалент 0,5 БОЕ на клетку) в течение 10–12 часов. Для неспецифической стимуляции клетки головного мозга, выделенные от мышей-реципиентов переноса gDTII, инкубировали с PMA и иономицином в присутствии брефельдина А X1 в течение 4 часов. Фигура 16F соответствует количеству секретирующих IFN- γ Т-

клеток CD4 среди лейкоцитов CD45hi в тканях головного мозга через 4 дня после введения пептидов. На нижней панели изображен типичный замороженный срез ткани головного мозга мышей-реципиентов переноса gDTII-DsRed. Срезы окрашивали антителами против CD31. Ядра изображены окрашиванием DAPI.

5 На Фигуре 17, включающей Фигуру 17A - Фигуру 17C, представлены иллюстративные экспериментальные данные, демонстрирующие, что локальная доставка TCR-специфических вирусных антигенных пептидов усиливает гетерологичные противовирусные ответы. Мышей WT инфицировали вирусом WT-HSV-2 с дозой 10^4 или 10^5 БОЕ интраназально. В качестве контроля использовали
10 неинфицированных мышей. Прирост массы тела (Фигура 17A) и смертность (Фигура 17B) мышей, инфицированных HSV-2, отслеживали в течение 20 дней после инфицирования. Мышей дикого типа иммунизировали посредством ТК-HSV-2 (2×10^6 БОЕ) подкожно. Через пять-шесть недель этим мышам интраназально вводили 1 дозу пептидов gDTII или RVG-OVA (100 мкг/мышь в 10
15 мкл, по 5 мкл в каждую ноздрю). На 6-й день после введения пептидов HSV-иммунизированных и неиммунизированных мышей (неиммунизированных) заражали летальной дозой WT-HSV (10^5 БОЕ). Через пять-шесть недель после первичной инфекции посредством HSV-2 этим мышам интраназально вводили 1 дозу пептидов gDTII, RVG-gDTII или RVG-OVA (100 мкг/мышь в 10 мкл, по 5 мкл в
20 каждую ноздрю). На 1, 3 и 5 день после введения пептидов мышам внутрибрюшинно вводили 5 мкг/500 мкл/мышь mAb против VSV с последующим интраназальным заражением на 7 день. Смертность (Фигура 17C) измеряли в указанные дни после заражения.

На Фигуре 18, включающей Фигуру 18A - Фигуру 18E, представлены
25 иллюстративные экспериментальные данные, демонстрирующие, что интраназальная доставка антигенного пептида может усиливать Т-клеточную иммунотерапию для сильных противоопухолевых ответов. Фигура 18A и Фигура 18B: мышей иммунизировали посредством ТК-HSV, и через 2 месяца им имплантировали опухоли GL261-Luc. Мышам вводили пептиды OVA или gDTII
30 интраназально через 6 дней после имплантации опухоли. На 4-й и 6-й день после интраназальной пептидной стимуляции мышей обрабатывали α PD1 или изотипическими антителами и наблюдали за ростом опухоли (Фигура 18A) и выживаемостью (Фигура 18B). Фигура 18C - Фигура 18E: мышей иммунизировали посредством ТК-HSV и вводили пептиды OVA или gDTII. Через четыре дня после

стимуляции мышам внутривенно вводили флуоресцентные молекулы для измерения экстравазации красителя из сосудов. На Фигуре 18D показана количественная оценка средних единиц флуоресценции изображений с Фигуры 18C (репрезентативные изображения) с использованием IMAGEJ. На Фигуре 18E

5 показаны репрезентативные сосуды с аналогичной максимальной интенсивностью, которые были взяты для измерения экстравазации флуоресцентных маркеров. Интенсивность измеряли на поперечном сечении сосудистой сети для измерения относительного красителя рядом с сосудистой структурой.

На фигуре 19 представлены данные, демонстрирующие, что

10 интраназальная доставка пептидов МНС класса II открывает ГЭБ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении предложены композиции и способы лечения заболевания или нарушения в центральной нервной системе или в ткани мозга.

15 Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции и способы лечения инфекции центральной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции и способы лечения опухолей головного мозга. В настоящем изобретении предложены композиции и способы индуцирования CD4

20 Т-клеточного ответа, например, Т-клеточного ответа CD4 памяти, у субъекта для индукции проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что позволяет терапевтическому агенту проникать через ГЭБ.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена композиция для лечения заболевания или нарушения, содержащая (1)

25 иммуногенный агент (например, иммуногенный пептид) для индукции CD4 Т-клеточного ответа и (2) терапевтический агент для лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент представляет собой антигенный белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления антигенный пептид представляет собой антиген заболевания или

30 нарушения, на которое направлено терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления антигенный пептид представляет собой антиген заболевания или нарушения, отличного от заболевания или нарушения, на которое направлено терапевтический агент.

В одном варианте осуществления композиция пригодна для лечения патогенной инфекции, где композиция содержит (1) иммуногенный агент (например, антигенный пептид) для индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтический агент, антитело или фрагмент антитела, направленный на антиген возбудителя.

В одном варианте осуществления композицию можно применять для лечения рака в ткани головного мозга, где композиция содержит (1) иммуногенный агент (например, антигенный пептид) для индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтическое антитело или фрагмент антитела, направленный на антиген, ассоциированный с раком в ткани головного мозга.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий (1) введение субъекту иммуногенного агента для индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) введение субъекту терапевтического агента для лечения заболевания или нарушения. Способ можно применять для лечения или предотвращения заболевания или нарушения в головном или спинном мозге. Способ можно применять для лечения или предотвращения любого заболевания или нарушения головного или спинного мозга, включая, помимо прочего, патогенную инфекцию, рак и нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения патогенной инфекции у субъекта, включающий введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтического агента, антитела или фрагмент антитела, направленного на антиген возбудителя. Способ можно применять для лечения или предотвращения любой патогенной инфекции, включая, но не ограничиваясь ими, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, паразитарную инфекцию, глистную инфекцию, протозойную инфекцию, прионную инфекцию и т.п.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения патогенной инфекции у субъекта, включающий введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) ингибитора белка иммунной контрольной точки или пути. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один

или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

5 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 Т-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтического антитела или фрагмента антитела, направленного на антиген, ассоциированный с опухолью.

10 В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 Т-клеточного иммунного ответа и (2) ингибитора белка иммунной контрольной точки или пути. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

20

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит данное изобретение.

25 Как используется в настоящем документе, каждый из следующих терминов имеет значение, связанное с ним в этом разделе.

Единственное число используется в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

30

Термин «примерно», используемый в настоящем документе применительно к измеримому значению, такому как количество, продолжительность времени и т.п., означает, что он включает вариации $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от

указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для осуществления раскрытых способов.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном.

5 Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела согласно настоящему изобретению могут существовать в различных формах, включая,

10 например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988,

15 Science 242:423-426).

Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела и относится к определяющим антиген вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, антитела scFv и мультиспецифические

20 антитела, образованные из фрагментов антител.

«Тяжелая цепь антитела», как используется в настоящем документе, относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях.

«Легкая цепь антитела», как используется в настоящем документе,

25 относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. □ и □ легкие цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антител.

Под термином «синтетическое антитело», как используется в настоящем документе, подразумевается антитело, полученное с использованием технологии

30 рекомбинантной ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом. Термин также следует толковать как обозначающий антитело, которое было получено путем синтеза молекулы ДНК, кодирующей антитело, и эта молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, при этом ДНК или аминокислотная

последовательность были получены с использованием технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, которая доступна и хорошо известна в данной области техники. Термин также следует толковать как обозначающий антитело, которое было получено в результате синтеза молекулы РНК, кодирующей антитело. Молекула РНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где РНК была получена путем транскрипции ДНК (синтетической или клонированной) или другой технологии, которая доступна и хорошо известна в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин «антиген» или «Ag» определяется как молекула, вызывающая адаптивный иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. Квалифицированному специалисту понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК или РНК. Специалист в данной области техники поймет, что любая ДНК или РНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает адаптивный иммунный ответ, таким образом, кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем документе. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген необязательно должен кодироваться исключительно полной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, использование частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для индукции желаемого иммунного ответа. Более того, квалифицированный специалист поймет, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться «геном». Очевидно, что антиген может быть синтезирован или получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, помимо прочего, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Термин «адъювант», используемый в настоящем документе, определяется как любая молекула для усиления антиген-специфического адаптивного иммунного ответа.

«Заболевание» представляет собой состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если болезнь не улучшается, то состояние здоровья животного продолжает ухудшаться. Напротив, «нарушение» у животного представляет собой это состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного менее благоприятно, чем оно было бы при отсутствии нарушения. При отсутствии лечения заболевание не обязательно приводит к дальнейшему ухудшению состояния здоровья животного.

«Эффективное количество», используемое в настоящем документе, означает количество, которое обеспечивает терапевтическую или профилактическую пользу.

«Кодирование» относится к неотъемлемому свойству определенных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матрицы для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующую цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно приводится в перечнях последовательностей, так и некодирующую цепь, используемую в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, можно отнести к кодирующей белок или другой продукт этого гена или кДНК.

«Вектор экспрессии» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточное количество cis-действующих элементов экспрессии; другие элементы экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, известные в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах), РНК и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и

аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

«Иммуноген» относится к любому веществу, вводимому в организм с целью вызвать иммунный ответ. Это вещество может представлять собой физическую молекулу, такую как белок, или может кодироваться вектором, таким как ДНК, мРНК или вирус.

Под термином «иммунная реакция», как он используется в настоящем документе, подразумевается обнаруживаемый результат стимуляции и/или активации иммунной клетки.

«Иммунный ответ», в качестве термина, используемого в настоящем документе, означает процесс, который приводит к активации и/или запуску эффекторной функции в Т-клетках, В-клетках, естественных киллерах (NK) и/или антигенпрезентирующих клетках (АПК). Таким образом, иммунный ответ, как будет понятно специалисту в данной области техники, включает, но не ограничивается этим, любую поддающуюся обнаружению антиген-специфическую или аллогенную активацию Т-хелперных клеток или цитотоксический Т-клеточный ответ, продукцию антител, опосредованную Т-клетками активацию аллергических реакций, инфильтрацию макрофагов и тому подобное.

«Иммунная клетка», в качестве термина, используемого в настоящем документе, означает любую клетку, участвующую в установлении иммунного ответа. Такие клетки включают, но не ограничиваются ими, Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, антиген-презентирующие клетки (например, дендритные клетки и макрофаги), моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и т.п.

«Выделенный» означает измененный или изъятый из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом присутствующие в живом организме, не являются «выделенными», а те же самые нуклеиновые кислоты или пептиды, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов в их естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

В контексте настоящего изобретения используются следующие сокращения для часто встречающихся нуклеозидов (нуклеотидное основание, связанное с сахаром рибозой или дезоксирибозой через N-гликозидную связь). «А» относится к

аденозину, «С» относится к цитидину, «Г» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «У» относится к уридину.

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК», может также включать интроны в той мере, в какой нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы).

Под термином «модулирующий», как он используется в настоящем документе, понимается опосредование обнаруживаемого повышения или снижения уровня ответа у субъекта по сравнению с уровнем ответа у субъекта в отсутствие лечения или соединения, и/или по сравнению с уровнем ответа у идентичного, но не получавшего лечения субъекта. Этот термин включает нарушение и/или воздействие на нативный сигнал или реакцию, тем самым опосредуя полезный терапевтический ответ у субъекта.

Термины «пациент», «субъект», «индивидуум» и т.п. используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому животному или его клеткам, будь то *in vitro* или *in situ*, восприимчивым к описанным в настоящем документе способам. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления пациент, субъект или индивидуум представляет собой человека.

Термин «полинуклеотид», используемый в настоящем документе, определяется как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, используемые в настоящем документе нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды являются взаимозаменяемыми. Специалисту в данной области техники известно, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые могут гидролизироваться в мономерные «нуклеотиды». Мономерные нуклеотиды могут гидролизироваться до нуклеозидов. Используемые в настоящем документе полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, все последовательности нуклеиновых кислот, которые получены любыми способами, доступными в данной области техники, включая, помимо прочего, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновых кислот из рекомбинантной

библиотеки или клеточной генома, с использованием обычных технологий клонирования и ПЦР™ и т.п., а также синтетическими способами.

Используемые в настоящем документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не накладывается никаких ограничений на максимальное количество аминокислот, которые могут составлять последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Используемый в настоящем документе термин относится как к коротким цепям, которые в данной области техники также обычно называют пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепям, которые в данной области техники обычно называют белками, среди которых существует много типов. "Полипептиды" включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки, среди прочего. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации.

Под термином «специфически связывается», как он используется в настоящем документе в отношении антитела, подразумевается антитело, которое распознает специфический антиген, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном одного вида, может также связываться с этим антигеном одного или более других видов. Но такая межвидовая реактивность сама по себе не меняет классификации антитела как специфического. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не меняет классификации антитела как специфического. В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфичное связывание» могут использоваться в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим соединением, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или

эпитопа) на химическом веществе; например, антитело распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело является специфичным к эпитопу «А», присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, содержащей меченый «А» и антитело, уменьшит количество меченого А, связанного с антителом.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтический» означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект достигается путем подавления, ослабления, ремиссии или устранения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству рассматриваемого соединения, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы или субъекта, который ищет исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Термин «терапевтически эффективное количество» включает такое количество соединения, которое при введении является достаточным для предотвращения развития или до некоторой степени облегчения одного или более признаков или симптомов заболевания или нарушения, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести, а также возраста, массы тела и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

Термин «лечить» заболевание, используемый в настоящем документе, означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом.

Используемый в настоящем документе термин «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относится к процессу, с помощью которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку-субъект и ее потомство.

"Вектор" представляет собой композицию вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известны многочисленные векторы, включая, но не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными

соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также следует толковать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и т.п.

Диапазоны: в настоящем раскрытии различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазонов предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, должно рассматриваться как имеющее конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

20 Описание

Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения заболевания или нарушения в иммунопривилегированной ткани у субъекта, нуждающегося в этом. Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что Т-клетки CD4 памяти необходимы для обеспечения доступа антител к иммунопривилегированным тканям. Например, в настоящем документе показано, что для защиты хозяина после иммунизации в отдаленном участке необходимы как антитела, так и Т-клетки CD4. Показано, что Т-клетки памяти CD4 мигрируют в иммунопривилегированные ткани, секретируют интерферон- γ и опосредуют локальное повышение проницаемости сосудов, обеспечивая доступ антител. Результаты показывают ранее недооцененную роль Т-клеток CD4 в мобилизации антител к периферическим участкам инфекции, где они помогают ограничить инфекцию.

В настоящем изобретении предложена композиция для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, включающая первый агент и второй

агент. В одном варианте осуществления первый агент индуцирует иммунный ответ у субъекта. Например, в одном варианте осуществления первый агент индуцирует активацию и продукцию Т-клеток памяти CD4. В некоторых вариантах осуществления первый агент представляет собой иммуногенную композицию (например, вакцину), которая индуцирует иммунный ответ. В одном варианте осуществления второй агент представляет собой терапевтический агент, направленный на лечение заболевания или нарушения. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с антигеном, ассоциированным с заболеванием или нарушением. Т-клетки памяти CD4, индуцированные первым агентом, позволяют второму агенту получить доступ к иммунопривилегированной ткани.

В настоящем изобретении предложены способы лечения или предотвращения заболевания или нарушения иммунозависимой ткани у субъекта, нуждающегося в этом.

В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту первого агента и второго агента. В одном варианте осуществления первый агент индуцирует иммунный ответ у субъекта. Например, в одном варианте осуществления первый агент индуцирует активацию и продукцию Т-клеток памяти CD4. В некоторых вариантах осуществления первый агент представляет собой иммуногенную композицию (например, вакцину), которая индуцирует иммунный ответ. В одном варианте осуществления второй агент представляет собой терапевтический агент, направленный на лечение заболевания или нарушения. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с антигеном, ассоциированным с заболеванием или нарушением. В одном варианте осуществления способ включает введение вакцины для индукции иммунного ответа у субъекта; и введение терапевтического антитела или фрагмента антитела, которое связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

В одном варианте осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или предотвращения заболевания или нарушения в любой иммунозависимой ткани,

включая, помимо прочего, головной мозг, спинной мозг, периферическую нервную систему, яички, глаза, плаценту, печень, поджелудочную железу и тому подобное.

В одном варианте осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или предотвращения любой патогенной инфекции, включая, но не ограничиваясь ими, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, паразитарную инфекцию, глистную инфекцию и т.п.

В одном варианте осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения или предотвращения рака.

В одном варианте осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или предотвращения неврологического нарушения, включая, но не ограничиваясь этим, болезнь Альцгеймера.

Композиции

Настоящее изобретение относится к композициям для лечения или предотвращения заболевания или нарушения, содержащим первый агент и по меньшей мере один дополнительный агент. В одном варианте осуществления первый агент индуцирует иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления первый агент представляет собой иммуногенный агент (например, антигенный пептид), который индуцирует иммунный ответ.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой терапевтический агент для лечения заболевания или нарушения. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный агент представляет собой антитело или фрагмент антитела,

нацеленные на антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с антигеном.

5

Иммуногенный агент

В одном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит иммуногенный агент. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент включает пептид, молекулу нуклеиновой кислоты, клетку и т.п., которые индуцируют антиген-специфический иммунный ответ. Например, в одном варианте осуществления иммуногенный агент включает антиген. В некоторых вариантах реализации агент связан с заболеванием или нарушением, которое лечат. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с патогенной инфекцией, которую лечат. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой опухолеспецифический антиген или опухолеассоциированный антиген.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент представляет собой вакцину. Чтобы иммуногенный агент можно было использовать в качестве вакцины, иммуногенный агент должен индуцировать иммунный ответ на антиген в клетке, ткани или млекопитающем (например, человеке). В некоторых вариантах осуществления вакцина индуцирует защитный иммунный ответ у млекопитающего. В одном варианте осуществления вакцина индуцирует активацию и продукцию Т-клеток памяти CD4 у млекопитающего. Используемый в настоящем документе термин «иммуногенный агент» может включать антиген (например, пептид или полипептид), нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген (например, вектор экспрессии антигена), и клетку, экспрессирующую или представляющую антиген, или клеточный компонент. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент представляет собой инактивированный патоген, аттенуированный патоген, чувствительный к температуре патоген или тому подобное, который можно использовать для индуцирования патоген-специфического иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления антиген включает вирусный антиген, включая, но не ограничиваясь этим, антиген вируса гриппа, вируса Зика, вируса Эбола, вируса японского энцефалита, вируса эпидемического паротита, вируса кори, вируса бешенства, вируса ветряной оспы, вируса Эпштейна-Барр (HHV-4),

- цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 (HSV-1) и вируса простого герпеса 2 (HSV-2), вируса иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1), вируса JC, арборвирусов, энтеровирусов и вируса Западного Нила, вируса денге, полиовируса и вируса ветряной оспы. В некоторых вариантах осуществления антиген включает
- 5 бактериальный антиген, включая, но не ограничиваясь ими, антиген *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactia* и *Escherichia coli*. В некоторых вариантах осуществления антиген включает антиген грибка или простейшего, включая, но не ограничиваясь ими, антиген кандидоза, аспергиллеза, криптококкоза и *Toxoplasma gondii*.
- 10 В некоторых вариантах осуществления антиген включает опухолеспецифический антиген или опухолеассоциированный антиген, включая, но не ограничиваясь ими: антигены дифференцировки, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназу, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические мультилинейные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2,
- 15 p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA и другие опухолевые антигены, связанные с зародышевой линией рака, включая пептиды, часто встречающиеся в интронных областях или некодирующих областях, таких как NY-ESO1, семейство MAGE-C, и антигены, полученные из эндогенных ретро-элементов, сверхэкспрессированные онкогены и мутированные гены-супрессоры
- 20 опухолей, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барр, антигены вируса гриппа, антигены вируса CMV, антигены вируса везикулярного стоматита (VSV) и антигены вируса папилломы человека (HPV).
- 25 Другие крупные белковые антигены включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротейн, бета-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250,
- 30 Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 связывающий белок\циклофилин C-ассоциированный белок, TAAL6, TAG72, TLP, Aim2, Art-4, EphA2, EZH2, Fosl1, PTH-rP, Sox11, Whsc2, YKL-40 и TPS.

- В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент представляет собой антигенный пептид МНС класса II. Пептиды МНС класса II представляют собой антигенные пептиды, которые нагружены на молекулы МНС класса II, и весь комплекс мигрирует на поверхность клеточной мембраны, где пептид-специфические CD4 Т-клетки (хелперные Т-клетки) могут его распознать.
- Молекулы МНС класса II включают, но не ограничиваются ими, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1 и их подмножества, включая от -A1 -B1 до -B3, до -B5.

Примеры антигенных пептидов включают, но не ограничиваются ими:

<u>Белок</u>	<u>Пептид</u>	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>молекула класса II</u>	<u>МНС</u>
EBV				
BHRF1	TVVLRVHLLLEY	5	HLADR4	
BALF1	AGLTLSLLVICSYLFISR	6	HLADR2	
BYRF1	TVFYNIIPMPL	7	HLA DQ2/DQ7	
EBNA1	TSLYNLRRGTALA	8	HLA DR1	
	LDLDFGQLTPHTKAV	9		
BZLF1 (11-25)	VKFTPDYQVPFVQA	10	DRB3*01	
BZLF1 (61-75)	LTAYHVSTAPTGSWF	11	DRB3*01	
BZLF1(116-130)	PGDNSTVQTAAAVF	12	DRB1*13	
BZLF1 (407-421)	PPVKRKKGLRDSREG	13	DRB1*08	
BMLF1 (41-55)	DEDPTPAHAIPARPS	14	DQB1*07	
BMHRF1 (122-133)	PYYVVDLSVRGM	15	DRB1*04	
BMRF1 (136-150)	VKLTMEYDDKVS KSH	16	DRB1*0301	
BKRF2 (116-135)	GSFSVEDLFGANLNRYAWHR	17	DPB1*04	
BKZLF2 (186-205)	QIFGSHCTYVSKFSTVPVSH	18	DRB1*16	
BLLF1 (61-81)	LDLDFGQLTPHTKAVYQPRG	19	DRB1*15	
BALF4 (575-589)	DNEIFLTCKMTEVCQ	20	DRB1*08	
BXLF2 (126-140)	LEKQLFYYIGTMLPNTRPHS	21	DRB5*01	
ВИРУС ГРИППА				
	PKYVKQNTLKLAT	22	HLA-DRA*01	
NP	VFELSDEKAASPI	23	DRB1*0901	

NP	GQISIQPTFSVQR	24	DRB1*0404
M1	RQMVQAMRTIG	25	DPB1*0301
M1	GLIYNRMGAVTTE	26	DRB1*0101
M1(43-55)	MEWLKTRPILSPL	27	DPB1*0401
M1(94-106)	DKAVKLYRKLKRE	28	DRB1*1301
M1(101-113)	RKLKREITFHGAKK	29	DRB1*0701
M1(105-117)	GLIYNRMGAVTTE	30	DRB1*0701
M1(209-221)	ARQMVQAMRTIGTT	31	DRB1*0404
NP(102-114)	GKWMRELILYDKER	32	
NP(115-127)	EIRRIWRQANNGD	33	DRB1*0301
NP(404-416)	GQISIQPTFSVQR	34	DRB1*1401
NP(463-475)	VFELSDEKAASPI	35	
H2 HA339-355	<u>SRGLFGAIAGFIEGGWQ</u>	36	DRB1*01:09 и *01:01
H1 HA340-356	IQSR <u>GLFGAIAGFIEGG</u>	37	
H3 HA338-354	NVPEKQTRGIFGAIAGF	38	
H3 HA344-360	TRGIFGAIAGFIENGWE	39	
H5 HA345-361	<u>KRGLFGAIAGFIEGGWQ</u>	40	
B/HA360-376	ERGFFGAIAGFLEGGWE	41	
NS1-11	ESDEAFKMTMASALASR	42	DR1-Tg мышей от Merk
NS1-21	LTLRAFTEEGAIVGEI	43	DR1-Tg мышей от Merk
NS1-22	FTEEGAIVGEISPLPSL	44	DR1-Tg мышей от Merk
NPp74	SDMRAEIIKMMESARPE	45	DR1-Tg мышей от Merk
NPp75	IIKMMESARPEEVSFQG	46	DR1-Tg мышей от Merk
HA33-52	VDTVLEKNVTVTHSVNLLED	47	DR*07:01
HA113-132	IDYEELREQLSSVSSFERFE	48	DRB5
HA121-140	QLSSVSSFERFEIFPKTSSW	49	DR1101 и DRB5
HA161-180	FYKNLIWLVKKGNSTPKLSK	50	DR1101 и DRB5
HA249-268	TLVEPGDKITFEATGNLVVP	51	DR07:01
HA257-276	ITFEATGNLVVPRYAFAMER	52	DR07:01
HA265-284	LVVPRYAFAMERNAGSGIII	53	DR04:01
HA305-324	TSLPFQNIHPITIGKCPKYV	54	DR0701
HA307-319	PKYVKQNTLKLAT	55	DRB*04:01
CMV			
pp65 108-127	MSIYVYALPLKMLNIPSINVH	56	DR0101
pp65 115-127	LPLKMLNIPSINVH	57	DR0101

pp65 14-25	VLGPISGHVLKA	58	
pp65 47-57	HVRVSQPSLIL	59	
pp65 337-349	VELRQYDPVAALF	60	
pp65 370-389	IVKPGDILVINSNGNLIA	61	
pp65 494-511	RNLVPMVATVQGQNLKYQ	62	
pp65 518-531	NDIYRIFAELEGVW	63	
	LLQTGIHVRVSQPSL	64	DR15 (DQ6)
	IIKPGKISHIMLDVA	65	DR53 (DQ3)
	PQYSEHPTFTSQYRI	66	DR11
	EHPTFTSQYRIQGKL	67	
	FTSQYRIQGKLEYRH	68	
	QEFFWDANDIYRIFA	69	DR52
	FFWDANDIYRIFAE	70	
	AGILARNLVPMVATV	71	
	PPWQAGILARNLVPMV	72	
	ARNLVPMVATVQGQN	73	
	LLQTGIHVRVSQPSL	74	DR15
	PLKMLNIPSINVHHY	75	DR1/DR3
	TRQQNQWKEPDVYYT	76	DR1
	EPDVYYTSAFVFPTK	77	DR7
	KVYLESFCEDVPSGK	78	DR15
	TLGSDVEEDLTMTRN	79	DR3
	QPFMRPHERNGFTVL	80	DR13
	IIKPGKISHIMLDVA	81	DR4/DR7
	EHPTFTSQYRIQGKL	82	DR11
	YRIQGKLEYRHTWDR	83	DR3
	TERKTPRVTGGGAMA	84	DR14
	ASTSAGRKRKSASSA	85	DR11
	ACTSGVMTRGRLKAE	86	DR1
	AGILARNLVPMVATV	87	DR11 DR3
	KYQEFFWDANDIYRI	88	DR1 DR3
HSV			
RVG-gDT	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRG	89	
	KRASNGGGGCCIPPNWHIPSIQD		
	A		
gD315-327	IPPNWHIPSIQDA	90	

В некоторых вариантах осуществления антиген включает антиген, ассоциированный с неврологическим нарушением. Примеры антигенов, связанных с неврологическим нарушением, включают, но не ограничиваются ими, различные

мономерные и агрегированные формы A β , тау, BACE1, α -синуклеин, хантингтин, TAR-ДНК-связывающий белок 43 кДа, супероксиддисмутаза 1, прионный белок и их фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент содержит
5 полноразмерный белок, связанный с патогеном, опухолью или неврологическим нарушением. Например, в одном варианте осуществления иммуногенный агент содержит полноразмерный белок столбнячного анатоксина (TT).

Антигенный пептид или белок согласно настоящему изобретению можно
получить с использованием химических способов. Например, пептиды могут быть
10 синтезированы твердофазными методами (Roberge J Y et al (1995) Science 269: 202-204), отщеплены от смолы и очищены препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией. Автоматизированный синтез может быть осуществлен, например, с использованием синтезатора пептидов ABI 431 A (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя.

Настоящее изобретение также следует рассматривать как включающее
15 любую форму белка или пептида, имеющую существенную гомологию с белком или пептидом, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления пептид, который является «по существу гомологичным», гомологичен примерно на 50%, гомологичен примерно на 70%, гомологичен
20 примерно на 80%, гомологичен примерно на 90%, гомологичен примерно на 95% или гомологичен примерно на 99% аминокислотной последовательности родительского белка или пептида.

В качестве альтернативы антигенный пептид или белок может быть
получен рекомбинантными методами или путем отщепления от более длинного
25 полипептида. Состав пептида может быть подтвержден аминокислотным анализом или секвенированием.

Варианты антигенных пептидов или белков согласно настоящему изобретению могут представлять собой (i) пептиды, в которых один или более
аминокислотных остатков заменены консервативным или неконсервативным
30 аминокислотным остатком, и такой замещенный аминокислотный остаток может или может не кодироваться генетическим кодом, (ii) пептиды, в которых присутствует один или более модифицированных аминокислотных остатков, например, остатков, модифицированных путем присоединения замещающих групп, (iii) пептиды, причем пептид представляет собой альтернативный сплайсинг-

вариант пептида согласно настоящему изобретению, (iv) фрагменты пептидов и/или (v) пептиды, в которых пептид слит с другим пептидом, таким как лидерная или секреторная последовательность, или последовательность, которая используется для очистки (для например, His-метка) или для обнаружения (например, метка эпитопа Sv5). Фрагменты включают пептиды, полученные посредством протеолитического расщепления (включая многосайтовый протеолиз) исходной последовательности. Варианты могут быть посттрансляционными или химически модифицированными. Такие варианты считаются находящимися в пределах компетенции специалистов в данной области техники, исходя из представленных в настоящем документе идей.

Как известно в данной области техники, «сходство» между двумя пептидами определяют путем сравнения аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных заменителей одного полипептида с последовательностью второго полипептида. Варианты определяют как включающие пептидные последовательности, отличающиеся от исходной последовательности, например, отличающиеся от исходной последовательности менее чем на 40% остатков на представляющий интерес сегмент, менее чем на 25% остатков на представляющий интерес сегмент, менее чем на 10% остатков на представляющий интерес сегмент или всего на несколько остатков на представляющий интерес сегмент, и в то же время являющиеся достаточно гомологичными исходной последовательности, чтобы сохранить функциональность исходной последовательности. Настоящее изобретение включает аминокислотные последовательности, которые являются по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходными или идентичными исходной аминокислотной последовательности. Степень идентичности между двумя пептидами определяют с помощью компьютерных алгоритмов и способов, широко известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления идентичность двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Антигенные пептиды или белки согласно настоящему изобретению могут быть посттрансляционно модифицированными. Например, посттрансляционные

модификации, подпадающие под объем настоящего изобретения, включают расщепление сигнального пептида, гликозилирование, ацетилирование, изопренилирование, протеолиз, миристоилирование, фолдинг белка и протеолитический процессинг и т. д. Некоторые явления модификации или процессинга требуют введения дополнительных биологических механизмов. Например, явления процессинга, такие как расщепление сигнального пептида и гликозилирование сердцевины, исследуют путем добавления собачьих микросомальных мембран или экстрактов яиц *Xenopus* (патент США № 6103489) к стандартной реакции трансляции. Антигенный пептид или белок согласно настоящему изобретению можно фосфорилировать с использованием обычных способов, таких как способ, описанный Reedijk et al. (*The EMBO Journal* 11(4):1365, 1992).

Антигенные пептиды или белки согласно настоящему изобретению могут включать неприродные аминокислоты, образованные посттрансляционной модификацией или введением неприродных аминокислот во время трансляции. Доступны различные подходы для введения неприродных аминокислот во время трансляции белка.

Антигенный пептид или белок согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с другими молекулами, такими как белки, для получения слитых белков. Это может быть достигнуто, например, путем синтеза N-концевых или C-концевых слитых белков при условии, что полученный слитый белок сохраняет функцию индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа.

Циклические производные пептидов согласно настоящему изобретению также являются частью настоящего изобретения. Циклизация может позволить пептиду принять более благоприятную конформацию для ассоциации с другими молекулами. Циклизация может быть достигнута с использованием методов, известных в данной области техники. Например, дисульфидные связи могут образовываться между двумя соответствующим образом расположенными компонентами, имеющими свободные сульфгидрильные группы, или амидная связь может образовываться между аминогруппой одного компонента и карбоксильной группой другого компонента. Циклизация также может быть достигнута с использованием азобензолсодержащей аминокислоты, как описано Ulysse, L., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 8466-8467. Компоненты, образующие связи, могут представлять собой боковые цепи аминокислот, неаминокислотные

компоненты или их комбинацию. В варианте осуществления настоящего изобретения циклические пептиды могут содержать бета-поворот в правильном положении. Бета-повороты могут быть введены в пептиды согласно настоящему изобретению путем добавления аминокислот Pro-Gly в нужное положение.

5 Может быть необходимо получить циклический пептид, который является более гибким, чем циклические пептиды, содержащие пептидные связи, как описано выше. Более гибкий пептид может быть получен путем введения цистеина в правое и левое положение пептида и образования дисульфидного мостика между двумя цистеинами. Два цистеина расположены так, чтобы не деформировать бета-лист и не поворачиваться. Пептид является более гибким
10 вследствие длины дисульфидной связи и меньшего количества водородных связей в бета-листовой части. Относительную гибкость циклического пептида можно определить с помощью моделирования молекулярной динамики.

Настоящее изобретение также относится к антигенным пептидам, слитым с
15 целевым белком или интегрированным в него, и/или нацеливающему домену, способному направлять химерный белок к желаемому клеточному компоненту, типу клеток или ткани. Химерные белки могут также содержать дополнительные аминокислотные последовательности или домены. Химерные белки являются рекомбинантными в том смысле, что различные компоненты происходят из разных
20 источников и, как таковые, не встречаются вместе в природе (т. е. являются гетерологичными).

В одном варианте осуществления нацеливающий домен может представлять собой трансмембранный домен, мембраносвязывающий домен или последовательность, направляющую связывание белка, например, с везикулами
25 или с ядром. В одном варианте осуществления нацеливающий домен может нацеливать пептид на конкретный тип клеток или ткань. Например, нацеливающий домен может представлять собой лиганд клеточной поверхности или антитело против антигенов клеточной поверхности ткани-мишени. Нацеливающий домен может нацеливать пептид согласно настоящему изобретению на клеточный
30 компонент.

Антигенный пептид согласно настоящему изобретению может быть синтезирован обычными способами. Например, пептиды или химерные белки могут быть синтезированы путем химического синтеза с использованием твердофазного синтеза пептидов. В этих способах используются способы

твердофазного синтеза или синтеза в растворе (см., например, J. M. Stewart, and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford Ill. (1984) и G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis Synthesis, Biology* editors E. Gross and J. Meienhofer Vol. 2 Academic Press, New York, 1980, pp. 3-254 для методик твердофазного синтеза; и M Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin 1984, и E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 1, для классического синтеза в растворе). Например, пептид согласно настоящему изобретению может быть синтезирован с использованием твердофазной химии 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc) с прямым включением фосфотреонина в виде производного N-флуоренилметоксикарбонил-O-бензил-L-фосфотреонина.

N-концевые или C-концевые слитые белки, содержащие пептид или химерный белок согласно настоящему изобретению, конъюгированные с другими молекулами, могут быть получены с помощью рекомбинантных методов путем слияния N-конца или C-конца пептида или химерного белка и последовательности выбранного белка или селектируемого маркера с желаемой биологической функцией. Полученные слитые белки содержат антигенный пептид или белок, слитый с выбранным белком или маркерным белком, как описано в настоящем документе. Примеры белков, которые можно использовать для получения слитых белков, включают иммуноглобулины, глутатион-S-трансферазу (GST), гемагглютинин (HA) и укороченный тус.

Пептиды согласно настоящему изобретению могут быть разработаны с использованием системы биологической экспрессии. Использование этих систем позволяет создавать большие библиотеки случайных пептидных последовательностей и проводить скрининг этих библиотек на пептидные последовательности, которые связываются с определенными белками. Библиотеки могут быть получены путем клонирования синтетической ДНК, кодирующей случайные пептидные последовательности, в соответствующие векторы экспрессии (см. Christian et al 1992, *J. Mol. Biol.* 227:711; Devlin et al, 1990 *Science* 249:404; Cwirla et al 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378). Библиотеки также могут быть созданы параллельным синтезом перекрывающихся пептидов (см. патент США № 4708871).

Пептиды и химерные белки согласно настоящему изобретению могут быть превращены в фармацевтические соли путем взаимодействия с неорганическими

кислотами, такими как хлористоводородная кислота, серная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота и т.д., или органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, 5 щавелевая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, салициловая кислота, бензолсульфокислота и толуолсульфокислота.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую 10 антигенный пептид или белок, или их биологически функциональный фрагмент.

Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигенный белок или пептид, может быть получена с использованием любого из многих рекомбинантных способов, известных в данной области техники, таких как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем 15 выделения гена из вектора, о котором известно, что он включает вектор, или путем выделения непосредственно из клеток и тканей, содержащих вектор, с использованием стандартных методов. В качестве альтернативы представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонирован.

Выделенная нуклеиновая кислота может содержать нуклеиновую кислоту 20 любого типа, включая, но не ограничиваясь ими, ДНК и РНК. Например, в одном варианте осуществления композиция содержит выделенную молекулу ДНК, включая, например, выделенную молекулу кДНК, кодирующую антигенный белок или пептид, или их функциональный фрагмент. В одном варианте осуществления композиция содержит выделенную молекулу РНК, кодирующую антигенный белок 25 или пептид, или его функциональный фрагмент.

Молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно модифицировать для улучшения стабильности в сыворотке или в среде для выращивания клеточных культур. Модификации могут быть добавлены для 30 повышения стабильности, функциональности и/или специфичности и для сведения к минимуму иммуностимулирующих свойств молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Например, для повышения стабильности 3'-остатки могут быть стабилизированы против деградации, например, они могут быть выбраны таким образом, чтобы они состояли из пуриновых нуклеотидов, в частности аденозиновых или гуанозиновых нуклеотидов. В качестве альтернативы

допускается замена пиримидиновых нуклеотидов модифицированными аналогами, например замена уридина на 2'-дезокситимидин, и она не влияет на функцию молекулы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере один модифицированный аналог нуклеотида. Например, концы можно стабилизировать путем включения модифицированных аналогов нуклеотидов.

Неограничивающие примеры аналогов нуклеотидов включают рибонуклеотиды с модифицированным сахаром и/или остовом (т.е. включают модификации фосфатно-сахарного остова). Например, фосфодизфирные связи природной РНК могут быть модифицированы для включения по меньшей мере одного из гетероатомов азота или серы. В некоторых рибонуклеотидах с модифицированным остовом фосфоэфирная группа, соединяющаяся с соседними рибонуклеотидами, заменена модифицированной группой, например фосфотиоатной группой. В некоторых рибонуклеотидах с модифицированным сахаром 2'-ОН-группа заменена группой, выбранной из H, OR, R, галогена, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или ON, где R представляет собой C₁-C₆ алкил, алкенил или алкинил, и галоген представляет собой F, Cl, Br или I.

Другими примерами модификаций являются рибонуклеотиды с модифицированным азотистым основанием, т.е. рибонуклеотиды, содержащие по меньшей мере одно не встречающееся в природе азотистое основание вместо природного азотистого основания. Основания могут быть модифицированы для блокирования активности аденозиндезаминазы. Примеры модифицированных азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, уридин и/или цитидин, модифицированные в положении 5, например, 5-(2-амино)пропилуридин, 5-бромуридин; аденозин и/или гуанозины, модифицированные в положении 8, например, 8-бромгуанозин; деазануклеотиды, например, 7-деаза-аденозин; подходящими являются О- и N-алкилированные нуклеотиды, например, N6-метиладенозин. Следует отметить, что вышеуказанные модификации могут быть объединены.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну из следующих химических модификаций: 2'-H, 2'-О-метил или 2'-ОН модификация одного или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему

изобретению может обладать повышенной устойчивостью к нуклеазам. Для повышения устойчивости к нуклеазам молекула нуклеиновой кислоты может включать, например, 2'-модифицированные звенья рибозы и/или тиофосфатные связи. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована или
 5 заменена рядом различных «окси» или «дезоксид» заместителей. Для повышения устойчивости к нуклеазам молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут включать 2'-О-метил, 2'-фтор, 2'-О-метоксиэтил, 2'-О-аминопропил, 2'-амино и/или тиофосфатные связи. Включение закрытых нуклеиновых кислот (LNA), нуклеиновых кислот с этиленовым мостиком (ENA),
 10 например, нуклеиновых кислот с 2'-4'-этиленовым мостиком, и определенных модификаций азотистых оснований, таких как 2-амино-А, 2-тио (например, 2-тио-У), модификации G-зажима, также могут повышать аффинность связывания с мишенью.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает
 15 2'-модифицированный нуклеотид, например, 2'-дезоксид, 2'-дезоксид-2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЭ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АП), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-ДМАОЭ), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-ДМАП), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE) или 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA). В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает
 20 по меньшей мере один нуклеотид, модифицированный 2'-О-метилом, а в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды молекулы нуклеиновой кислоты включают 2'-О-метил-модификацию.

Агенты нуклеиновой кислоты, обсуждаемые в настоящем документе, включают немодифицированные РНК и ДНК, а также РНК и ДНК, которые были
 25 модифицированы, например, для повышения эффективности, и полимеры заменителей нуклеозидов. Немодифицированная РНК относится к молекуле, в которой компоненты нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные фрагменты, являются такими же или практически такими же, как те, которые встречаются в природе, например, те, которые естественным образом
 30 встречаются в организме человека. В данной области техники редкие или необычные, но встречающиеся в природе РНК, называются модифицированными РНК, см., Limbach et al. (Nucleic Acids Res., 1994, 22:2183-2196). Такие редкие или необычные РНК, часто называемые модифицированными РНК, обычно являются результатом посттранскрипционной модификации и подпадают под термин

немодифицированная РНК, используемый в настоящем документе. Модифицированная РНК, используемая в настоящем документе, относится к молекуле, в которой один или более компонентов нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные фрагменты, отличаются от тех, которые
5 встречаются в природе, например, отличаются от тех, которые встречаются в организме человека. Хотя их называют «модифицированными РНК», они, конечно, из-за модификации будут включать молекулы, которые, строго говоря, не являются РНК. Заменители нуклеозидов представляют собой молекулы, в которых рибофосфатный остов заменен нерибофосфатной конструкцией, которая
10 позволяет основаниям быть представленными в правильном пространственном отношении, так что гибридизация по существу аналогична тому, что наблюдается с рибофосфатным остовом, например, незаряженные миметики рибофосфатного остова.

Модификации нуклеиновой кислоты по изобретению могут присутствовать в
15 одном или нескольких из следующих элементов: фосфатной группе, сахарной группе, скелету, N-концу, C-концу или азотистому основанию.

Настоящее изобретение также включает вектор, в который встроена выделенная нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению. В настоящем уровне техники в достаточном количестве имеются подходящие
20 векторы, применимые в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антигенный белок или пептид, обычно достигается путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный белок или пептид или их части, с промотором и
25 включения конструкции в вектор экспрессии. Используемые векторы подходят для репликации и, необязательно, интеграции в эукариотические клетки. Типичные векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, подходящие для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

30 Векторы согласно настоящему изобретению можно также использовать для иммунизации нуклеиновыми кислотами и генной терапии с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5399346, 5580859, 5589466, включенные в настоящий документ посредством ссылки во всей своей

полноте. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложен вектор для генной терапии.

Выделенная нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может быть клонирована в векторах ряда типов. Например, нуклеиновая кислота
5 может быть клонирована в вектор, включающий, но не ограничивающийся ими, плазмиду, фагмид, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования.

Кроме того, вектор может быть введен в клетку в виде вирусного вектора.
10 Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al. (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы,
15 аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или более селектируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США , № 6326193).

20 Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд основанных на вирусах систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно встроить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с использованием методов, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и
25 доставить в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используются аденовирусные векторы. В данной области техники известен ряд аденовирусных векторов. В одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

30 Например, векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество перед векторами, полученными из

онкоретровирусов, таких как вирусы мышинного лейкоза, в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также имеют дополнительное преимущество низкой иммуногенности. В одном варианте осуществления композиция включает вектор, полученный из

5 аденоассоциированного вируса (AAV). Аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы стали мощными средствами доставки генов для лечения различных заболеваний. Векторы AAV обладают рядом характеристик, которые делают их идеально подходящими для генной терапии, включая отсутствие патогенности, минимальную иммуногенность и способность трансдуцировать постмитотические

10 клетки стабильным и эффективным образом. Экспрессию определенного гена, содержащегося в векторе AAV, можно специфически направить на один или более типов клеток путем выбора соответствующей комбинации серотипа AAV, промотора и способа доставки.

В некоторых вариантах осуществления вектор также включает обычные

15 регуляторные элементы, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, который обеспечивает его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, полученным согласно настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин «функционально связанные» последовательности включает как

20 последовательности контроля экспрессии, которые примыкают к представляющему интерес гену, так и последовательности контроля экспрессии, которые действуют в транс положении или на расстоянии для контроля представляющего интерес гена. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации

25 транскрипции, промоторы и энхансеры; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигнальные последовательности сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (например, консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие

30 стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. Большое количество последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцируемыми и/или тканеспецифичными, известны в данной области техники и могут быть использованы.

Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области 30-110 п.н. выше стартового сайта, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже стартового сайта. Расстояние между элементами промотора часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются друг относительно друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между элементами промотора может быть увеличено до 50 п.н., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо, чтобы активировать транскрипцию.

Одним из примеров подходящего промотора является последовательность промотора непосредственно раннего цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную обеспечивать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Другим примером подходящего промотора является фактор роста элонгации -1 α (EF-1 α). Однако также могут быть использованы другие конститутивные промоторные последовательности, включая, помимо прочего, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), MoMuLV промотор, промотор вируса птичьего лейкоза, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, настоящее изобретение не должно ограничиваться применением конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он оперативно связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

Энхансерные последовательности, обнаруженные в векторе, также регулируют экспрессию содержащегося в нем гена. Как правило, энхансеры связаны с белковыми факторами для усиления транскрипции гена. Энхансеры могут располагаться выше или ниже относительно гена, который они регулируют.

- 5 Энхансеры также могут быть тканеспецифичными для усиления транскрипции в конкретном типе клеток или тканей. В одном варианте осуществления вектор согласно настоящему изобретению содержит один или более энхансеров для усиления транскрипции гена, присутствующего в векторе.

- 10 Чтобы оценить экспрессию антигенного белка или пептида, вектор экспрессии, который должен быть введен в клетку, может также содержать либо селектируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо и то, и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции
- 15 искомым клеток для трансфекции или инфицирования через вирусные векторы. В других аспектах селектируемый маркер может быть нанесен на отдельный фрагмент ДНК и использован в процедуре котрансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Подходящие селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т.п.

- 20 Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется
- 25 некоторым легко обнаруживаемым свойством, например, ферментативной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого
- 30 флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методик или получены коммерческим путем. Как правило, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена,

идентифицируется как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки агентов на способность модулировать управляемую промотором транскрипцию.

5 Способы введения и экспрессии генов в клетку известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии вектор можно легко ввести в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии можно переносить в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими средствами.

10 Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). В одном варианте осуществления способ введения полинуклеотида в клетку-хозяина представляет собой трансфекцию фосфатом кальция.

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом встраивания генов в клетки млекопитающих, например, человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, патент США №№ 5350674 и 5585362.

25 Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают системы коллоидной дисперсии, такие как комплексы макромолекул, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типовой коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, везикула с искусственной мембраной).

В случае, когда используется невирусная система доставки, типичным средством доставки является липосома. Предполагается использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом.

Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водной среде липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме с помощью связывающей молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена липосомой, быть в комплексе с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, в комбинации с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или входить в комплекс с мицеллой или быть иным образом связанной с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислойной структуре, в виде мицелл или в «свернутой» структуре. Они также могут быть просто перемешаны в растворе, возможно, образуя агрегаты, неоднородные по размеру или форме. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут представлять собой природные или синтетические липиды. Например, липиды включают жирные капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, содержащих длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

Липиды, подходящие для использования, могут быть получены из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») может быть получен от Sigma, Сент-Луис, Миссури; дицетилфосфат ("DCP") может быть получен от K&K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") может быть получен от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды могут быть получены от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре примерно -20°C. Хлороформ используется как единственный растворитель, так как он легче испаряется, чем метанол. «Липосома» является общим термином, охватывающим множество однослойных и многослойных липидных носителей, образованных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать как имеющие везикулярные структуры с двухслойной фосфолипидной мембраной и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно при суспендировании фосфолипидов в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются

самоперестройке перед образованием замкнутых структур и захватом воды и растворенных веществ между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). Однако также охватываются композиции, структура которых в растворе отличается от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также рассматриваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить различные анализы. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как Саузерн- и Нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия определенного пептида, например, с помощью иммунологических средств (ELISA и вестерн-блоттинга) или анализов, описанных в настоящем документе, для идентификации агентов, подпадающих под объем изобретения.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено средство доставки, содержащее антигенный белок или пептид, или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенный белок или пептид. Примеры средств доставки включают, но не ограничиваются ими, микросферы, микрочастицы, наночастицы, полимеросомы, липосомы и мицеллы. Например, в некоторых вариантах осуществления средство доставки загружено антигенным белком или пептидом или молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенный белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления средство доставки обеспечивает контролируемое высвобождение, отсроченное высвобождение или постоянное высвобождение загруженного груза. В некоторых вариантах осуществления средство доставки содержит нацеливающую группу, которая направляет средство доставки в место лечения.

В конкретных вариантах осуществления иммуногенный агент содержит или кодирует весь или часть любого антигена, описанного в настоящем документе, или его иммунологически функциональный эквивалент. В других вариантах осуществления иммуногенный агент находится в смеси, которая содержит дополнительный иммуностимулирующий агент или нуклеиновые кислоты,

кодирующие такой агент. Иммуностимулирующие агенты включают, но не ограничиваются ими, дополнительный антиген, иммуномодулятор, антигенпрезентирующую клетку или адъювант. В других вариантах осуществления один или более дополнительных агентов ковалентно связаны с антигеном или

5 иммуностимулирующим агентом в любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления иммуногенный агент конъюгирован с аминокислотами с якорным мотивом HLA или содержит их. В некоторых случаях иммуногенный агент согласно настоящему изобретению может быть использован для индукции антиген-специфического иммунного ответа, включая продукцию CD4 Т-клеток памяти у

10 субъекта.

Вакцина согласно настоящему изобретению может различаться по своему составу пептидов, нуклеиновых кислот и/или клеточных компонентов. В неограничивающем примере антиген может быть также приготовлен с адъювантом. Конечно, следует понимать, что различные композиции, описанные в

15 настоящем документе, могут дополнительно содержать дополнительные компоненты. Например, один или более компонентов вакцины могут содержаться в виде липида или липосомы. В другом неограничивающем примере вакцина может содержать один или более адъювантов. Вакцина согласно настоящему изобретению и ее различные компоненты могут быть приготовлены и/или введены

20 любым способом, раскрытым в настоящем документе, или способом, известным специалисту в данной области техники, в свете настоящего раскрытия.

Примеры адъювантов включают, но не ограничиваются ими, PAMP, DAMP, альфа-интерферон, гамма-интерферон, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), кожные Т-клетки,

25 привлекающие хемокин (CTACK), эпителиальный тимус-экспрессируемый хемокин (TECK), эпителиальный хемокин, ассоциированный со слизистыми оболочками (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, включая IL-15 с делетированной сигнальной последовательностью и, необязательно, включающий сигнальную последовательность пептид из IgE. Другие гены, которые могут быть подходящими

30 адъювантами, включают гены, кодирующие: MCP-I, MIP-Ia, MIP-Ip, IL-8, RANTES, L-селектин, Р-селектин, Е-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-I, VLA-I, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-I, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas,

рецептор TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-I, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспаза ICE, Fos, c-jun, Sp-I, Ap-I, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, Inactive NIK, SAP K, SAP-I, JNK, гены ответа на интерферон, NFκB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4,
 5 RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP 1, TAP2, анти-CTLA4-sc, анти-LAG3-Ig, анти-TIM3-Ig и их функциональные фрагменты.

В одном варианте осуществления пептидная вакцина согласно настоящему изобретению включает, но не ограничивается ими, пептид, смешанный с
 10 адъювантными веществами, и пептид, который вводят вместе с АПК. Наиболее распространенными клетками, используемыми для последнего типа вакцины, являются дендритные клетки, полученные из костного мозга и периферической крови, поскольку эти клетки экспрессируют костимулирующие молекулы, которые способствуют активации Т-клеток. В WO 00/06723 раскрыта композиция клеточной
 15 вакцины, которая включает АПК презентующие антигенные пептиды, ассоциированные с опухолью. Презентация пептида может быть осуществлена путем загрузки АПК полинуклеотидом (например, ДНК, РНК и т.д.), кодирующим пептид, или путем загрузки АПК самим пептидом.

Когда иммуногенный агент индуцирует иммунный ответ против патогена
 20 при инокуляции животному, считается, что иммуногенный агент обладает эффектом, индуцирующим иммунитет против патогена. Патоген-специфический иммунный ответ можно обнаружить, наблюдая *in vivo* или *in vitro* реакцию иммунной системы хозяина на пептид.

Например, хорошо известен способ обнаружения индукции цитотоксических
 25 Т-лимфоцитов. Чужеродное вещество, попадающее в живой организм, под действием АПК презентуется Т- и В-клеткам. Т-клетки, которые реагируют на антиген, представленный АПК, антиген-специфическим образом дифференцируются в цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами или ЦТЛ), благодаря стимуляции антигеном.
 30 Эти стимулированные антигеном клетки затем пролиферируют. Этот процесс упоминается в настоящем документе как «активация» Т-клеток. Таким образом, индукция ЦТЛ определенным пептидом или комбинацией пептидов согласно настоящему изобретению может быть оценена путем презентации пептида Т-

клетке с помощью APC и определения индукции ЦТЛ. Кроме того, АПК активируют CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, макрофаги, эозинофилы и NK-клетки.

Способ оценки индуцирующего действия ЦТЛ с использованием дендритных клеток (ДК) в качестве АПК хорошо известен в данной области техники. ДК представляет собой репрезентативную АПК, обладающую самым 5 сильным индуцирующим ЦТЛ действием среди АПК. В этом способе пептид или комбинацию пептидов сначала приводят в контакт с ДК, а затем эту ДК приводят в контакт с Т-клетками. Обнаружение Т-клеток, оказывающих цитотоксическое действие на представляющие интерес клетки после контакта с ДК, показывает, что 10 пептид или комбинация пептидов обладают активностью индукции цитотоксических Т-клеток. Кроме того, индуцированный иммунный ответ также можно исследовать путем измерения IFN-гамма, продуцируемого и высвобождаемого ЦТЛ в присутствии антигенпрезентирующих клеток, несущих иммобилизованный пептид или комбинацию пептидов, путем визуализации с 15 использованием антител против IFN-гамма, таких как ELISPOT анализ.

Помимо ДК, в качестве АПК могут также использоваться моноклеарные клетки периферической крови (PBMC). Сообщается, что индукция ЦТЛ усиливается при культивировании PBMC в присутствии GM-CSF и IL-4. Точно так же было показано, что ЦТЛ индуцируется культивированием PBMC в присутствии 20 гемоцианина лимфы улитки (KLH) и IL-7.

Индукция патоген-специфического иммунного ответа может быть дополнительно подтверждена путем наблюдения индукции выработки антител против конкретного патогена. В одном варианте осуществления индукция патоген-специфического иммунного ответа может быть дополнительно подтверждена 25 путем наблюдения активации и продукции CD4 Т-клеток памяти.

Терапевтический агент

В одном варианте осуществления композиция содержит терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает 30 пептид, молекулу нуклеиновой кислоты, малую молекулу, антитело и т.п. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент предназначен для лечения заболевания или инфекции головного или спинного мозга. Например, в некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, которые связываются с патогеном или антигеном

патогена. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, которые связываются с опухолеспецифическим антигеном или опухолеассоциированным антигеном. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, которые связываются с антигеном, ассоциированным с неврологическим заболеванием.

В одном варианте осуществления терапевтический агент включает ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления комбинация антигена и антитела иммунной контрольной точки индуцирует иммунную систему более эффективно, чем иммуногенная композиция, содержащая только антиген. Этот более эффективный иммунный ответ обеспечивает повышенную эффективность лечения и/или предотвращения любого заболевания, в частности рака, или заболевания, вызванного патогеном, таким как вирус. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки ингибирует по меньшей мере один из PD-1, PDL-1 CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT и CEACAM1. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек, которые можно использовать в композициях и способах согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, атезолизумаб, BMS-986016, BMS-936559, MPDL3280A, MDX1105-01, MEDI4736, TSR-022, CM-24 и MK-3475.

В одном варианте осуществления терапевтический агент включает терапевтическое антитело или фрагмент антитела. Терапевтическое антитело или фрагмент антитела включает любое известное в данной области техники антитело, которое связывает патоген, вызывает уничтожение патогена, уменьшает патогенную инфекцию или предотвращает распространение патогенной инфекции. Терапевтическое антитело или фрагмент антитела включает любое известное в данной области техники антитело, которое связывается с опухолевой клеткой, индуцирует уничтожение опухолевой клетки или предотвращает пролиферацию или метастазирование опухолевой клетки. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент включает Т-клетку, которая была модифицирована для экспрессии антитела или фрагмента антитела (например, Т-клетка с химерным антигенным рецептором, антитела, взаимодействующие с биспецифическими Т-клетками, и другие формы). В одном варианте осуществления терапевтический агент включает конъюгат антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое антитело или фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, что и иммуногенный агент. В некоторых вариантах осуществления антиген, с которым связывается терапевтическое антитело или фрагмент антитела, отличается от антигена иммуногенного агента. В некоторых вариантах осуществления антиген, с которым связывается терапевтический агент, и антиген иммуногенного агента связаны с одним и тем же заболеванием, нарушением или инфекцией.

Способы получения и применения антител хорошо известны в данной области техники. Например, поликлональные антитела, применимые в настоящем изобретении, получают путем иммунизации кроликов в соответствии со стандартными иммунологическими методиками, хорошо известными в данной области техники (см., например, Harlow et al., 1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY). Такие методики включают иммунизацию животного химерным белком, содержащим часть другого белка, такого как мальтозосвязывающий белок или часть полипептида с меткой глутатиона (GSH), и/или фрагмент, придающий представляющему интерес антигенному белку иммуногенность (например, представляющий интерес антиген, конъюгированный с гемоцианином лимфы улитки, KLH), и часть, содержащую аминокислотные остатки соответствующего антигенного белка. Химерные белки получают путем клонирования соответствующих нуклеиновых кислот, кодирующих маркерный белок, в плазмидный вектор, подходящий для этой цели, такой как, но не ограничиваясь этим, pMAL-2 или pCMX.

Однако настоящее изобретение не следует рассматривать как ограниченное исключительно способами и композициями, включающими эти антитела или эти части антигенов. Скорее, настоящее изобретение должно быть истолковано как включающее другие антитела, как этот термин определен в настоящем документе, к антигенам или их частям. Кроме того, настоящее изобретение следует рассматривать как охватывающее антитела, среди прочего, связывающиеся со специфическими представляющими интерес антигенами, и они способны связывать антиген, присутствующий на Вестерн-блоттинге, в растворе в иммуноферментных анализах, при сортировке флуоресцентно-активированных клеток (FACS), например, в анализах сортировки магнитно-активированных клеток (MACS) и в иммунофлуоресцентной микроскопии клеток, временно

трансфицированных нуклеиновой кислотой, кодирующей по меньшей мере часть антигенного белка.

5 Специалисту в данной области техники должно быть понятно, на основании раскрытия, представленного в настоящем документе, что антитело может специфически связываться с любой частью антигена, и полноразмерный белок может быть использован для получения специфичных к нему антител. Однако настоящее изобретение не ограничивается использованием полноразмерного белка в качестве иммуногена. Скорее, настоящее изобретение включает использование иммуногенной части белка для получения антитела, которое 10 специфически связывается со специфическим антигеном. То есть настоящее изобретение включает иммунизацию животного с использованием иммуногенной части или антигенной детерминанты антигена.

После получения последовательности представляющего интерес специфичного антигена и детального анализа локализации различных консервативных и неконсервативных доменов белка специалисту в данной 15 области техники будет понятно на основании представленного здесь раскрытия, как получить антитела, специфичные для различных частей антигена с использованием способов, хорошо известных в данной области техники или еще не разработанных.

20 Специалисту в данной области техники будет понятно, на основании представленного здесь раскрытия, что настоящее изобретение включает использование одного антитела, распознающего один антигенный эпитоп, но что изобретение не ограничивается применением одного антитела. Вместо этого настоящее изобретение охватывает применение по меньшей мере одного антитела, где антитела могут быть направлены на одинаковые или разные 25 эпитопы антигенного белка.

Получение поликлональных антител осуществляют путем инокуляции желаемому животному антигена и выделения из него антител, которые специфически связывают антиген, с использованием стандартных способов 30 получения антител, таких как описанные, например, в Harlow et al. (1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

Моноклональные антитела, направленные против полноразмерных или пептидных фрагментов белка или пептида, могут быть получены с использованием любых хорошо известных процедур получения моноклональных антител, таких как

описанные, например, в Harlow et al. (1988, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY) и в Tuszynski et al. (1988, Blood, 72:109-115). Определенные количества желаемого пептида также могут быть синтезированы с использованием технологии химического синтеза. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующая желаемый пептид, может быть клонирована и экспрессирована с соответствующей промоторной последовательности в клетках, подходящих для получения больших количеств пептида. Моноклональные антитела, направленные против пептида, получают от мышей, иммунизированных пептидом, с использованием стандартных процедур, указанных в настоящем документе.

Нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело, полученное с использованием описанных в настоящем документе процедур, может быть клонирована и секвенирована с использованием технологии, доступной в данной области техники, и описанной, например, в Wright et al. (1992, Critical Rev. Immunol. 12:125-168) и цитируемых там ссылках. Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению может быть «гуманизировано» с использованием технологии, описанной, например, в Wright et al. и в цитируемых там ссылках, а также в Gu et al. (1997, Thrombosis and Hematocyst 77:755-759), и других способов гуманизации антител, хорошо известных в данной области техники или находящихся в стадии разработки.

Настоящее изобретение также включает применение гуманизированных антител, специфически реагирующих с эпитопами представляющего интерес антигена. Гуманизированные антитела согласно настоящему изобретению имеют каркас человека и одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) антитела, обычно мышиного антитела, специфически реагирующего с представляющим интерес антигеном. Когда антитело, используемое в настоящем изобретении, является гуманизированным, антитело может быть получено, как описано в Queen, et al. (U.S. Patent No. 6, 180,370), Wright et al., (supra) and in the references cited therein, or in Gu et al. (1997, Thrombosis and Hematocyst 77(4):755-759). Способ, описанный в Queen et al. частично направлен на создание гуманизированных иммуноглобулинов, которые продуцируются путем экспрессии сегментов рекомбинантной ДНК, кодирующих определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепей (CDR), из донорного иммуноглобулина, способного связываться с желаемым антигеном, таким как эпитоп на представляющем интерес антигене, присоединенного к сегментам ДНК,

кодирующим акцепторные каркасные области человека. В целом говоря, изобретение в патенте Queen применимо для создания практически любого гуманизированного иммуноглобулина. Queen объясняет, что сегменты ДНК, как правило, будут включать последовательность ДНК, контролирующую экспрессию, функционально связанную с последовательностями, кодирующими гуманизированный иммуноглобулин, включая природные или гетерологичные промоторные области. Последовательности контроля экспрессии могут представлять собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева, или последовательности контроля экспрессии могут представлять собой прокариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать прокариотические клетки-хозяева. После включения вектора в соответствующего хозяина этого хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии введенных нуклеотидных последовательностей и, при желании, для сбора и очистки гуманизированных легких цепей, тяжелых цепей, димеров легких/тяжелых цепей или интактных антител могут следовать антитела, связывающие фрагменты или другие формы иммуноглобулина (Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, (1979), которая включена в настоящий документ в качестве ссылки).

Настоящее изобретение также включает функциональные эквиваленты описанных в настоящем документе антител. Функциональные эквиваленты имеют характеристики связывания, сравнимые с характеристиками антител, и включают, например, гибридные и одноцепочечные антитела, а также их фрагменты. Способы получения таких функциональных эквивалентов раскрыты в заявке PCT WO 93/21319 и заявке PCT WO 89/09622.

Функциональные эквиваленты включают полипептиды с последовательностями аминокислот, практически такими же, как последовательности аминокислот переменных или гиперпеременных областей антител. «По существу такая же» аминокислотная последовательность определяется в настоящем документе как последовательность, имеющая по меньшей мере 70 %, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или по меньшей мере 99% гомологии с другой аминокислотной последовательностью (или любое целое число от 70 до 99), как определено методом поиска FASTA в соответствии с Pearson and Lipman,

1988 *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444-2448. Химерные или другие гибридные антитела имеют константные области, происходящие в значительной степени или исключительно из константных областей человеческого антитела, и переменные области, происходящие в основном или исключительно из последовательности переменной области моноклонального антитела из каждой стабильной гибридомы.

Одноцепочечные антитела (scFv) или фрагменты Fv представляют собой полипептиды, состоящие из переменной области тяжелой цепи антитела, связанной с переменной областью легкой цепи, с соединительным линкером или без него. Таким образом, Fv содержит сайт связывания антитела.

Функциональные эквиваленты антител согласно настоящему изобретению дополнительно включают фрагменты антител, которые имеют такие же или практически такие же характеристики связывания, что и целое антитело. Такие фрагменты могут содержать один или оба фрагмента Fab или фрагмент $F(ab')_2$. Фрагменты антител содержат все шесть определяющих комплемент областей всего антитела, хотя фрагменты, содержащие меньшее количество таких областей, например, три, четыре или пять определяющих комплемент областей, также являются функциональными. Функциональные эквиваленты являются членами класса иммуноглобулинов IgG и их подклассов, но могут быть или могут сочетаться с любым из следующих классов иммуноглобулинов: IgM, IgA, IgD или IgE и их подклассами. Тяжелые цепи различных подклассов, таких как подклассы IgG, отвечают за различные эффекторные функции, и, таким образом, путем выбора нужной константной области тяжелой цепи получают гибридные антитела с желаемой эффекторной функцией. Примерами константных областей являются гамма 1 (IgG1), гамма 2 (IgG2), гамма 3 (IgG3) и гамма 4 (IgG4). Константная область легкой цепи может быть каппа- или лямбда-типа.

Иммуноглобулины согласно настоящему изобретению могут быть моновалентными, двухвалентными или поливалентными. Моновалентные иммуноглобулины представляют собой димеры (HL), образованные гибридной тяжелой цепью, связанной через дисульфидные мостики с гибридной легкой цепью. Двухвалентные иммуноглобулины представляют собой тетрамеры (H_2L_2), образованные из двух димеров, связанных по меньшей мере одним дисульфидным мостиком.

Способы

В настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения инфекции, заболевания или нарушения головного мозга, центральной нервной системы или спинного мозга. Терапевтические соединения или композиции
5 согласно настоящему изобретению можно вводить профилактически или терапевтически субъектам, страдающим или подверженным риску (или подверженным) развитию заболевания или нарушения. Такие субъекты могут быть идентифицированы с использованием стандартных клинических методов. В контексте настоящего изобретения профилактическое введение осуществляется
10 до проявления явных клинических симптомов, так что инфекцию предотвращают или, в качестве альтернативы, задерживают ее прогрессирование. В контексте области медицины термин «предотвращать» охватывает любую деятельность, которая снижает бремя смертности или заболеваемости от заболевания или нарушения. Предотвращение может осуществляться на первичном, вторичном и
15 третичном уровнях предотвращения. В то время как первичное предотвращение позволяет избежать развития заболевания, вторичный и третичный уровни предотвращения охватывают мероприятия, направленные на предотвращение прогрессирования инфекции и появления симптомов, а также снижение негативного воздействия уже развившегося заболевания путем восстановления
20 функции и уменьшения заболеваемости или осложнений, связанных с нарушением.

В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту композиции, содержащей иммуногенный агент (например, антигенный белок или пептид), как описано в других разделах настоящего документа. В одном варианте
25 осуществления композиция содержит адъювант. Адъювант относится к соединению, которое усиливает иммунный ответ против пептида или комбинации пептидов при совместном (или последовательном) введении с пептидом, обладающим иммунологической активностью. Примеры подходящих адъювантов включают холерный токсин, токсин сальмонеллы, квасцы и т.п., но не
30 ограничиваются ими. Кроме того, вакцину согласно настоящему изобретению можно надлежащим образом комбинировать с фармацевтически приемлемым носителем. Примерами таких носителей являются стерилизованная вода, физиологический раствор, фосфатный буфер, культуральная жидкость и т.п. Кроме того, при необходимости вакцина может содержать стабилизаторы,

сuspензии, консерванты, поверхностно-активные вещества и т.п. Вакцину вводят системно или местно. Введение вакцины может быть осуществлено однократным введением или усилено многократными введениями.

В одном варианте осуществления антигенные белки или пептиды согласно
5 настоящему изобретению используют в способе *ex vivo* для получения клеток согласно настоящему изобретению (например, антигенпрезентирующих клеток с пептидной загрузкой или пептид-специфических IFN γ -секретирующих CD4⁺ Т-клеток). В одном варианте осуществления заболевание или нарушение можно лечить или предотвращать, например, путем введения клеток согласно
10 настоящему изобретению. Например, РВМС субъекта, получающего лечение или профилактику, собирают, приводят в контакт *ex vivo* с антигеном или нуклеиновой кислотой, кодирующей антиген. После индукции антигенпрезентирующих клеток с пептидной загрузкой или пептид-специфических IFN γ -секретирующих CD4⁺ Т-клеток эти клетки можно вводить субъекту. Клетки можно индуцировать введением
15 в них вектора, кодирующего пептид или комбинацию пептидов *ex vivo*. Клетки, индуцированные *in vitro*, можно клонировать перед введением. Путем клонирования и выращивания клеток, обладающих высокой активностью повреждения клеток-мишеней, клеточную иммунотерапию можно проводить более эффективно. Кроме того, клетки согласно настоящему изобретению, выделенные
20 таким образом, могут быть использованы для клеточной иммунотерапии не только против индивидуумов, от которых получены клетки, но также против сходных типов заболеваний у других индивидуумов.

В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту ингибитора иммунной контрольной точки, как описано в другом месте настоящего
25 документа. Например, в одном варианте осуществления способ включает введение антитела или фрагмента антитела, которое связывается с белком иммунной контрольной точки.

В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту терапевтического агента, как описано в другом месте настоящего документа.
30 Например, в одном варианте осуществления способ включает введение терапевтического антитела или фрагмента антитела, которое связывается с антигеном.

Различные агенты можно вводить субъекту в любом порядке и с любым подходящим интервалом. Например, в некоторых вариантах осуществления два

или более иммуногенных агента, ингибитора иммунной контрольной точки и терапевтического агента вводят одновременно или почти одновременно. В некоторых вариантах осуществления способ включает поэтапное введение агентов, при котором вводят иммуногенный агент, и по меньшей мере один из ингибитора иммунной контрольной точки и терапевтического агента вводят в какой-то более поздний момент времени. В некоторых вариантах осуществления способ включает поэтапное введение агентов, при котором вводят по меньшей мере один из ингибитора ключевой точки иммунного ответа и терапевтического агента, а иммуногенный агент вводят в какой-то более поздний момент времени. Можно использовать любой подходящий интервал введения, обеспечивающий желаемый терапевтический эффект.

Способ согласно настоящему изобретению может быть использован для лечения любой патогенной инфекции головного мозга, ЦНС или спинного мозга. Например, способ можно применять для лечения или предотвращения инфекций, вызванных вирусом, грибом, простейшим, паразитом, членистоногим, прионом, микобактерией или бактерией, включая бактерию, у которой развилась устойчивость к одному или более антибиотиков. Примеры вирусных инфекций, которые лечат или предотвращают с помощью настоящего способа, включают, но не ограничиваются ими, инфекции, вызванные вирусом Зика, вирусом Эбола, вирусом японского энцефалита, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом бешенства, вирусом ветряной оспы, вирусом Эпштейна-Барра (HHV-4), цитомегаловирусом, вирусом простого герпеса 1 (HSV-1) и вирусом простого герпеса 2 (HSV-2), вирусом иммунодефицита человека-1 (ВИЧ-1), вирусом JC, арборвирусами, энтеровирусами и вирусом Западного Нила, вирусом денге, полиовирусом и вирусом ветряной оспы. Примеры бактериальных инфекций, которые лечат или предотвращают с помощью настоящего способа, включают, но не ограничиваются ими, инфекции, вызванные *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* и *Escherichia coli*. Примеры грибковых или протозойных инфекций, которые лечат или предотвращают с помощью настоящего способа, включают, но не ограничиваются ими, инфекции, вызванные кандидозом, аспергиллезом, криптококкозом и *Toxoplasma gondii*.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения заболевания или нарушения, связанного с инфекцией головного мозга, ЦНС или спинного мозга, включая, но не

ограничиваясь ими, менингит, энцефалит, менингоэнцефалит, эпидуральный абсцесс, субдуральный абсцесс, абсцесс головного мозга, прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию (PML).

Способ согласно настоящему изобретению может быть использован для
5 лечения или предотвращения рака. Этот способ можно применять для уменьшения роста опухоли, пролиферации или метастазирования в головной мозг, ЦНС или спинной мозг. Типичные формы рака, которые лечат или предотвращают с помощью настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими, глиобластому, менингиому, акустическую невриному, астроцитому, хордому,
10 лимфому ЦНС, краниофарингиому, глиому ствола головного мозга, эпендимому, смешанную глиому, глиому зрительного нерва, супертендимому, медуллярную, менингиому, метастатические опухоли головного мозга, олигодендроглиому, опухоли гипофиза, примитивную нейроэктодермальную опухоль, шванному, ювенильную пилоцитарную астроцитому, опухоль шишковидной железы,
15 рабдоидную опухоль, рак позвоночника, опухоли спинного мозга и опухоли головного мозга у детей.

Способ согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или предотвращения неврологического нарушения. Типичные неврологические нарушения, которые лечат или предотвращают посредством настоящего
20 изобретения, включают, но не ограничиваются ими, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, таупатию, лобно-височную деменцию, болезнь Хантингтона, прионную болезнь и генетические заболевания ЦНС, включая, но не ограничиваясь ими, синдром Гурлера.

Лечебные и профилактические способы согласно настоящему изобретению
25 можно применять для лечения или предотвращения заболевания или нарушения головного мозга, ЦНС или спинного мозга у любого нуждающегося в этом субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект включает, но не ограничивается ими, человека и других приматов и млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих, таких как не являющиеся человеком
30 приматы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки, крысы и мыши.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий (1) введение субъекту иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индукции

CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) введение субъекту терапевтического агента для лечения заболевания или нарушения. Способ можно применять для лечения или предотвращения заболевания или нарушения в головном или спинном мозге. Способ можно применять для лечения или предотвращения
5 любого заболевания или нарушения головного или спинного мозга, включая, помимо прочего, патогенную инфекцию, рак и нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения патогенной инфекции у субъекта, включающий введение (1)
10 иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтического агента, антитела или фрагмент антитела, направленного на антиген возбудителя. Способ можно применять для лечения или предотвращения любой патогенной инфекции, включая, но не ограничиваясь ими, вирусную инфекцию, бактериальную
15 инфекцию, грибковую инфекцию, паразитарную инфекцию, глистную инфекцию, протозойную инфекцию, прионную инфекцию и т.п.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения патогенной инфекции у субъекта, включающий введение (1)
20 иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) ингибитора белка иммунной контрольной точки или пути. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент
25 антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного
30 ответа и (2) терапевтического антитела или фрагмента антитела, направленного на антиген, ассоциированный с опухолью.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного

ответа и (2) ингибитора белка иммунной контрольной точки или пути. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ, включающий введение одной или более композиций или агентов, как описано в настоящем документе, субъекту, страдающему заболеванием или нарушением. Например, в одном варианте осуществления способ включает введение одной или более композиций или агентов, как описано в настоящем документе, субъекту, имеющему заболевание или нарушение в головном или спинном мозге.

В одном варианте осуществления субъект имеет патогенную инфекцию, такую как вирусная инфекция, бактериальная инфекция, грибковая инфекция, паразитарная инфекция, глистная инфекция, протозойная инфекция, прионная инфекция и т.п. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтического агента, антитела или фрагмента антитела, направленного против антигена патогена. В одном варианте осуществления способ включает введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 T-клеточного иммунного ответа и (2) ингибитора белка иммунной контрольной точки или пути. В одном варианте осуществления иммуногенный агент включает антигенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно одной из SEQ ID NO: 5-90. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

В одном варианте осуществления субъект имеет неврологическое нарушение, такое как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, таупатия, лобно-височная деменция, болезнь Хантингтона, прионная болезнь и генетические

заболевания ЦНС, включая, но не ограничиваясь ими, синдром Гурлера. В одном варианте осуществления способ включает (1) введение субъекту иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индукции CD4 Т-клеточного иммунного ответа и (2) введение субъекту терапевтического агента для лечения

5 заболевания или нарушения. В одном варианте осуществления иммуногенный агент включает антигенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность согласно одной из SEQ ID NO: 5-90.

В одном варианте осуществления субъект имеет рак или раковую опухоль, включая, но не ограничиваясь ими, глиобластому, менингиому, акустическую

10 невриному, астроцитому, хордому, лимфому ЦНС, краниофарингиому, глиому ствола головного мозга, эпендимому, смешанную глиому, глиому зрительного нерва, суперепендимому, медуллярную глиому, метастатические опухоли головного мозга, олигодендроглиому, опухоли гипофиза, примитивную нейроэктодермальную опухоль, шванному, ювенильную пилоцитарную

15 астроцитому, опухоль шишковидной железы, рабдоидную опухоль, рак позвоночника, опухоли спинного мозга и опухоли головного мозга у детей. В одном варианте осуществления способ включает введение субъекту (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индукции CD4 Т-клеточного иммунного ответа и (2) терапевтического агента, антитела или фрагмента

20 антитела, направленного против антигена, ассоциированного с опухолью. В одном варианте осуществления способ включает введение (1) иммуногенного агента (например, антигенного пептида) для индуцирования CD4 Т-клеточного иммунного ответа и (2) ингибитора белка иммунной контрольной точки или пути. В одном варианте осуществления иммуногенный агент включает антигенный пептид,

25 содержащий аминокислотную последовательность согласно одной из SEQ ID NO: 5-90. В одном варианте осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или фрагмент антитела, нацеленные на один или более белков иммунных контрольных точек. Например, в одном варианте осуществления второй агент представляет собой антитело или фрагмент

30 антитела, которые специфически связываются с PD-1, PDL-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, CEACAM1, TIGIT и т.п.

В некоторых вариантах осуществления способ включает дополнительное введение дополнительного терапевтического агента, включая, помимо прочего,

антибиотик, противовирусный агент, противогрибковый агент и противовоспалительный агент. В одном варианте осуществления антибиотик выбран из амоксициллина, ампициллина, клоксациллина, диклоксациллина, нафциллина, оксациллина, пенициллина G, пенициллина V, пиперациллина, 5 цефадроксила (цефадроксила), цефалексина (цефалексина), цефалотина (цефалотина), цефапирина (цефапирина), цефазолина (цефазолина), цефрадина (цефрадина), цефаклора, цефотетана, цефокситина, цефпрозила (цефпроксила), цефуроксима, цефдинира, цефиксима, цефотаксима, цефподоксима, цефтизоксима, цефтриаксона, цефтазидима, цефепима, цефтобипрола, 10 цефтаролина, азтреонама, имипенема, имипенема, циластатина, дорипенема, меропенема, эртапенема, азитромицина, эритромицина, кларитромицина, диритромицина, рокситромицина, клиндамицина, линкомицина, амикацина, гентамицина, тобрамицина, ципрофлоксацина, левофлоксацина, моксифлоксацина, триметоприма-сульфаметоксазола, доксициклина, 15 тетрациклина, ванкомицина, тейкопланина, телаванцина и линезолида. Примеры противовирусных агентов, которые можно применять со способами согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, абакавир, ацикловир, ацикловир, адефовир, амантадин, ампренавир, амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, балавир, цидофовир, комбивир, долутегравир, дарунавир, 20 делавирдин, диданозин, докозанола, эдоксудин, эфавиренз, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, эколивер, фамцикловир, фомивирсен, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, ганцикловир, ибацитабин, имуновир, идоксуридин, имиквимод, индинавир, инозин, интерферон типа III, интерферон типа II, интерферон типа I, интерферон, ламивудин, лопинавир, ловирид, маравирик, 25 мороксидин, метисазон, нелфинавир, невирапин, нексавир, нитазоксанид, новир, пегинтерферон альфа-2а, пенцикловир, перамивир, плеконарил, подофиллотоксин, ралтегравир, рибавирин, римантадин, ритонавир, пирамидин, саквинавир, софосбувир, ставудин, телапревир, тенофовир, тенофовир дизопроксил, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, 30 валацикловир, валганцикловир, викривирок, видарабин, вирамидин, зальцитабин, занамивир и зидовудин. Неограничивающие примеры противовоспалительных агентов включают нестероидные противовоспалительные средства (НПВП), стероидные противовоспалительные средства, бета-агонисты, антихолинергические средства и метилксантины. Примеры НПВП включают,

помимо прочего, аспирин, ибупрофен, целекоксиб, диклофенак, этодолак, фенопрофен, индометацин, кеторалак, оксапрозин, набументон, сулиндак, толментин, рофекоксиб, напроксен, кетопрофен, набуметон, диклофенак и мизопростол, ибупрофен, кеторолак, вальдекоксиб, мелоксикам, флурбипрофен и пироксикам. Такие НПВП действуют путем ингибирования фермента циклооксигеназы (например, ЦОГ-1 и/или ЦОГ-2). Примеры стероидных противовоспалительных препаратов включают, но не ограничиваются ими, глюкокортикоиды, дексаметазон, кортизон, гидрокортизон, преднизон, преднизолон, триамцинолон, азульфидин и эйкозаноиды, такие как простагландины, тромбоксаны и лейкотриены.

В некоторых вариантах осуществления способ включает дополнительное введение дополнительного метода противоракового лечения, включая, помимо прочего, химиотерапию, облучение, хирургическое вмешательство, гормональную терапию или их комбинацию.

15

Фармацевтическое средство

Таким образом, терапевтические и профилактические способы согласно настоящему изобретению охватывают применение фармацевтических композиций. Фармацевтические композиции, подходящие для осуществления настоящего изобретения, можно вводить для доставки эффективного количества терапевтического агента. Точная вводимая доза будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая, помимо прочего, вводимый терапевтический агент, тип животного и тип болезненного состояния, подвергаемого лечению, возраст животного и способ введения.

Соединение можно вводить животному так часто, как несколько раз в день, или его можно вводить реже, например, один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц или даже реже, например один раз каждые несколько месяцев или даже один раз в год или реже. Частота введения дозы будет очевидна специалисту в данной области техники и будет зависеть от множества факторов, таких как, помимо прочего, тип и тяжесть заболевания, подлежащего лечению, тип и возраст животного и т. д. Составы фармацевтических композиций, описанные в настоящем документе, могут быть приготовлены любым способом, известным или впоследствии разработанным в области фармакологии. Как правило, такие способы подготовки включают стадию связывания активного

ингредиента с носителем или одним или более другими дополнительными ингредиентами, а затем, если это необходимо или желательно, формование или упаковку продукта в желаемую однократную или многократную единицу.

Хотя приведенное в настоящем документе описание фармацевтических композиций в основном направлено на фармацевтические композиции, которые подходят для этического введения людям, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что такие композиции обычно подходят для введения животным всех видов. Модификация фармацевтических композиций, подходящих для введения человеку, с целью сделать композиции подходящих для введения различным животным хорошо изучена, и ветеринарный фармаколог с обычной квалификацией может спроектировать и осуществить такую модификацию с помощью простого, если это возможно, экспериментирования. Субъекты, которым предполагается введение фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, людей и других приматов, млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих, таких как не являющиеся человеком приматы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки и собаки.

Фармацевтические композиции, применимые в способах согласно настоящему изобретению, могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде составов, подходящих для офтальмологического, перорального, ректального, вагинального, парентерального, местного, легочного, интраназального, трансбуккального или другого пути введения. Другие предполагаемые составы включают спроецированные наночастицы, липосомальные препараты, повторно запечатанные эритроциты, содержащие активный ингредиент, и составы на иммунологической основе.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть приготовлена, упакована или продана нерасфасованной, в виде разовой стандартной дозы или в виде множества разовых стандартных доз. Используемый в настоящем документе термин «стандартная доза» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащее заданное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которая будет введена субъекту, или подходящей части такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

Относительные количества активного ингредиента, фармацевтически приемлемого носителя и любых дополнительных ингредиентов в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению будут варьироваться в зависимости от природы, размера и состояния субъекта, подвергающегося лечению, и, кроме того, в зависимости от пути, которым следует вводить композицию. Например, композиция может содержать от 0,1% до 100% (масс./масс.) активного ингредиента.

В дополнение к активному ингредиенту фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать один или более дополнительных фармацевтически активных агентов. Другие активные агенты, применимые при лечении фиброза, включают противовоспалительные средства, включая кортикостероиды, и иммунодепрессанты.

Лекарственные формы фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению с контролируемым или замедленным высвобождением могут быть получены с использованием обычной технологии.

Используемый в настоящем документе термин «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой способ введения, характеризующийся физическим повреждением ткани субъекта и введением фармацевтической композиции через повреждение ткани. Таким образом, парентеральное введение включает, но не ограничивается этим, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, путем нанесения композиции через хирургический разрез, путем нанесения композиции через проникающую в ткань нехирургическую рану и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает интраокулярные, интравитреальные, подкожные, интраперитонеальные, внутримышечные, интратеральные инъекции, внутриопухолевые и почечные диализные инфузии, но не ограничивается ими.

Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, содержат активный ингредиент в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Составы для инъекций могут быть приготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в

ампулах или в многодозовых контейнерах, содержащих консервант. Составы для парентерального введения включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые составы с замедленным высвобождением или биоразлагаемые составы. Такие составы могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном варианте осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент представлен в сухой (т.е. порошковой или гранулированной) форме для восстановления подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники и могут содержать, помимо активного ингредиента, дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, описанные в настоящем документе. Такие стерильные составы для инъекций могут быть приготовлены с использованием нетоксичного парентерально приемлемого разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, но не ограничиваются ими, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды. Другие пригодные для парентерального введения композиции включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме, в липосомальном препарате или в качестве компонента биоразлагаемой полимерной системы. Композиции для пролонгированного высвобождения или имплантации могут содержать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсия, ионообменная смола, умеренно растворимый полимер или умеренно растворимая соль.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть приготовлена, упакована или продана в форме препарата, подходящего для введения в легкие через ротовую полость. Такой препарат может содержать сухие частицы, содержащие активный ингредиент и имеющие диаметр в диапазоне от

примерно 0,5 до примерно 7 нанометров или от примерно 1 до примерно 6 нанометров. Такие композиции обычно имеют форму сухих порошков для введения с помощью устройства, включающего резервуар для сухого порошка, в который может быть направлен поток пропеллента для диспергирования порошка, или с помощью самостоятельно диспергирующего дозирующего контейнера для растворителя/порошка, такого как устройство, содержащее активный ингредиент, растворенный или суспендированный в низкокипящем газе-вытеснителе в герметичном контейнере. В одном варианте осуществления такие порошки содержат частицы, в которых по меньшей мере 98% частиц по массе имеют диаметр более 0,5 нанометров и по меньшей мере 95% частиц по количеству имеют диаметр менее 7 нанометров. В одном варианте осуществления по меньшей мере 95% частиц по массе имеют диаметр более 1 нанометра и по меньшей мере 90% частиц по количеству имеют диаметр менее 6 нанометров. В некоторых случаях сухие порошковые композиции включают твердый разбавитель в виде мелкодисперсного порошка, такой как сахар, и их удобно выпускать в виде стандартной дозированной формы.

Низкокипящие пропелленты обычно включают жидкие пропелленты, имеющие точку кипения ниже 65°F при атмосферном давлении. Как правило, пропеллент может составлять от 50 до 99,9% (масс./масс.) композиции, а активный ингредиент может составлять от 0,1 до 20% (масс./масс.) композиции. Пропеллент может дополнительно содержать дополнительные ингредиенты, такие как жидкое неионогенное или твердое анионогенное поверхностно-активное вещество или твердый разбавитель (в некоторых случаях имеющий размер частиц того же порядка, что и частицы, содержащие активный ингредиент).

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, приготовленные для доставки в легкие, могут также содержать активный ингредиент в форме капель раствора или суспензии. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде водных или разбавленных спиртовых растворов или суспензий, необязательно стерильных, содержащих активный ингредиент, и их можно удобно вводить с помощью любого устройства для пульверизации или распыления. Такие составы могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, ароматизатор, такой как сахарин натрия, летучее масло, буферный агент, поверхностно-активный агент или консервант, такой как

метилгидроксibenзоат. В одном варианте осуществления капли, получаемые этим путем введения, имеют средний диаметр в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 200 нанометров.

5 Составы, описанные в настоящем документе как применимые для легочной доставки, также применимы для интраназальной доставки фармацевтической композиции изобретения.

10 Другой состав, подходящий для интраназального введения, представляет собой крупнодисперсный порошок, содержащий активный ингредиент и имеющий средний размер частиц примерно от 0,2 до 500 микрометров. Такой состав вводят таким же образом, как и нюхательный табак, т.е. путем быстрого вдыхания через

15 носовой ход из контейнера с порошком, поднесенного близко к ноздрям. Составы, подходящие для назального введения, могут, например, содержать от примерно 0,1% (масс./масс.) до 100% (масс./масс.) активного ингредиента и могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе.

20 Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть приготовлена, упакована или продана в виде препарата, подходящего для трансбуккального введения. Такие препараты могут быть, например, в форме таблеток или пастилок, изготовленных с использованием обычных способов, и могут, например, содержать от 0,1 до 20% (масс./масс.) активного ингредиента, остальное включает перорально растворимую или разлагаемую композицию и, необязательно, один или более дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем документе. В качестве альтернативы препараты, подходящие для трансбуккального введения, могут включать порошок или аэрозольный или

25 распыленный раствор или суспензию, содержащую активный ингредиент. В одном варианте осуществления такие порошкообразные, аэрозольные или аэрозольные препараты при диспергировании имеют средний размер частиц или капель в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 200 нанометров и могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, описанных в настоящем

30 документе.

Используемый в настоящем термин «дополнительные ингредиенты» включает, но не ограничивается ими, один или более из следующих элементов: вспомогательные вещества; поверхностно-активные агенты; диспергирующие агенты; инертные разбавители; гранулирующие и разрыхляющие агенты;

связующие агенты; смазывающие агенты; подсластители; ароматизаторы; красители; консерванты; физиологически разлагаемые композиции, такие как желатин; водные среды и растворители; маслянистые среды и растворители; суспендирующие агенты; диспергирующие или смачивающие агенты; 5 эмульгирующие агенты, деэмульгаторы; буферы; соли; загустители; наполнители; эмульгирующие агенты; антиоксиданты; антибиотики; противогрибковые агенты; стабилизирующие агенты; и фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы. Другие «дополнительные ингредиенты», которые могут 10 быть включены в фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, известны в данной области техники и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), который включен в настоящий документ посредством ссылки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

15 Далее настоящее изобретение подробно описано со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры представлены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, настоящее изобретение никоим образом не следует рассматривать как 20 ограниченное следующими примерами, а скорее следует рассматривать как включающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате представленного в настоящем документе руководства.

Без дальнейшего описания считается, что специалист в данной области техники может, используя предыдущее описание и следующие иллюстративные 25 примеры, получить и использовать настоящее изобретение и применять заявленные способы на практике. Следующие рабочие примеры никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие остальную часть изобретения.

Пример 1: CD4 Т-клетки обеспечивают доступ антител к иммунопривилегированным тканям

30 Циркулирующие антитела могут иметь доступ к большинству тканей, чтобы опосредовать контроль и элиминацию вторгшихся патогенов. Иммунопривилегированные ткани, такие как мозг и периферическая нервная система, защищены от белков плазмы гематоэнцефалическим барьером (Hawkins et al., 2005, Pharmacol. Rev. 57, 173–185) и барьером «кровь-нерв» (Weerasuriya, A.

et al., 2011, *Methods Mol. Biol.* 686, 149–173) соответственно. Тем не менее, циркулирующие антитела должны каким-то образом получить доступ к этим тканям, чтобы опосредовать их антимикробные функции.

Неясно, каким образом антитела защищают от патогенов, проникающих в периферические ткани, лишенные конститутивных механизмов транспорта антител. Гематоэнцефалические барьеры, состоящие из плотных контактов между капиллярными эндотелиальными клетками, толстыми базальными мембранами и ножками астроцитов, эффективно блокируют диффузию антител в головной мозг (Weerasuriya, A. et al., 2011, *Methods Mol. Biol.* 686, 149–173), в то время как барьеры «кровь-нерв», состоящие из эндотелия эндоневральных сосудов и периневрия, блокируют доступ антител к периферическим нейронам (Weerasuriya et al., 2011, *Methods Mol Biol* 686, 149-173). Такие барьеры имеют решающее значение для предотвращения доступа аутореактивных антител (Milligan, G. N. et al., *J. Immunol.* 160, 6093–6100). В то же время, поскольку некоторые патогены нацеливаются и реплицируются в иммунопривилегированных участках, должен существовать механизм хозяина, обеспечивающий направленную доставку антител к этим тканям.

Эти результаты демонстрируют роль CD4 Т-клеток в контроле доступа антител к нейрональным тканям посредством локальной миграции и секреции IFN- γ . Циркулирующие CD4 Т-клетки памяти эффективно нацеливают доставку антител к местам заражения за счет секреции ими IFN- γ , предположительно, при распознавании родственных антигенных пептидов, представленных локальными антигенпрезентирующими клетками (Laidlaw, B. J. et al., 2014, *Immunity* 41, 633–645, Iijima, N. et al., 2008, *J. Exp. Med.* 205, 3041–3052). Эти результаты указывают на потребность в помощи CD4 Т-клеток на эффекторной фазе ответа антител, и дополняют растущее распознавание CD4 Т-клеток при подготовке пути к другим типам эффекторных клеток, таким как Т-клетки CD8 (Laidlaw, B. J. et al., 2014, *Immunity* 41, 633–645, Nakanishi, Y. et al., 2009, *Nature* 462, 510–513, Reboldi, A. et al., 2009, *Nature Immunol.* 10, 514–523). Экспериментальные данные демонстрируют, что потребность в CD4 Т-клетках для доступа антител к нейрональной ткани отражает дополнительный уровень контроля, налагаемый иммунопривилегированными сайтами. В доступных тканях воспалительные лейкоциты могут мигрировать, и в ответ на PAMPs секретировать цитокины, такие

как $\text{TNF-}\alpha$, которых достаточно, чтобы вызвать проницаемость сосудов независимо от CD4 T-клеток. Однако ожидается, что после нейротропных вирусных инфекций инфицированные нейроны будут плохо продуцировать воспалительные цитокины, ремоделирующие сосудистые плотные соединения. В то же время рекрутирование врожденных лейкоцитов блокируется отключением специфических хемокинов в ганглиях мышей, инфицированных HSV-1 (Stock, A. et al., 2014, *J. Exp. Med.* **211**, 751–759). Интересно, что экспрессия T-клеточных трофических хемокинов CXCL9 и CXCL10 сохранялась в DRG инфицированных мышей (Stock, A. et al., 2014, *J. Exp. Med.* **211**, 751–759), что позволяет предположить, что доступ лимфоцитов разрешен. Таким образом, в нейрональных тканях проникновение вирусоспецифических CD4 T-клеток имеет решающее значение для обеспечения цитокинов, которые позволяют антителам проникать посредством индукции проницаемости сосудов.

Результаты показывают, создание надежных ответов циркулирующих CD4 T-клеток памяти может оказывать благоприятный эффект для вакцин на основе антител или лечения против нейротропных вирусов.

Материалы и способы, использованные в этих экспериментах, теперь в настоящем документе.

20 Мыши

Самки C57BL/6 (CD45.2⁺) в возрасте от шести до восьми недель и конгенные мыши C57BL/6 B6.SJL-PtprcaPep3b/BoyJ (B6.Ly5.1) (CD45.1⁺), мыши B6.129S2-*Igh*^{tm1Cgn}/J (μ MT), анти-HEL B-клеточный рецептор (BCR)-трансгенные мыши C57BL/6-TgN (IghelMD4) (HELtg), мыши CBy.PL(B6)-*Thy1*^a/ScrJ (Thy1.1⁺ BALB/c) и мыши B6.129X1-*Fcgrt*^{tm1Dcr}/DcrJ (FcRn^{0/0}) были приобретены в Национальном институте рака и лаборатории Джексона. Мыши J_HD (дефицит B-клеток на фоне BALB/c) были получены от Taconic Animal Models.

Вирусы

30 Были получены штаммы HSV-2 186syn⁻ TK⁻ и 186syn⁺. Эти вирусы размножали и титровали на клетках Vero (ATCC CCL-81), как описано ранее (Laidlaw, B. J. et al., 2014, *Immunity* **41**, 633–645). Вирус гриппа A/Puerto Rico/3/334 (A/PR8: H1N1) и WT/VSV размножали, как описано ранее (Laidlaw, B. J. et al., 2014, *Immunity* **41**, 633–645, Sasai, M., et al., 2010, *Science* **329**, 1530–1534).

Заражение вирусом

Самок мышей в возрасте от шести до восьми недель, которым подкожно инъецировали Depo Provera (Pharmacia Upjohn, 2 мг на мышь), иммунизировали интравагинально, интраперитонеально или интраназально посредством 10^5 БОЕ HSV-2 (186syn- TK-), как описано ранее (Iijima, N. et al., 2014, *Science* 346, 93–98). Для вторичного заражения иммунизированных мышей вагинально заражали посредством 10^4 БОЕ WT HSV-2 (186syn⁺) (100% летальная доза для наивных мышей). В случае мышей BALB/c и J_HD этих мышей иммунизировали посредством от 5×10^4 до 10^5 БОЕ HSV-2. Для вторичного заражения иммунизированных мышей заражали посредством 10^5 БОЕ WT HSV-2 (100% летальная доза для наивных мышей). Тяжесть заболевания оценивали следующим образом: 0 — никаких признаков; 1 — легкая генитальная эритема и отек; 2, умеренное воспаление половых органов; 3, гнойные поражения половых органов; 4, паралич задних конечностей; 5, предсмертное состояние (Laidlaw, B. J. et al., 2014, *Immunity* 41, 633–645). Из соображений гуманности животных усыпляли до того, как они достигли состояния агонии. Для измерения титра вируса в периферических тканях ткани влагалища, DRG и спинной мозг собирали в буфере ABC (0,5 mM MgCl₂·6H₂O, 0,9 mM CaCl₂·2H₂O, 1% глюкозы, 5% HI FBS и пенициллин-стрептомицин), включая 1% амфотерицин-В (Sigma). После этого эти ткани гомогенизировали лизирующей матрицей D (MP Biomedicals) с последующим осветлением центрифугированием. Вирусные титры получали путем титрования образцов тканей на монослое клеток Vero. Концентрацию белка в гомогенатах тканей измеряли с помощью набора для анализа белка DC (Bio-Rad Laboratories). Мышей C57BL/6 иммунизировали внутривенно вирусом WT/VSV (2×10^6 БОЕ на мышь) или интраназально вирусом гриппа A/PR8 (10 БОЕ на мышь). Для вторичного заражения мышей, иммунизированных VSV, повторно интраназально инфицировали посредством WT/VSV (1×10^7 БОЕ на мышь).

Антитела

Анти-CD90.2 (30-H12), анти-CD90.1 (OX-7), анти-CD45.2 (104), анти-CD45.1 (A20), анти-CD4 (GK1.5, RM4-5 и RM4-4), анти-CD19 (6D5), анти-CD45R/B220 (RA3-6B2), анти-MHC класса II (I-A/I-E, M5/114.15.2), анти-CD69 (H1.2F3), анти-CD44

(IM7), анти-CD49d (R1-2), анти-NKp46 (29A1.4) и анти- IFN- γ (XMG1.2 и R4-6A2) были приобретены у e-Bioscience или Biolegend.

Выделение лейкоцитов из периферических тканей

5 Половые пути тканей влагалища, обработанные посредством Depo-Provera, отделяли от уретры и шейки матки. Перед сбором нейрональных тканей мышей интенсивно перфузировали с использованием транскардиальной перфузии и перфузии через нижнюю полую вену и большую подкожную вену посредством более чем 30 мл PBS. DRG и прилегающую область спинного мозга собирали в
10 PBS для проточной цитометрии или буфере ABC для гомогенизации ткани. Затем ткани в PBS инкубировали с 0,5 мг/мл Dispase II (Roche) в течение 15 минут при 37 °C. После этого вагинальные ткани расщепляли посредством 1 мг/мл коллагеназы D (Roche) и 30 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich) при 37 °C в течение 25 мин. Полученные клетки фильтровали через 70-мкм фильтр (Iijima, N. et al., 2011, *Proc.*
15 *Natl Acad. Sci. USA* 108, 284–289, Johnson, A. J. et al., 2008, *J. Virol.* 82, 9678–9688).

Поточная цитометрия

Приготовление суспензий одиночных клеток из селезенки, дренирующих лимфатических узлов (паховых лимфатических узлов и подвздошных
20 лимфатических узлов), влагалища и нейрональной ткани описано ранее. Многопараметрический анализ проводили на проточном цитометре LSR II (Becton Dickinson) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Для обнаружения HSV-2-специфических CD4⁺ Т-клеток или VSV-специфических CD4⁺ Т-клеток (CD45.1⁺ или CD45.2⁺) суспензии одиночных клеток
25 из вагинальных тканей мышей, иммунизированных посредством ТК⁻ HSV-2, или мышей, иммунизированных VSV, стимулировали в присутствии 5 мкг/мл брэфельдина А с наивными спленоцитами (CD45.1⁺CD45.2⁺), загруженными термоинактивированным антигеном HSV-2, термоинактивированным вирусом WT VSV и термоинактивированным вирусом гриппа A/PR8 в течение примерно 12
30 часов (Iijima, N. et al., 2014, *Science* 346, 93–98). Для обнаружения HSV-2-специфических CD4⁺ Т-клеток у мышей BALB/c и J_HD суспензии одиночных клеток (CD90.2⁺) из вагинальных тканей мышей, иммунизированных посредством ТК⁻ HSV-2, стимулировали наивными спленоцитами (CD90.1⁺), загруженными инактивированным посредством нагревания антигеном HSV-2.

Обработка *in vivo* нейтрализующими/истощающими антителами

Мышей C57BL/6 или мышей BALB/c иммунизировали вирусом TK⁻ HSV-2. Через пять-восемь недель этим мышам внутривенно (в хвостовую вену) вводили
 5 300 мкг анти-CD4 (GK1.5; BioXCell) или анти- IFN- γ (XMG1.2; BioXCell) антитела в дни -4, -1, 2 и 4 до или после заражения HSV-2. Истощение CD4 *in vivo* было подтверждено флуоресцентно-активированным анализом сортировки клеток клеточной суспензии селезенки. Для нейтрализации α 4-интегрина очищенное антимышиное α 4 интегрин/CD49d (PS/2; SouthernBiotech) вводили посредством
 10 инъекции 300 мкг антитела в хвостовую вену на 2 и 4 день после контрольного заражения.

Парабиоз

Парабиоз выполняли, как описано ранее, с небольшими изменениями (Iijima
 15 et al., 2014, Science, 346: 93-98). Наивных или иммунизированных мышей C57BL/6, мышей HELTg и μ MT анестезировали смесью кетамина/ксилазина (100 мг/кг и 10 мг/кг массы тела соответственно). После бритья соответствующих боковых сторон каждой мыши были сделаны соответствующие разрезы кожи от за уха до бедра и сшиты вместе рассасывающейся нитью Chromic Gut (4-0, Henry Schein), затем эти
 20 области были скреплены 7-мм зажимами из нержавеющей стали для ран (Roboz).

Измерение вирусспецифического Ig и общего Ig в гомогенатах сыворотки и тканей

96-луночные планшеты для EIA/RIA заполняли 100 мкл инаktivированного
 25 нагреванием очищенного HSV-2 (эквивалент 10^4 – 10^5 БОЕ на 100 мкл) или очищенного нагреванием VSV (5×10^5 БОЕ эквивалент на 100 мкл) для измерения вирусспецифического Ig или козьего антимышиного Ig (1:1000; SouthernBiotech, 1010-01), для измерения общего Ig в карбонатном буфере (pH 9,5), а затем инкубировали в течение ночи при 4 °C. На следующий день эти планшеты
 30 промывали PBS-Tween 20 и блокировали в течение 2 часов посредством 5% FBS в PBS. Образцы тканей и образцы сыворотки в буфере ABC затем помещали в лунки и инкубировали по меньшей мере 4 часа при температуре окружающей среды. После промывки в PBS-Tween 20 в лунки добавляли HRP-конъюгированные

антимышинные IgG1, IgG3, IgM, IgA, IgG2a, IgG2b или IgG2c (SouthernBiotech) на 1 ч с последующей промывкой и добавлением раствора TMB (eBioscience). Реакции останавливали посредством 1 н. H₂SO₄, и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Титры образцов антител определяли с использованием стандарта Ig (панель мышинных иммуноглобулинов C57BL/6; SouthernBiotech) или мышинового IgG2a (HOPC-1; SouthernBiotech).

ELISA на альбумин

Используя гомогенаты тканей (DRG и спинного мозга), приготовленные после интенсивной перфузии, проводили ELISA на альбумин (Genway) в соответствии с инструкциями производителя.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Замороженные срезы толщиной 8 мкм вырезали, фиксировали и оставляли сушиться при температуре окружающей среды. Эти ткани окрашивали антителами (анти-CD4 (H129.19), анти-MHC класса II (M5/114.15.2), анти-VCAM-1 (429/MVCAM.A), анти-CD31 (390 и MEC13. 3), анти-Ly6G (1A8), анти-CD11b (M1/70) и анти-мышинным альбумином (Goat pAb/Bethyl Laboratories), как описано ранее (Iijima, N. et al., 2014, Science **346**, 93–98). Эти предметные стекла промывали и инкубировали с DAPI, фиксировали на Fluoromount-G (SouthernBiotech). Их анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (BX51; Olympus).

Анализы сосудистой проницаемости

Позвоночник собирали у мышей, иммунизированных интраназально посредством ТК⁻ HSV-2, через 45 минут после инъекции 200 мкл 5 мг/мл конъюгированного с Oregon Green 488 декстрана (70 кДа, D7173, Thermo Fisher Scientific) в PBS в хвостовую вену. Затем позвоночник фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение ночи и вырезали замороженные срезы (толщиной 8 мкм) для иммуногистохимического анализа (Knowland, D. et al., 2014, Neuron **82**, 603–617).

Выделение ДНК из тканей

Мышей C57BL/6 интраназально иммунизировали посредством ТК⁻ HSV-2. Через шесть недель вагинальные ткани, DRG и спинной мозг этих мышей

лизировали в 10 мг/мл протеиназы К (Roche) для выделения ДНК при 55 °С в течение ночи. После извлечения в эти пробирки добавляли фенол, уравновешенный с помощью Tris, pH 8,0. После этого к смеси фенол/хлороформ (1:1) добавляли верхнюю водную фазу. Верхнюю водную фазу повторно
 5 суспендировали в ацетате натрия, pH 6,0, и 100% этаноле при комнатной температуре. После встряхивания и центрифугирования измеряли концентрацию выделенного осадка ДНК. Уровень геномной ДНК HSV-2 в периферических тканях на основе gD HSV-2 (прямой праймер: AGCGAGGATAACCTGGGATT (SEQ ID NO: 1); обратный праймер: GGGATAAAGCGGGGTAACAT (SEQ ID NO: 2))
 10 анализировали с помощью количественной ПЦР с использованием очищенного генома вирусной ДНК в качестве стандарта.

Статистический анализ

Кривые выживания анализировали с использованием логрангового
 15 критерия. Для других данных при сравнении нормально распределенных непрерывных переменных использовали двусторонний непарный t-критерий Стьюдента или парный t-критерий Стьюдента с использованием программного обеспечения Prism. Для сравнения двух наборов непараметрических данных использовали U-критерий Манна-Уитни.

20 Теперь будут описаны результаты экспериментов.

Для исследования механизма защиты, опосредованной антителами, в тканях, защищенных барьером, использовали мышиную модель инфекции генитального герпеса. Вирус простого герпеса типа 2 (HSV-2) проникает в хозяина через эпителий слизистой оболочки и инфицирует иннервирующие нейроны в
 25 ганглиях задних корешков (DRG) с установлением латентного периода (Koelle, D. M. et al., 2008, Annu. Rev. Med. 59, 381–395, Knipe, D. M. et al., 2008 Nature Rev. Microbiol. 6, 211–221). Вагинальная иммунизация аттенуированным HSV-2 с делецией гена тимидинкиназы (TK⁻ HSV-2) обеспечивает полную защиту от летального заболевания после генитального заражения HSV-2 дикого типа (WT)
 30 (Parr, M. B. et al., 1994, Lab. Invest. 70, 369–380) путем создания резидентных в тканях Т-клеток памяти (TRM) (Iijima, N. et al., 2014, *Science* 346, 93–98). У вагинально иммунизированных мышей для защиты требуется секреция интерферона (IFN)- γ -CD4 Т-клетками, но не антител (Milligan, G. N. et al., 1998, J. Immunol. 160, 6093–6100, Parr, M. B. et al., 2000, Immunology 101, 126–131).

Напротив, дистальная иммунизация тем же вирусом не может установить TRM и обеспечивает лишь частичную защиту (Iijima, N. et al., 2014, 2014, Science 346, 93–98). Тем не менее, из протестированных дистальных путей иммунизации интраназальная иммунизация посредством ТК⁺ HSV-2 обеспечивала наиболее надежную защиту от интравагинального заражения WT HSV-2, тогда как внутрибрюшинная иммунизация обеспечивала наименьшую защиту (Фигура 1А–Фигура 1D) (Sato, A. et al., 2014, J. Virol. 88, 13699–13708, Jones, C. A. et al., 2000, Virology 278, 137–150). Как было показано ранее (Iijima, N. et al., 2014, Science 346, 93–98), интраназальная иммунизация не приводила к установлению TRM в слизистой оболочке половых органов (Фигура 5А, Фигура 5В), несмотря на создание сопоставимого пула циркулирующих Т-клеток памяти (Фигура 5С, Фигура 5D). После вагинального заражения HSV-2 мыши, которые были интраназально иммунизированы посредством ТК⁺ HSV-2, были неспособны контролировать репликацию вируса в слизистой оболочке влагалища (Фигура 1С), но значительно снизили репликацию вируса в иннервирующих нейронах DRG (Фигура 1D). Примечательно, что было обнаружено, что защита, обеспечиваемая интраназальной иммунизацией, требует наличия В-клеток, поскольку мыши J_HD (дефицитные по В-клеткам) не были защищены интраназальной иммунизацией (Фигура 1Е - Фигура 1G). В отсутствие В-клеток интраназальная иммунизация не могла обеспечивать контроль репликации вируса в DRG и спинном мозге (Фигура 1G).

У мышей, иммунизированных интраназально ТК⁺ HSV-2, не было обнаружено признаков инфекции в DRG или спинном мозге (Фигура 5Е). Кроме того, интраназальный путь иммунизации не был уникальным в плане обеспечения защитного ответа, так как парабиотические мыши, имеющие общий кровоток с интравагинально иммунизированными партнерами, также были частично защищены от вагинального заражения посредством WT HSV-2 в отсутствие TRM (Iijima, N. et al., 2014, Science 346, 93–98) (Фигура 5F - Фигура 5H). Было обнаружено, что В-клетки в иммунизированных партнерах необходимы для обеспечения защиты у наивных присоединенных мышей, поскольку партнеры иммунизированных мышей μ MT не были защищены (Фигура 5F - Фигура 5H). Кроме того, антиген-специфические В-клетки были необходимы для обеспечения защиты, поскольку интравагинально иммунизированные партнеры, чьи В-клетки несли нерелевантный рецептор В-клеток (против лизоцима куриного яйца (HEL)),

не могли обеспечить защиту у присоединенного наивного партнера (Фигура 5F – Фигура 5H). Как и при интраназальной иммунизации, вирусный контроль, обеспечиваемый иммунизированным партнером-парабиотиком, не наблюдался в слизистой оболочке влагалища (Фигура 5H), демонстрируя, что защита происходит в иннервирующих нейронах.

Затем исследовали основу превосходной защиты антителами при различных способах иммунизации. Интравагинальный, интраназальный и интраперитонеальный способы иммунизации посредством ТК⁺ HSV-2 приводят к сопоставимым ответам циркулирующих CD4 T-клеток памяти (Iijima, N. et al., 2014, Science 346, 93–98). Хотя для других изотипов различий не наблюдалось, интраназальный и интравагинальный способы иммунизации превосходили внутрибрюшинный способ генерирования более высоких уровней системных HSV-2-специфических иммуноглобулинов-G (IgG)2b и IgG2c ответов (Фигура 6). Эти результаты показали, что более высокие уровни циркулирующих вирусспецифических IgG2b и IgG2c коррелируют с защитой от вагинального заражения HSV-2.

Затем было определено, как опосредуется доступ антител к DRG и спинному мозгу. Несмотря на то, что периферические нервные ткани защищены от диффузии антител через гематоэнцефалический барьер, формально возможно, что секреция антител в ткани происходит посредством транспорта сывороточных антител неонатальным Fc-рецептором для IgG (FcRn) (Roopenian, D. C. et al., 2007, Nature Rev. Immunol. 7, 715–725), экспрессированным на эндотелиальных клетках в инфицированных тканях. Однако было обнаружено, что мыши с дефицитом FcRn, иммунизированные интраназально посредством ТК⁺ HSV-2, были в равной степени защищены от вагинальной инфекции HSV-2, как и мыши WT (Фигура 2A и Фигура 2B). Таким образом, циркулирующие HSV-2-специфические антитела каким-то образом мобилизуются в нейрональные ткани после местной вирусной инфекции независимым от FcRn образом и необходимы для защиты хозяина.

Если циркулирующих антител достаточно, пассивный перенос только HSV-2-специфических антител должен защитить хозяина. Однако было показано (McDermott, M. R. et al., 1990, J. Gen. Virol. 71, 1497–1504, Morrison, L. A. et al., 2001 J. Virol. 75, 1195–1204), что внутривенная инъекция только антител, специфичных к HSV-2, не могут защитить наивных мышей от заражения HSV-2 (Фигура 2C и Фигура 2D). Напротив, в соответствии с предыдущим исследованием (Morrison, L.

A. et al., 2001, J. Virol. 75, 1195–1204), было обнаружено, что мыши μ MT с дефицитом В-клеток, иммунизированные интраназально посредством ТК- HSV-2 и получавшие системное введение HSV-2-специфичной антисыворотки, были защищены (Фигура 2С и Фигура 2D). Таким образом, эти результаты

5 демонстрируют, что именно секретируемые антитела, а не сами В-клетки, вместе с не-В-клеточными иммунными клетками, возможно, Т-клетками, индуцированными иммунизацией, по-видимому, необходимы для защиты. Чтобы проверить эту возможность, CD4 Т-клетки от ранее иммунизированных мышей истощали интраназально непосредственно перед интравагинальным заражением

10 посредством HSV-2. В этих условиях дифференцировка В-клеток и ответы антител полностью происходили в присутствии CD4 Т-клеток в течение 6 недель. Мыши с острым истощением CD4 Т-клеток погибали от инфекции HSV-2 (Фигура 2Е и Фигура 2F), тогда как истощение Т-клеток CD8 и естественных киллеров (NK) не имело никакого эффекта (Sato, A. et al., 2014, J. Virol. 88, 13699–13708). Более

15 того, нейтрализация IFN- γ перед заражением или генетический дефицит IFN- γ R также делали интраназально иммунизированных мышей более восприимчивыми к интравагинальному заражению HSV-2 (Фигура 2Е и Фигура 2F). Следует отметить, что истощение CD4 Т-клеток у интраназально иммунизированных мышей непосредственно перед заражением вирусом сделало мышей неспособными к

20 вирусному контролю в DRG в той же степени, что и у иммунизированных мышей μ MT с дефицитом В-клеток (Фигура 2G). Было замечено, что интраназальная иммунизация обеспечивала почти полную защиту от HSV-2 в DRG, но переменную защиту в спинном мозге (Фигура 1D и Фигура 2G). Поскольку HSV-2 может по-разному засевать DRG и спинной мозг через сенсорные нейроны и вегетативные

25 нейроны (Ohashi, M. et al., 2011, J. Virol. 85, 3030–3032), эти данные демонстрируют, что эффективность опосредованной антителами защиты может зависеть от пути проникновения вируса. Кроме того, эти результаты показывают, что циркулирующие антитела, CD4 Т-клетки и IFN- γ совместно опосредуют нейропротекцию против HSV-2.

30 Учитывая, что опосредованная антителами защита происходит на уровне иннервирующих нейронов, а не во влагалище (Фигура 1С и Фигура 5Н), предполагается, что CD4 Т-клетки будут контролировать доставку антител к тканевой паренхиме посредством секреции IFN- γ . Низкие уровни

вирусспецифических и общих антител были обнаружены в DRG или спинном мозге в стабильном состоянии у иммунизированных мышей (Фигура 3; WT/интраназально → D0), и неопределяемые уровни антител в этих тканях у ранее неиммунизированных мышей через 6 дней после острой инфекции HSV-2 (Фигура 3; WT/наивные → D6). Однако у мышей, иммунизированных интраназально посредством ТК- HSV-2 за 6 недель до этого, через 6 дней после интравагинального заражения HSV-2 было обнаружено повышение уровня антител в DRG и в спинном мозге (Фигура 3; WT/интраназально → D6). Более того, CD4 Т-клетки были необходимы для доступа вирусспецифических антител к ограниченным тканям, таким как DRG, поскольку истощение CD4 Т-клеток полностью снижало уровни антител в этой ткани и спинном мозге (Фигура 3D; WT/интраназально + анти-CD4 → D6). Кроме того, аналогичная потребность в CD4 Т-клетках (Фигура 3B, Фигура D) и IFN-γ (Фигура 7) была обнаружена для диффузии всех изотипов IgG2b и IgG2c в DRG, демонстрируя, что механизм доставки не различает вирусную специфичность антитела. В отличие от нейрональных тканей, острое истощение CD4 или блокада IFN-γ после того, как установился ответ антител, не оказало существенного влияния на уровни анти-HSV-2 или общих антител в сыворотке (Фигура 8A и Фигура 8B). Чтобы определить, необходимы ли антиген-специфические CD4 Т-клетки памяти для обеспечения доступа антител к нейрональным тканям, мышей интраназально примировали гетерологичным вирусом, вирусом гриппа А, а через 4 недели интравагинально заражали HSV-2. В отличие от мышей, несущих родственные CD4 Т-клетки памяти, доступ антител к нейрональным тканям после интравагинального заражения HSV-2 не наблюдался у мышей, у которых присутствовали нерелевантные CD4 Т-клетки памяти (против вируса гриппа А) (Фигура 9). Эти данные указывают на то, что антиген-специфические CD4 Т-клетки памяти необходимы для доступа антител к нейрональным тканям.

Было высказано предположение, что Т-клетки памяти CD4 могут проникать в ткани, защищенные барьером, и мобилизовать доступ антител за счет локальной секреции IFN-γ. В поддержку этой идеи было обнаружено, что IFN-γ секретирующие CD4 Т-клетки, специфичные для HSV-2, проникали в DRG и спинной мозг примерно через 6 дней после генитального заражения HSV-2 у мышей, которые получили интраназальную иммунизацию за 6 недель до этого

(Фигура 4А и Фигура 4В; WT/интраназально→ D6). Некоторое увеличение врожденных лейкоцитов, несущих CD11b, Ly6G или MHCII, наблюдали в DRG и спинном мозге через 6 дней после заражения (Фигура 10А). Секреция IFN- γ была ограничена популяцией CD4 Т-клеток памяти в DRG (Фигура 4А). Кроме того, проникновение эффекторных CD4 Т-клеток в DRG и спинной мозг через 6 дней после первичной вагинальной инфекции HSV-2 было гораздо менее эффективным, чем их аналоги памяти (Фигура 4А и Фигура 4В; WT/наивные → D6), демонстрируя, что внутренняя способность Т-клеток мигрировать в эти нейрональные ткани увеличивается с развитием памяти.

- 10 Взаимодействие $\alpha 4\beta 1$ (или VLA4) и VCAM-1 способствует рекрутированию Т-клеток через гематоэнцефалический барьер (Man, S. et al., 2007, Brain Pathol. 17, 243–250). CD4 Т-клетки памяти, сгенерированные против HSV-2, экспрессируют CD49d, который представляет собой субъединицу интегрин $\alpha 4$ (Iijima, N. et al., 2014, Science 346, 93–98). Было обнаружено, что проникновение CD4 Т-клеток
- 15 памяти в нервную ткань строго зависело от интегрин $\alpha 4$, так как блокада $\alpha 4$ антителами предотвращала их проникновение в DRG и спинной мозг (Фигура 4А и Фигура 4В). Экспрессия лиганда $\alpha 4\beta 1$, VCAM-1, наблюдалась в эндотелии DRG и спинном мозге у мышей с ослабленным иммунитетом (Фигура 4С и Фигура 10В). Кроме того, анализ срезов тканей показал, что CD4 Т-клетки были
- 20 обнаружены в паренхиме DRG и спинного мозга, а также в их эпиневрии и мозговых оболочках, но не в сосудистой системе (Фигура 4С, Фигура 10А и Фигура 10В). Примечательно, что многие CD4 Т-клетки были обнаружены рядом с телом нейронов в DRG. Некоторое окрашивание VCAM-1 было обнаружено в цитозоле тел нейронов (стрелка в Фигуре 4С). Кроме того, внутрисосудистое окрашивание
- 25 (Anderson, K. G. et al., 2014. Nature Protocols 9, 209–222) антителами к CD90.2 показало, что подавляющее большинство Т-клеток CD4 в DRG и спинном мозге секвестрированы из кровотока (Фигура 11А, Фигура 11В). Таким образом, CD4 Т-клетки, рекрутированные в нейрональных тканях, получают доступ к паренхиме DRG и спинного мозга. Примечательно, что блокада рекрутирования CD4 Т-клеток
- 30 интегрином $\alpha 4$ приводила к уменьшению доступа вирусспецифических антител к DRG и спинному мозгу (Фигура 4D и Фигура 4Е), не влияя на уровни вирусспецифических антител в крови (Фигура 8С) или общие уровни антител различных изотипов в кровотоке (Фигура 8D). В совокупности эти данные

указывают на то, что CD4 Т-клетки памяти проникают в нейрональную ткань и секретируют IFN- γ , чтобы способствовать доступу антител к DRG и спинному мозгу.

- Каким образом IFN- γ , секретируемый CD4 Т-клетками, может позволить циркулирующим антителам получить доступ к нейрональным тканям? IFN- γ действует на эндотелиальные клетки, реконструируя плотные контакты и увеличивая проницаемость (Capaldo, C. T. et al. 2014, Mol. Biol. Cell 25, 2710–2719). Было замечено, что рекомбинантного IFN- γ , введенного интравaginaльно, было достаточно для обеспечения доступа антител к просвету влагалища, что свидетельствует о том, что IFN- γ является достаточным, чтобы индуцировать как сосудистую, так и эпителиальную проницаемость в периферических тканях (Фигура 12A) и усиливать экспрессию VCAM-1 на эндотелиальные клетки (Фигура 12B). Чтобы оценить, осуществляется ли доступ антител к нейрональным тканям, опосредованный CD4 Т-клетками и IFN- γ , через повышенную проницаемость сосудов, было продемонстрировано измеренное высвобождение альбумина крови в нейрональную ткань после генитального заражения HSV-2 у интраназально иммунизированных мышей. Примечательно, что было отмечено, что сосудистая проницаемость возникает в DRG и спинном мозге в зависимости от CD4 Т-клеток и IFN- γ , что измеряется по выпотеванию альбумина крови в нейрональной ткани с помощью ELISA и иммуногистохимического анализа (Фигура 4F и Фигура 13A). Была подтверждена CD4-зависимая проницаемость сосудов для DRG и спинного мозга с помощью внутривенной инъекции 70 кДа флуоресцеинизотиоцианата (FITC)-декстрана, который имеет сходный размер с IgG (Фигура 13B). В совокупности результаты подтверждают мнение о том, что CD4 Т-клетки обеспечивают доставку антител к очагам инфекции путем секреции IFN- γ и повышения проницаемости микрососудов. Этот механизм доставки антител имеет решающее значение для иммунной защиты хозяина, поскольку истощение CD4 Т-клеток, ингибирование миграции CD4 Т-клеток в нейрональной ткани или нейтрализация IFN- γ делает иммунных мышей восприимчивыми к инфекции.
- Чтобы определить, выходят ли результаты за пределы HSV-2, было исследовано определение доступа антител к нейрональной ткани после другого нейротропного вируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), РНК-вируса с отрицательным смыслом семейства Rhabdoviridae. При интраназальной

инокуляции VSV поражает обонятельные сенсорные нейроны слизистой оболочки носа и проникает в ЦНС через обонятельную луковицу (Reiss, C. S. et al., 1998, Ann. NY Acad. Sci. 855, 751–761). Напротив, внутривенное заражение посредством VSV хорошо переносится и вызывает устойчивый Т- и В-клеточный ответ (Фигура 14) (Thomsen, A. R. et al., 1997, Int. Immunol. 9, 1757–1766). Чтобы определить, требуются ли CD4 Т-клетки памяти для доступа антител к мозгу, мышей внутривенно иммунизировали посредством VSV. Через пять недель иммунизированных мышей интраназально заражали посредством VSV. Поступление VSV-специфических антител контролировали в головном мозге через 6 дней после интраназального заражения. В соответствии с данными, полученными при инфицировании HSV-2, наблюдалась поразительная зависимость доступа антител к мозгу от CD4 Т-клеток (Фигура 14B). Кроме того, обработка мышей анти- $\alpha 4$ антителами непосредственно перед интраназальным заражением вирусом VSV также уменьшала доступ антител к мозгу, не влияя на специфические антитела против VSV в кровотоке (Фигура 14C). Кроме того, было установлено, что проницаемость сосудов для головного мозга зависела от интегрин $\alpha 4$, поскольку блокада интегрин $\alpha 4$ антителами приводила к уменьшению выпотевания альбумина в мозг (Фигура 14D). В совокупности эти результаты показывают, что потребность в $\alpha 4$ -интегрине и CD4 Т-клетках памяти для доступа антител относится к двум различным нейротропным вирусам, HSV-2 и VSV, и предполагают общий механизм доступа антител к иммунопривилегированным тканям барьерами «кровь-нерв».

Пример 2: Иммуноterapia вирусных инфекций и опухолей ЦНС на основе Т-клеток

Доступ к мозгу и другим участкам с низкой способностью к регенерации, как правило, ограничен плотными эндотелиальными слоями ткани крови, такими как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который ограничивает доступ к центральной нервной системе (ЦНС). Хотя эти барьеры ограничивают проникновение патогенов и помогают сохранить целостность ткани, они также могут препятствовать доступу защитных антител или терапевтических молекул против инфекционных агентов или опухолей. На модели нейротропной вирусной инфекции были проведены эксперименты по предоставлению доступа к ЦНС защитных или терапевтических

антител с использованием опосредованной иммунным ответом транзиторной проницаемости ГЭБ. Первичная системная инфекция вирусом везикулярного стоматита (VSV) приводила к опосредованному IFN γ временному открытию ГЭБ, происходящему от CD4 $^{+}$ Т-клеток, после летального интраназального заражения VSV, что позволяло защитным антителам проникать в ЦНС. Имитация локального вирусного заражения с интраназальной доставкой только вирусных антигенных пептидов эффективно рекрутирует IFN γ -продуцирующие CD4 $^{+}$ Т-клетки, вызывая транзиторную проницаемость ГЭБ, доступ защитных антител к ЦНС и защиту от гетерологичного вирусного заражения. Интраназальная доставка специфичных для Т-клеток иммуногенных пептидов также обеспечивает эффективный доступ к ЦНС антител против PD1 в модели глиобластомы, что значительно повышает эффективность иммунотерапии. Наши результаты показывают, что локальная доставка антигенных пептидов в иммунно-привилегированные участки может временно увеличить доступ терапевтических молекул или моноклональных антител против нейротропных патогенов, опухолей головного мозга и нейродегенеративных заболеваний.

Материалы и способы, использованные в этих экспериментах, теперь в настоящем документе.

20 Мыши

Самки C57BL/6 (CD45.2 $^{+}$) в возрасте от четырех до восьми недель, конгенные C57BL/6 B6.SJL-PtprcaPep3b/BoyJ (B6.Ly5.1) (CD45.1 $^{+}$), мыши с дефицитом иммуноглобулина, дефицитом по аденозиндезаминазе, индуцированным активацией (AID $^{-/-}$) дефицитом по секреторному IgM (sIgM $^{-/-}$) с двойным нокаутом (DKO AID $^{-/-}$ sIgM $^{-/-}$) и трансгенные мыши с gDII-специфичным DsRed (HSV-реактивный TCR Tg) были приобретены в Национальном институте рака и лаборатории Джексона. Были приложены все усилия, чтобы минимизировать страдания животных. Мыши одинакового возраста были рандомизированы в контрольную группу и группы обработки без какой-либо предвзятости в отношении родителей, массы или размера.

Вирусы

Штамм HSV-2 186syn-TK и штамм вируса WT/VSV размножали и титровали на клетках Vero (ATCC CCL-81). Клетки Vero не содержали микоплазмы, что было проанализировано с помощью ПЦР перед использованием.

5 Вирусная инфекция

Самок мышей в возрасте от четырех до восьми недель подкожно иммунизировали посредством WT/VSV, 2×10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ), 100 мкл/мышь. Для вторичного заражения иммунизированных мышей анестезировали изофлураном (смесь 30% об./об. изофлурана в пропиленглицерине) и интраназально инокулировали посредством WT/VSV, 10^7 БОЕ/мышь. Мышей C57/BL6 иммунизировали подкожно посредством 2×10^6 БОЕ/100 мкл/мышь ТК- HSV-2. Вирусную инфекцию определяли по выживаемости, потере массы тела и мониторингу признаков заболеваний. Из соображений гуманности животных усыпляли до того, как они достигали состояния агонии. 10
15 Данные кривой выживания представлены в виде процента выживания в конце эксперимента. Вирусную РНК в головном мозге обнаруживали с помощью qRT-PCR.

Антитела

20 Анти-CD45.2 (104), анти-CD45.1 (A20), анти-CD45 (30-F11), анти- CD3 ϵ (145-2C11), анти-CD4 (GK1.5 и RM4-5), анти-CD8 α (53-6.7) были приобретены в BD Biosciences, e-Bioscience или BioLegend. Для внутриклеточного окрашивания анти-IFN γ (XMG1.2 и R4-6A2), анти-TNF α (MP6-XT22) были приобретены у BioLegend. Alexa-Fluor-488-конъюгированный козий антимышиный IgG (H+L), ослиный Alexa-
25 fluor 646 IgG против козы (H+L), сосудистые метки Qtracker 565 и изотипический контрольный мышиный IgG2a (02-6200) были приобретены у Invitrogen (ThermoFischer Scientific). Моноклональное антитело против VSV(IE9F9) было приобретено у Kerafast.

30 Выделение РНК и количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Для измерения титра вируса ткани мозга собирали в DMEM (1 мкл DMEM/0,2 мг ткани) (Life Technologies, Grand Island, NY) с 1% пенициллином-стрептомицином (Sigma). После этого эти ткани гомогенизировали лизирующей

матрицей D (MP Biomedicals) с последующим осветлением центрифугированием. РНК выделяли с использованием реагента TRIZOL (Sigma-Aldrich) с последующим использованием мини-набора RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Загрязняющую ДНК удаляли с помощью рекомбинантной ДНКазы I (Roche), а кДНК получали с помощью набора для синтеза кДНК iScript (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя. Количественную ПЦР проводили с использованием количественного анализа на основе SYBR green (Qiagen). Экспрессию РНК VSV в тканях головного мозга количественно оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) с использованием следующего набора праймеров: VSV (F, ACGGCGTACTTCCAGATGG (SEQ ID NO: 3); R, CTCGGTTCAAGATCCAGGT (SEQ ID NO: 4)). Экспрессию генов-мишеней нормализовали по отношению к конститутивному гену Hprt.

15 Обработка антигенными пептидами

Через 5 недель после инфицирования посредством ТК-HSV-2 или через 24 после обработки HSV-специфическими CD4 Т-клетками, мышей с адоптивным переносом обрабатывали пептидами gDTII (эпитоп, ограниченный I-Ab HSV-2, расположенный в гликопротеине D) или пептидами RVG-gDTII (гликопротеин вируса бешенства, ассоциированный с пептидом gDTII). Животных кратковременно анестезировали изофлураном, и состав вводили 1 или 3 раза интраназально (100 мкг/мышь в 10 мкл, по 5 мкл в каждую ноздрю). Дозы вводили последовательно с 15-минутным интервалом. Пептиды RVG-OVA (гликопротеин вируса бешенства, ассоциированный с овальбумином) использовали в качестве контроля в той же концентрации и дозе. Пептиды RVG-gDT (YTIWMPENPRPGTGPCDIFTNSRGKRASNGGGGCCIPPNWHIPSIQDA; SEQ ID NO:89) и пептиды gDT (gD315-327, IPPNWHIPSIQDA; SEQ ID NO:90) использовали в качестве антигенных пептидов во всех экспериментах.

30 Выделение лейкоцитов из нейрональных тканей

Зараженных мышей анестезировали и интракардиально перфузировали стерильным PBS, охлажденным льдом. Ткани головного мозга собирали, и собирали в PBS и гомогенизировали с последующим расщеплением коллагеназой в 1 мг/мл коллагеназы D (Roche) и 30 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich) при 37 °C в

течение 30 минут. Полученные клетки фильтровали через 100-мкм фильтр и дополнительно выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Percoll. Препарат клеток вторично фильтровали через 70-мкм фильтр, промывали и собирали для дальнейшей стимуляции и анализа.

5

Стимуляция лимфоцитов и проточная цитометрия

Приготовление клеточных суспензий из нейрональных тканей было описано ранее. Спленоциты гомогенизировали и фильтровали через 70-мкм фильтр, промывали и обрабатывали буфером для лизиса ACK (5 мл ACK/селезенка в течение 1 минуты). Клетки предварительно обрабатывали антителом против CD16/32 (2.4G2) для блокирования рецепторов Fc и окрашивали поверхностными антителами. Для окрашивания внутриклеточных цитокинов и обнаружения HSV-2-специфических CD4⁺ Т-клеток или VSV-специфических CD4⁺ Т-клеток (CD45.1⁺ или CD45.2⁺) использовали суспензии одиночных клеток из тканей головного мозга мышей, иммунизированных посредством ТК- HSV-2, или VSV-иммунизированных мышей стимулировали в присутствии 5 мкг/мл брeфельдина А наивными спленоцитами (CD45.1⁺ CD45.2⁺), нагруженными антигеном HSV-2 (эквивалент 0,5 БОЕ на клетку) в течение 10–12 часов. Для неспецифической стимуляции клетки головного мозга, выделенные от мышей-реципиентов с переносом gDII, инкубировали с фoрбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) (20 нг/мл) (Sigma-Aldrich) и иономицином (4 мкг/мл) (Merck Milipore, Billerica, Массачусетс) в присутствии брeфельдина А X1 (eBioscience, Сан-Диего, Калифорния) при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 часов. Поверхность клеток окрашивали анти-CD3 (145-2C11), анти-CD4 (GK1.5 и RM4-5) и анти-CD8α (53-6,7) в течение 30 минут, а затем фиксировали, и проницаемость мембраны изменяли с помощью набора Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Эти клетки внутриклеточно окрашивали посредством анти-IFNγ (XMG1.2) и анти-TNFα в течение 1 часа. Многопараметрический анализ проводили на проточном цитометре LSR II (Becton Dickinson), а данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Обработка in vivo моноклональными антителами против VSV и пассивным введением сыворотки.

Мышам DKO AID-/- slgM-/- внутрибрюшинно вводили 5 мкг/500 мкл/мышь mAb против VSV в дни -1, 1 и 3 до/после интраназального заражения VSV. В качестве контроля использовали изотипическое контрольное антитело IgG2a. Для получения иммунной сыворотки против VSV у мышей, иммунизированных VSV, брали кровь через 6 дней после заражения. Полученные сыворотки объединяли и хранили при -80°C. Наивную сыворотку, полученную от неинфицированных мышей-доноров C57BL/6, использовали в качестве контроля. Перед экспериментами по переносу сыворотку нагревали при 56°C в течение 30 мин. Для экспериментов с пассивным переносом сыворотки VSV-иммунную сыворотку или наивную сыворотку (500 мкл) вводили мышам-реципиентам C57BL/6 интраперитонеальным путем в дни -1, 1 и 3 до/после заражения VSV. Для гетерологичного заражения мышам, иммунизированным посредством TK-HSV-2, или мышам с переносом gDTII интраперитонеально вводили 5 мкг/500 мкл/мышь mAb VSV в дни 1, 3 и 5 после обработки антигенными пептидами с последующим интраназальным заражением VSV на 7 день.

Адоптивный перенос HSV-специфических gDTII CD4+ Т-клеток

Трансгенных мышей с gDTII-специфичным DsRed подвергали эвтаназии, а спленоциты гомогенизировали с последующим лизисом эритроцитов в 5 мл лизирующего буфера ACK/селезенка в течение 1 мин. CD4+ Т-клетки выделяли из селезенки с использованием набора для выделения Т-клеток EasySep Mouse CD4+ T cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Затем выделенные CD4+Т-клетки внутривенно (ретроорбитально) переносили в концентрации 10^6 клеток мышам-реципиентам C57BL/6. Мышей обрабатывали антигенными пептидами через 24 часа после переноса gDTII-специфичных клеток.

Инъекция опухоли

Мышей иммунизировали посредством HSV-TK подкожно (п.к.) и через пять недель осуществляли внутрочерепную имплантацию 50 000 опухолевых клеток в стриатум. Через шесть дней после имплантации опухоли мышам вводили пептиды gDTII или пептиды OVA. Экспериментальные и контрольные мыши получали анти-PD1-антитела или изотипические антитела (200 мкг/мышь) на 9-й и 11-й день

после имплантации опухоли. Мышей контролировали на выживаемость, и опухоли визуализировали с помощью люминесцентной визуализации IVIS на 16 и 23 дни.

ELISA на альбумин

- 5 Инфицированных мышей глубоко анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции кетамина и ксилазина, используя 100 мг/кг 10% кетамина и 20 мг/кг 2% ксилазина, а затем транскардиально перфузировали стерильным ледяным фосфатно-солевым буфером (PBS). Ткани головного мозга собирали в указанные дни после заражения или обработки пептидами. Гомогенаты тканей разбавляли
- 10 1:500 и проводили ELISA на альбумин (Genway) в соответствии с инструкциями производителя.

Измерение вирусспецифических Ig и общих Ig в гомогенатах тканей

- Животных глубоко анестезировали ксилазином/кетаминном, а затем
- 15 транскардиально перфузировали PBS, охлажденным льдом, в указанные дни после заражения вирусом или обработки пептидами. Для измерения вирусспецифического IgG 96-луночный планшет для EIA/RIA покрывали 100 мкл инактивированного нагреванием очищенного VSV (эквивалент 5×10^5 БОЕ на 100 мкл) в карбонатном буфере (pH 9,5) и затем инкубировали в течение ночи при 4
- 20 °C. На следующий день эти планшеты промывали PBS-Tween 20 и блокировали в течение 2 часов посредством 5% FBS в PBS. Затем образцы мозговой ткани разбавляли, высевали и инкубировали в течение по меньшей мере четырех часов при комнатной температуре. После промывки в PBS-Tween 20 в лунки добавляли HRP-конъюгированные антимышиные IgG или IgG2b (SouthernBiotech) на 1 час с
- 25 последующей промывкой и добавлением раствора TMB (eBioscience). Реакции останавливали с помощью 1 н. H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Титры образцов антител определяли с использованием стандарта Ig (панель мышинных иммуноглобулинов C57BL/6; SouthernBiotech) или мышинового IgG2b (НОРС-1; SouthernBiotech). Для измерения общего IgG гомогенаты тканей серийно
- 30 разбавляли и проводили ELISA общего IgG (Genway) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализы сосудистой проницаемости

Мышам, иммунизированным посредством ТК- HSV-2, внутривенно (ретроорбитально) вводили 100 мкл 5 мг/мл конъюгированного с Oregon Green 488 декстрана (70 кДа, D7173, Thermo Fisher Scientific, MA) в PBS. Через 1 час ткани головного мозга осторожно собирали, фиксировали в течение ночи 4% параформальдегидом в PBS и делали замороженные срезы (толщиной 8 мкм) для иммуногистохимического анализа.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для окрашивания тканей вырезали замороженные срезы ткани головного мозга (толщиной 8 мкм), окрашивали и фиксировали. Эти ткани окрашивали антителами (анти-CD4 [H129.19], анти-MHC класс II [M5/114.15.2] анти-VCAM-1 [429/MVCAM.A], анти-CD31 [390 и MEC13.3], анти-Ly6G [1A8], анти- CD11b [M1/70] и антимышиным альбумином [Goat pAb/BETHYL Laboratories Inc. TX]). Окрашенные предметные стекла промывали и инкубировали с DAPI, фиксировали на Fluoromount-G (SouthernBiotech). Изображения были получены с использованием объектива 10× или 40× для флуоресцентной микроскопии (BX51; Olympus).

Статистический анализ

Кривые выживаемости анализировали с использованием логрангового критерия. Титр вируса анализировали с помощью двустороннего дисперсионного анализа (ANOVA). Для других данных были выполнены сравнения нормально распределенных непрерывных переменных с использованием двустороннего критерия Стьюдента для вычисления значимости между группами. Все тесты проводились в программе GraphPad Prism. Для сравнения двух непараметрических наборов данных использовали U-критерий Манна-Уитни. (*) $p \leq .05$; (**) $p \leq .01$; (***) $p \leq .001$; (****) $p \leq .0001$; не значимо (ns). Значения для всех измерений выражены как среднее или среднее $\pm$ стандартное отклонение. Эксперименты на мышах проводили с группами от 3 до 18 мышей. Каждый эксперимент обычно повторяли два-три раза.

Теперь будут описаны результаты этих экспериментов.

Сначала было оценено, модулирует ли локальная вирусная нагрузка у иммунизированных животных проницаемость ГЭБ головного мозга и является ли удаление вируса из ЦНС потенциально значимой стратегией для модулирования доступа к ЦНС иммунных клеток или медиаторов. Мышей дикого типа подкожно

инфицировали низкой дозой VSV, и заражали через пять недель летальной дозой VSV внутривенно, контролируя вирусную нагрузку в течение 10-дневного периода заражения. В то время как вирусная РНК была обнаружена в обонятельных луковицах обеих групп, как и ожидалось после и.н. доставки, неиммунизированные

5 мыши показали значительно более высокие уровни; низкий уровень вирусной РНК наблюдали в головном мозге и мозжечке зараженных мышей (Фигура 15A). Чтобы выяснить, приводит ли стратегия иммунизации с последующим местным вирусным заражением к изменениям проницаемости ГЭБ, в головном мозге иммунизированных и контрольных групп измеряли сывороточный альбумин.

10 Интраназальное повторное заражение мышей, иммунизированных VSV, приводило к временной проницаемости ГЭБ, в то время как у неиммунизированных мышей наблюдалась прогрессирующее просачивание через ГЭБ (Фигура 15B). Сосудистое нарушение в головном мозге было обнаружено со 2-го по 6-й день после интраназального заражения у иммунизированных мышей с

15 пиком на 4-й день после интраназального заражения, но целостность ГЭБ восстанавливалась по мере выздоровления животных от инфекции (Фигура 15C). Напротив, проницаемость ГЭБ прогрессировала у неиммунизированных мышей в соответствии с их вирусной нагрузкой; эти мыши умерли от вирусной инфекции между 8 и 12 днями после интраназального заражения (Фигура 15C). Не

20 ограничиваясь какой-либо теорией, был сделан вывод, что системная вирусная иммунизация приводит к защите от локальной вирусной инфекции ЦНС, а резистентность коррелирует с временной проницаемостью ГЭБ.

Повышенный клиренс и сниженная вирусная нагрузка, наблюдаемые при и.н. заражении у мышей, иммунизированных VSV, предполагает возможную

25 временную проницаемость ГЭБ в механизмах резистентности. Чтобы определить, повышает ли временная проницаемость ГЭБ резистентность у VSV-вакцинированных мышей за счет увеличения доступа защитного антитела к мозгу, во время заражения VSV измеряли проникновение антител в нейрональную ткань. В соответствии со временем проницаемости ГЭБ было обнаружено значительное

30 повышение общего уровня IgG в ткани головного мозга на 4 и 6 день, но не на 10 день после заражения (Фигура 15D). Соответственно, на 2, 4 и 6 день после заражения у иммунизированных мышей также обнаруживали повышенное содержание антител, специфичных к VSV (Фигура 15E). Пик антител IgG у VSV-иммунизированных мышей наблюдался на 4-й день, в то время как у

неиммунизированных мышей наблюдался повышенный уровень IgG на 10-й день; следовательно, в обеих группах инфильтрирующие антитела коррелировали с пиком проницаемости ГЭБ, однако позднее увеличение у неиммунизированных мышей было недостаточным для обеспечения защиты (Фигура 15C). Для

5 непосредственного решения вопроса о том, было ли повышение уровня антител необходимым для элиминации вируса, мышей с двойным нокаутом (AID sIgM DKO) с дефицитом по аденозиндезаминазе, индуцированным активацией (AID^{-/-}) и дефицитом секреторного IgM (sIgM^{-/-}) подвергали к стратегии иммунизации против вируса VSV. В отличие от мышей дикого типа, мыши, иммунизированные AIDxIgM

10 DKO, погибали от интраназального заражения VSV между 9 и 12 днями после заражения (Фигура 15F). В соответствии с защитной ролью антител против VSV перенос моноклонального антитела против VSV (mAb) или иммунная сыворотка против VSV защищали мышей, иммунизированных AIDxIgM DKO, по сравнению с мышами, получавшими изотипическое контрольное антитело или сыворотку WT

15 (Фигура 15G). Эти данные свидетельствуют о том, что антитела необходимы для элиминации вируса VSV в ЦНС при местном заражении.

На мышинной модели инфекции генитального герпеса ранее было продемонстрировано, что вирусспецифичные CD4⁺ Т-клетки памяти мигрируют в ганглии задних корешков (DRG) и спинной мозг, секретируя интерферон (IFN) γ ,

20 который, в свою очередь, опосредует локальное повышение проницаемости сосудов, обеспечивая доступ к антителам для борьбы с вирусом (Iijima and Iwasaki, 2016, Nature, 533:552-556). Чтобы выяснить, связан ли доступ антител к ткани головного мозга с локальным рекрутингом CD4 Т-клеток памяти, популяции Т-клеток анализировали на 6-й день после инфицирования VSV-иммунизированных

25 или неиммунизированных мышей. Примечательно, что CD4 Т-клетки, продуцирующие IFN γ , были обнаружены только у мышей, иммунизированных VSV (Фигура 15H). Локальные IFN γ -продуцирующие CD4 Т также были обнаружены у VSV-иммунизированных мышей AIDxIgM DKO, что дополнительно указывает на то, что у этих мышей отсутствовали только нижестоящие эффекторные механизмы

30 защиты, опосредованные антителами (Фигура 15H). Эти результаты подтверждают возможность того, что защита, обеспечиваемая VSV-иммунизацией, опосредуется локально рекрутируемыми, вирус-специфическими IFN γ -продуцирующими CD4 Т-клетками (Фигура 14D).

После создания модели, основанной на инфекции/локальной стимуляции, которая временно открывает ГЭБ для доступа защитных антител, была разработана терапевтическая стратегия локальной доставки антител в ЦНС. В этой стратегии впервые использовали мышиную модель генитального герпеса (HSV-2), связанную с локальной и.н. доставкой вирусных антигенных пептидов в качестве иммунотерапевтической платформы. Две взаимодополняющие стратегии использовали для развития HSV-2-специфичного ответа Т-клеток памяти CD4+ (Фигура 16А). Мышей иммунизировали посредством HSV-ТК подкожно (п.к.) или получали адоптивный перенос HSV-специфичных CD4 Т-клеток от трансгенных мышей. с gDTII-специфичным DsRed (HSV-реактивный TCR Tg). Через пять недель после HSV-иммунизации или через 24 часа после переноса HSV-реактивных TCR Tg Т-клеток SV-иммунизированным мышам вводили 1 или 3 дозы пептидов gDTII, I-Ab-ограниченного эпитопа HSV-2, расположенного в гликопротеине D, или пептидов RVG-gDTII (гликопротеин вируса бешенства, ассоциированный с пептидом gDTII). В качестве контрольного иммуногена использовали гликопротеин вируса бешенства, ассоциированный с пептидами овальбумина (RVG-OVA). Аналогично тому, что наблюдалось при заражении живым вирусом, т.е. доставка TCR-специфических вирусных антигенных пептидов иммунизированным мышам приводила к проницаемости ГЭБ на 4-й день, что позволяло антителу проникать в ЦНС (Фигура 16В - Фигура 16Е). Кроме того, лечение антигенными пептидами индуцировало рекрутирование IFN γ -продуцирующих поликлональных и трансгенных CD4+ TCR gDTII Т в головной мозг у мышей, которым и.н. вводили RVG-gDTII или gDTII соответственно (Фигура 16F). Не ограничиваясь какой-либо теорией, был сделан вывод, что локальная доставка TCR-специфичных вирусных антигенных пептидов может использоваться в качестве терапевтической стратегии для борьбы с вирусной инфекцией ЦНС.

Затем оценивали, координируют ли Т-клетки памяти CD4+, продуцирующие IFN γ , также увеличение проницаемости ГЭБ и доступ антител к ЦНС после интраназальной доставки вирусных антигенных пептидов. gDTII-специфичные Т-клетки адоптивно переносили и стимулировали с использованием антигенных пептидов. Предпочтительная проницаемость ГЭБ наблюдалась, когда антигенные пептиды вводили с адоптивно перенесенными Т-клетками CD4, а не когда вводили контрольные пептиды (Фигура 16С).

Далее оценивали эффективность терапевтической стратегии локальной доставки антигенных пептидов в нейрональной ткани при летальном гетерологичном заражении. Мышей иммунизировали посредством TK-HSV-2, и вводили иммуногенные пептиды. На 1, 3 и 5 день после введения пептидов мышам
 5 внутрибрюшинно инъецировали 5 мкг/500 мкл/мышь mAb против VSV с последующим интраназальным заражением посредством VSV на 7 день, и отслеживали выживаемость. Мыши, которые были предварительно иммунизированы и получили антигенный пептид, демонстрировали предпочтительную защиту от заражения гетерологичным VSV (Фигура 17C).

10 Чтобы выяснить, можно ли использовать временную проницаемость ГЭБ, вызванную локальной доставкой антигенного пептида, для повышения эффективности антител против гетерологичного нейротропного вируса, была протестирована пептидная терапия, специфичная для HSV-2, против летальной инфекции VSV. Подобно экспериментам, описанным на Фигуре 16, мышей
 15 иммунизировали посредством HSV-TK подкожно (п/к) или получали адоптивный перенос наивных HSV-специфичных CD4 Т-клеток. Через пять недель после HSV-иммунизации или через 24 часа после переноса HSV-реактивных TCR Tg Т-клеток HSV-иммунизированных мышей обрабатывали пептидами gDTII. Мыши получали нейтрализующие моноклональные антитела против VSV или изотипические
 20 контрольные антитела в трех дозах во время открытия ГЭБ после и.н. введения пептида HSV-2 и последующего введения летальной дозы и.н. VSV. Моноклональные антитела против VSV предотвращали распространение вируса и смертность у мышей, иммунизированных HSV-2, которым вводили и.н. пептид HSV-2 (Фигура 17D и Фигура 17E). Эти результаты свидетельствуют о том, что
 25 локальная доставка антигенных пептидов может эффективно использоваться по желанию для защиты от гетерологичной инфекции.

Наконец, авторы настоящего изобретения оценили, можно ли использовать временную проницаемость ГЭБ для увеличения доступа к ЦНС антител, используемых для иммунотерапии блокады иммунных контрольных точек. HSV-2-
 30 специфичную пептидную терапию тестировали на модели глиобластомы. Мышей иммунизировали посредством HSV-TK подкожно (п.к.) и через пять недель осуществляли внутрочерепную имплантацию 50.000 опухолевых клеток. Через шесть дней после имплантации опухоли мышам вводили пептиды gDTII или пептиды OVA. Экспериментальные и контрольные мыши получали анти-PD1

антитела или изотипические антитела на 9-й и 11-й дни после имплантации опухоли. Размер опухоли измеряли на 4-й день для нормализации дисперсии, а затем на 16-й и 23-й день с использованием люминесценции (Фигура 18А). Обработка PD1-антителом не была эффективной в качестве монотерапии у мышей, не получавших терапию антигенными пептидами (Фигура 18В). Однако анти-PD1 терапия предотвращала рост опухоли и значительно улучшала выживаемость мышей с HSV-2-иммунизацией и HSV-2 и.н. пептидной стимуляцией (Фигура 18В). Стратегия антигенных пептидов представляет собой новый метод усиления терапии ингибиторами иммунных контрольных точек за счет увеличения эффективной дозы в центральной нервной системе в обход ГЭБ.

В совокупности эти результаты позволяют предположить, что использование антигенных пептидов потенциально может привести к созданию новой терапевтической платформы для доставки моноклональных антител или лекарств для борьбы с нейротропными патогенами и опухолями головного мозга.

15

Пример 3: CD4⁺ Т-клеточная терапия для доставки лекарственного средства через ГЭБ

Метастазы в головной мозг трудно поддаются лечению, потому что либо эффективные методы лечения не могут проникнуть через ГЭБ, либо не могут достичь адекватных концентраций в среде микроопухоли. Метастазы в головной мозг предвещают высокую смертность с выживаемостью 8,1% через 2 года и 2,4% выживаемостью через 5 лет. Нейрохирургическое иссечение и лучевая терапия невозможны или неэффективны для некоторых пациентов.

Для активации адаптивного иммунного ответа были разработаны специфичные для пациента или опухоли пептиды. Это обеспечивает временный и определенный доступ лекарственных средств и биологических препаратов к ЦНС. Эта технология позволяет доставлять любые лекарственные средства или биологические препараты в ЦНС.

Антиген-специфичные CD4⁺ Т-клетки ЦНС могут опосредовать открытие ГЭБ. CD4⁺ Т-клетки проникают в периваскулярное пространство посткапиллярной вены и стимулируются периваскулярными антигенпрезентирующими клетками (АПК), которые презентуют вирусный антиген и стимулируют секрецию IFN-γ. IFN-γ действует на EC сосудов и подавляет белки плотных контактов.

Интраназальная доставка пептидов МНС класса II может открывать ГЭБ (Фигура 19). Пептиды будут следовать по обонятельным нервам, чтобы войти в ЦНС, чтобы стимулировать CD4 Т-клетки. CD4 Т-клетки продуцируют гамма-интерферон, чтобы открыть ГЭБ на несколько дней. Стимуляция Т-клеток интраназальным пептидом (IN) позволяет биопрепаратам-ингибиторам иммунных контрольных точек получить доступ к ткани головного мозга и лечить опухоль. Можно использовать уже существующие CD4 Т-клетки. В модели метастатической глиобластомы выживаемость значительно улучшается при совместном введении IN и биопрепаратов-ингибиторов иммунных контрольных точек. Пептиды RVG-gDT (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGGCCIPPNWHIPSIQDA; SEQ ID NO:89) и пептиды gDT (gD315-327, IPPNWHIPSIQDA; SEQ ID NO:90) использовали в качестве антигенных пептидов во всех этих экспериментах.

Описание каждого патента, патентной заявки и публикации, цитируемых в настоящем документе, настоящим полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Хотя это изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие варианты осуществления и вариации этого изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области техники без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Предполагается, что прилагаемая формула изобретения включает все такие варианты осуществления и эквивалентные варианты.

ФОРМУЛА ИЗОБЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения заболевания или нарушения головного мозга, центральной нервной системы или спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта, включающий стадии, на которых:

а) вводят иммуногенный агент для индукции иммунного ответа, тем самым индуцируя проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у субъекта; и

б) вводят по меньшей мере один терапевтический агент для лечения заболевания или нарушения.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что иммуногенный агент представляет собой антигенный белок или пептид для индукции CD4 T-клеточного иммунного ответа.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что иммуногенный агент включает антигенный пептид MHC класса II.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что иммуногенный агент включает пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:5 - SEQ ID NO:90.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере один терапевтический агент включает ингибитор белка иммунной контрольной точки.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что белок иммунной контрольной точки выбран из группы, состоящей из PD-1, PDL-1 CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT и CEACAM1.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, BMS-986016, BMS-936559, MPDL3280A, MDX1105-01, MEDI4736, TSR-022, CM-24 и MK-3475.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что заболевание или нарушение включает опосредованную патогеном инфекцию, выбранную из группы, состоящей из вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции, прионной инфекции и гельминтной инфекции.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ лечит или предотвращает воспаление, связанное с инфекцией.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ лечит или предотвращает состояние, связанное с инфекцией, выбранное из группы, состоящей из энцефалита, менингита, менингоэнцефалита, эпидурального абсцесса, субдурального абсцесса, абсцесса головного мозга и прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии (PML).

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ лечит или предотвращает рак.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, который специфически связывается с опухолеспецифическим или опухолеассоциированным антигеном.

13. Композиция для лечения или предотвращения заболевания или нарушения головного мозга, центральной нервной системы или спинного мозга у нуждающегося в этом субъекта, содержащая:

а) антигенный белок или пептид для индукции CD-4 Т-клеточного иммунного ответа у субъекта, индуцирующий таким образом проницаемость ГЭБ; и

б) по меньшей мере один терапевтический агент для лечения заболевания или нарушения.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что антигенный белок или пептид включает антигенный пептид MHC класса II.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что антигенный белок или пептид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:5 - SEQ ID NO:90.

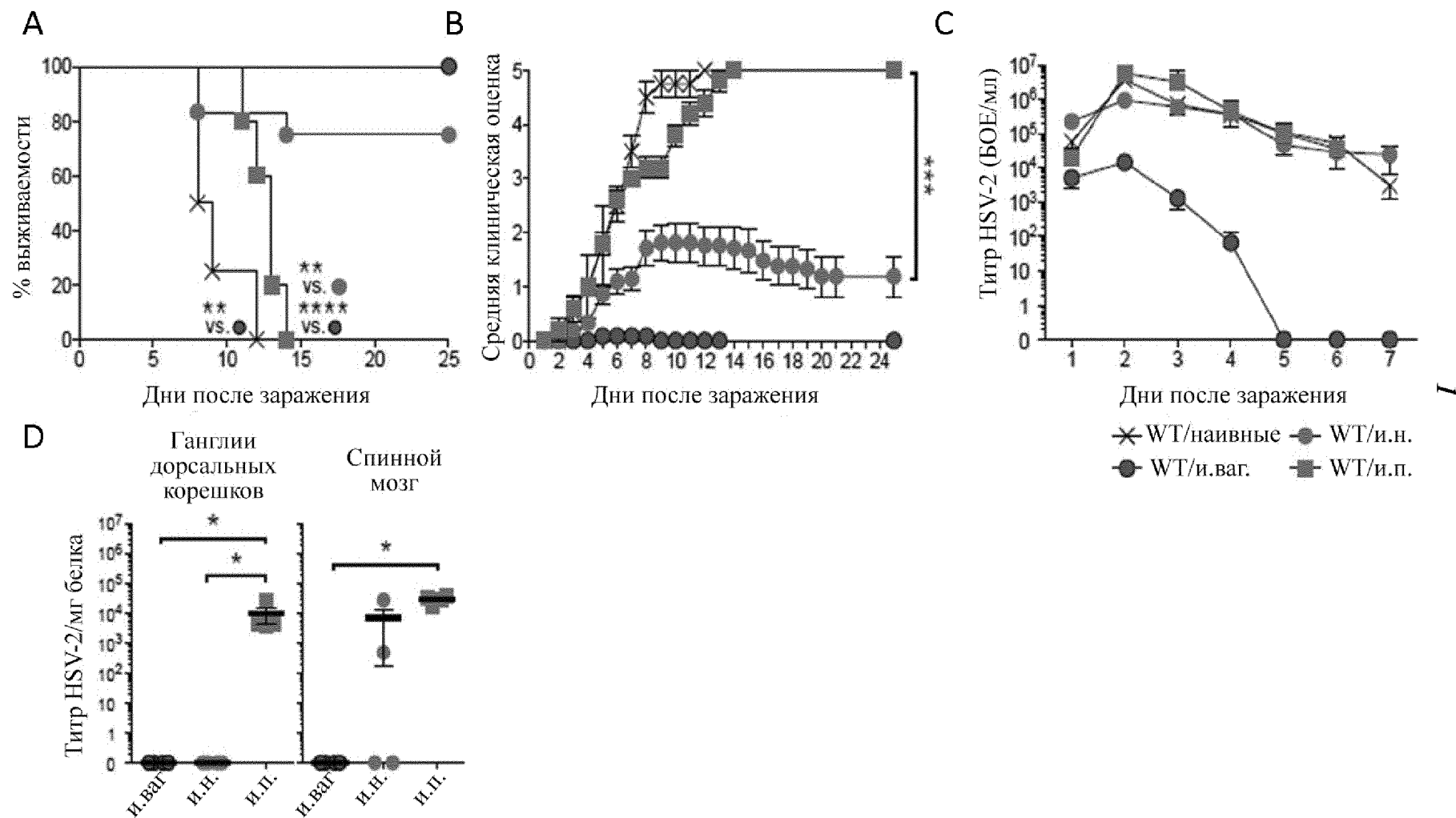
16. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что по меньшей мере один терапевтический агент включает ингибитор белка иммунной контрольной точки.

17. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что белок иммунной контрольной точки выбран из группы, состоящей из PD-1, PDL-1 CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT и CEACAM1.

18. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, BMS-986016, BMS-936559, MPDL3280A, MDX1105-01, MEDI4736, TSR-022, CM-24 и MK-3475.

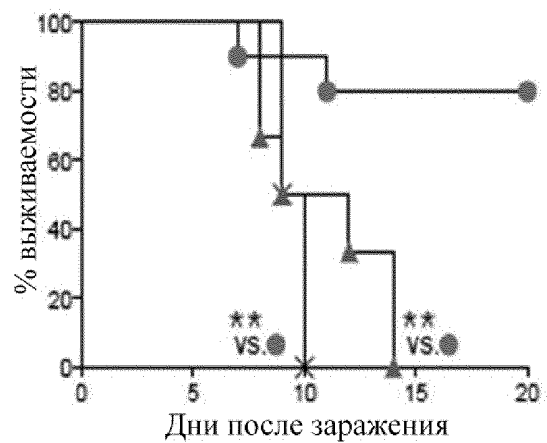
19. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что терапевтический агент включает антитело или фрагмент антитела, который связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

20. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции, прионной инфекции, гельминтной инфекции, энцефалита, менингита, менингоэнцефалита, эпидурального абсцесса, субдурального абсцесса, абсцесса головного мозга, прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии (PML) и рака.



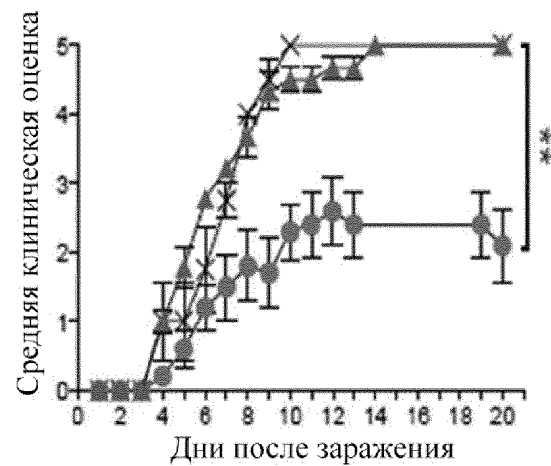
ФИГ. 1А-ФИГ.1D

E

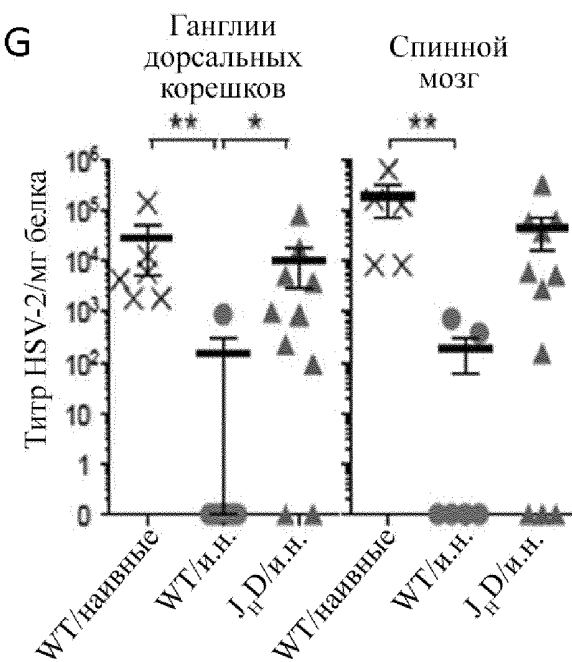


× WT/наивные ● WT/и.н. ▲ J_HD/и.н.

F

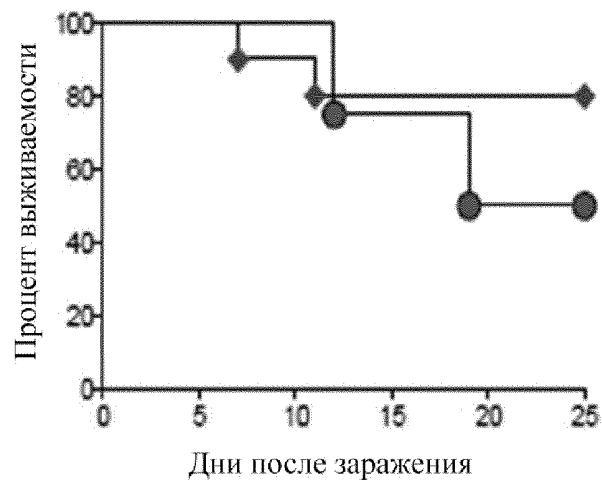


G

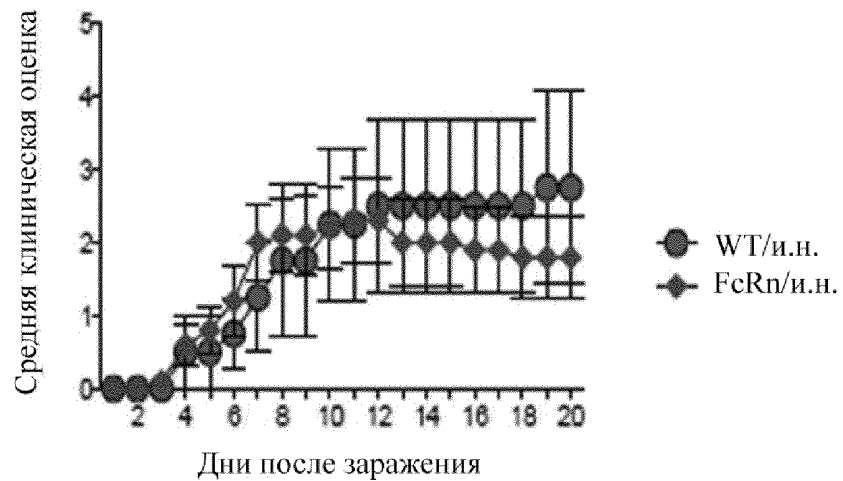


ФИГ. 1Е-ФИГ.1G

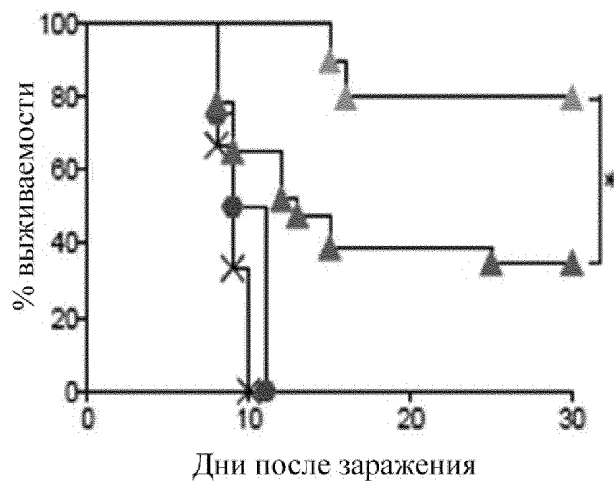
A



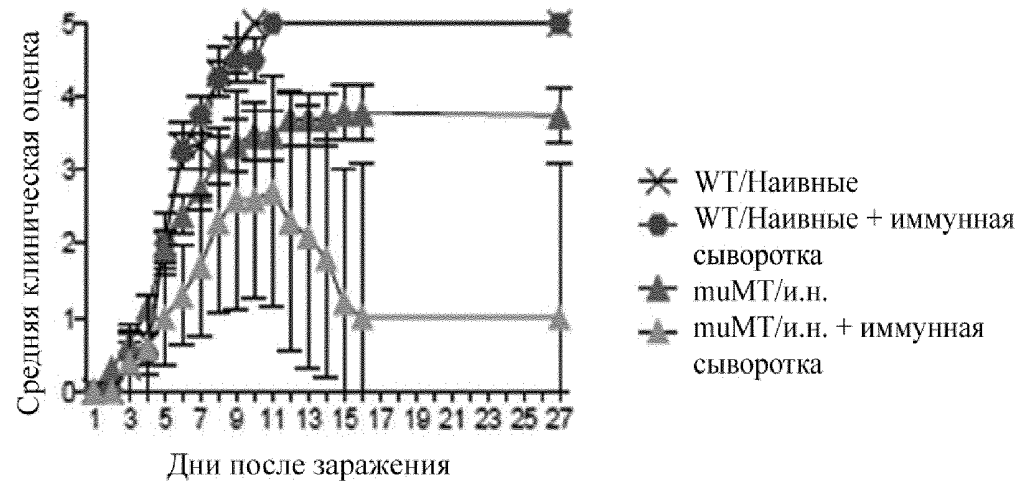
B



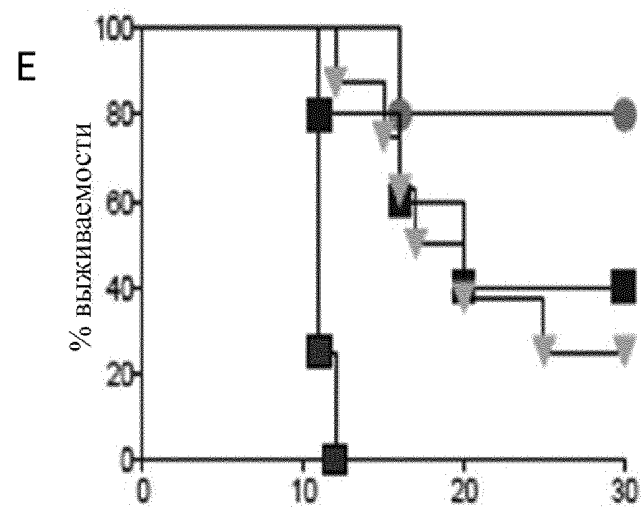
C



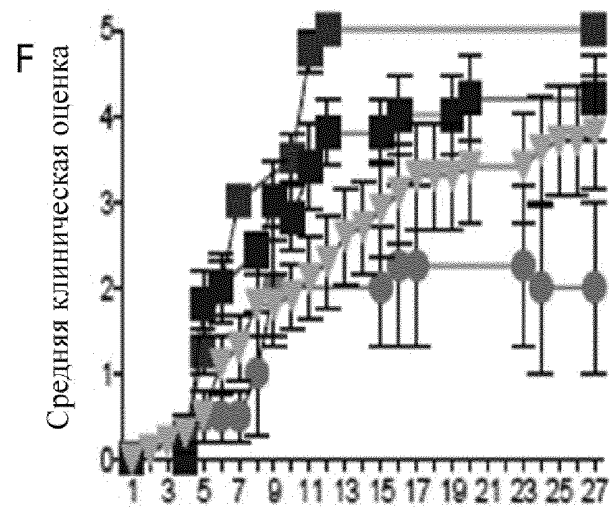
D



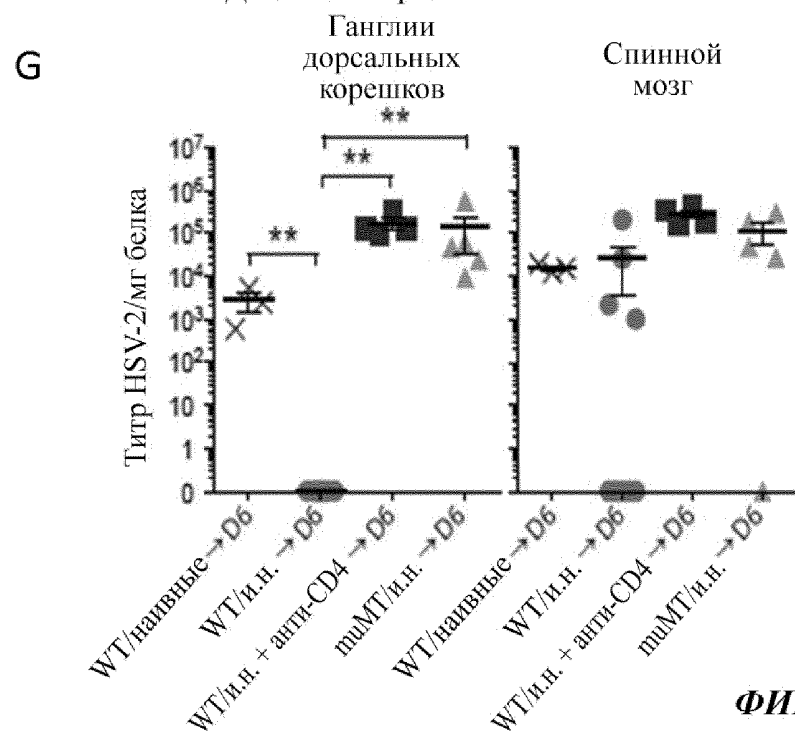
ФИГ. 2А-ФИГ. 2D



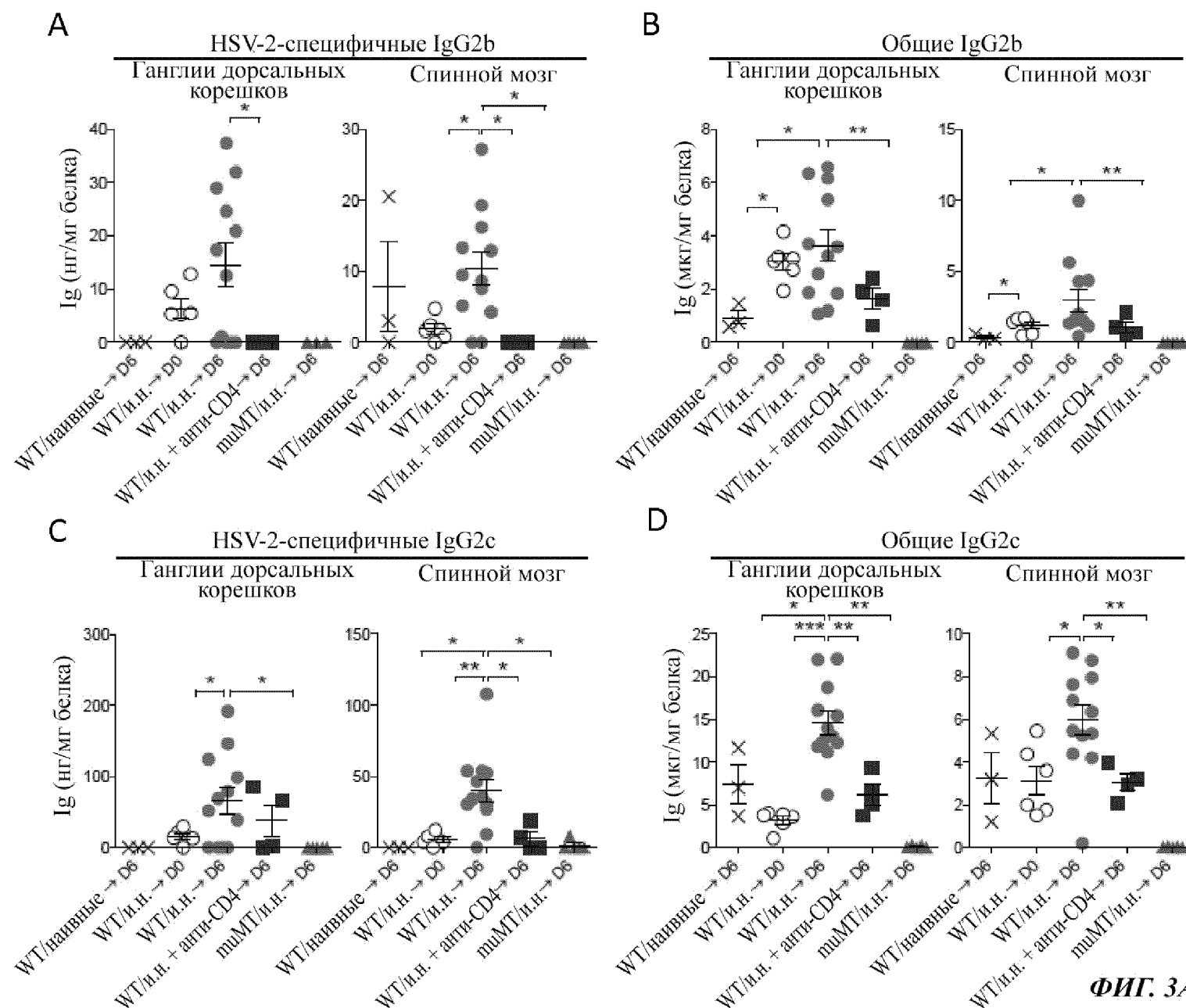
Дни после заражения



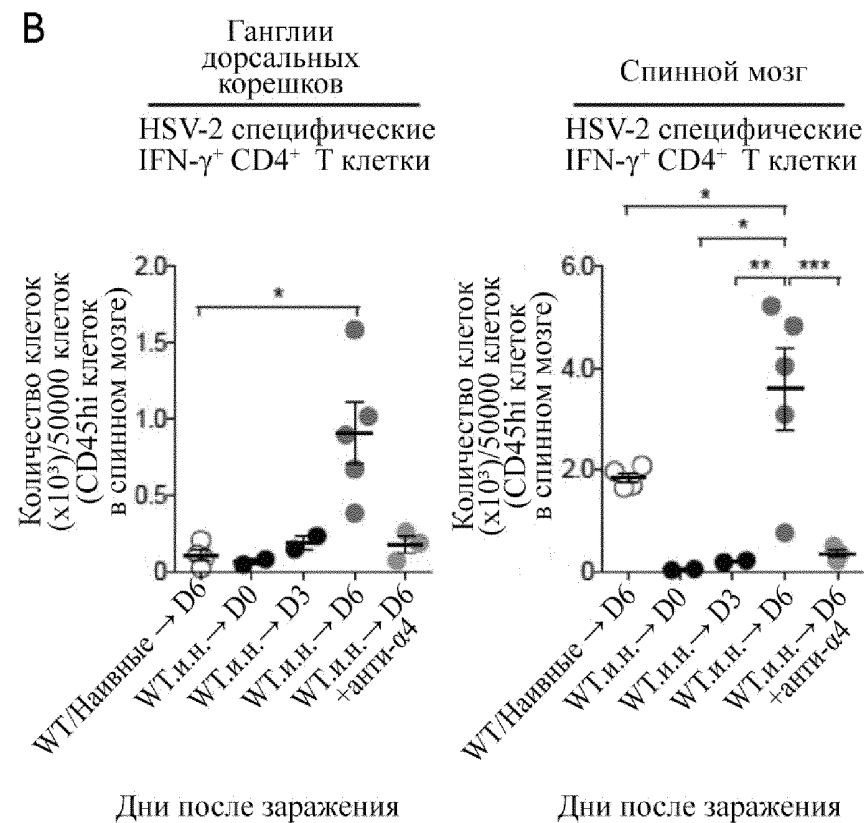
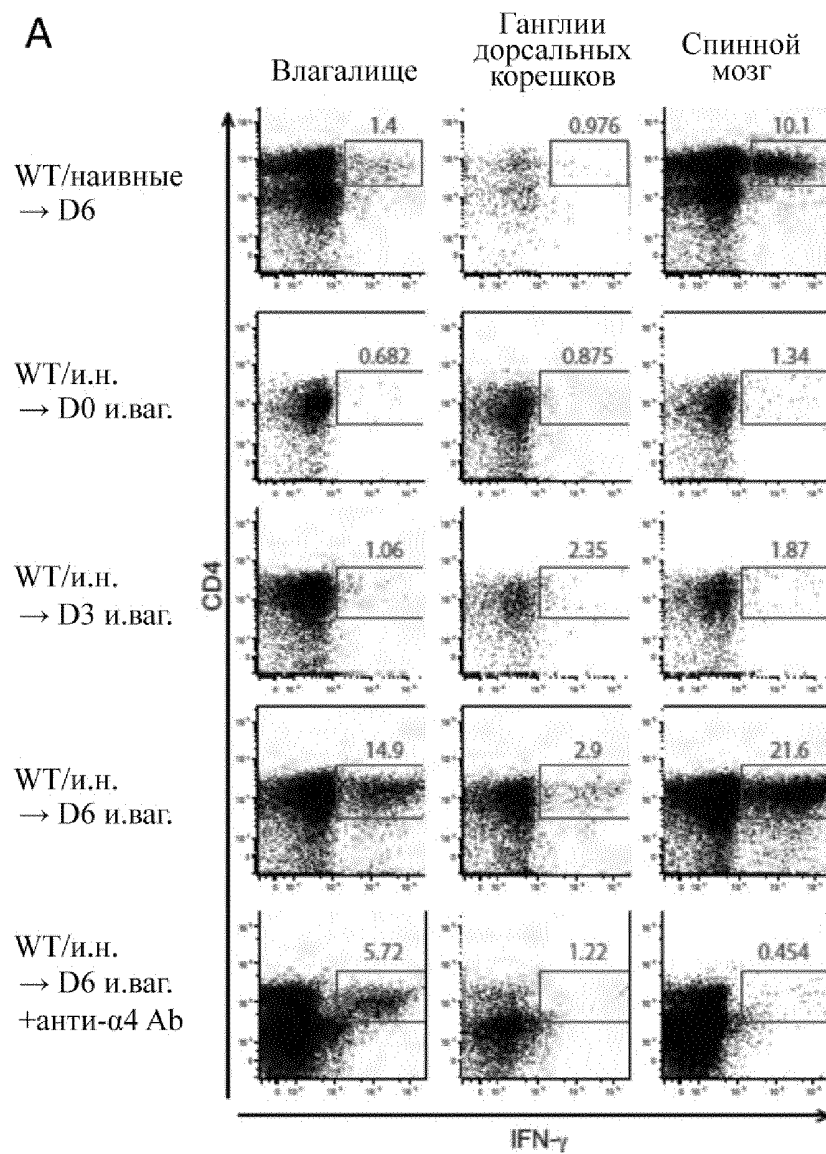
Дни после заражения



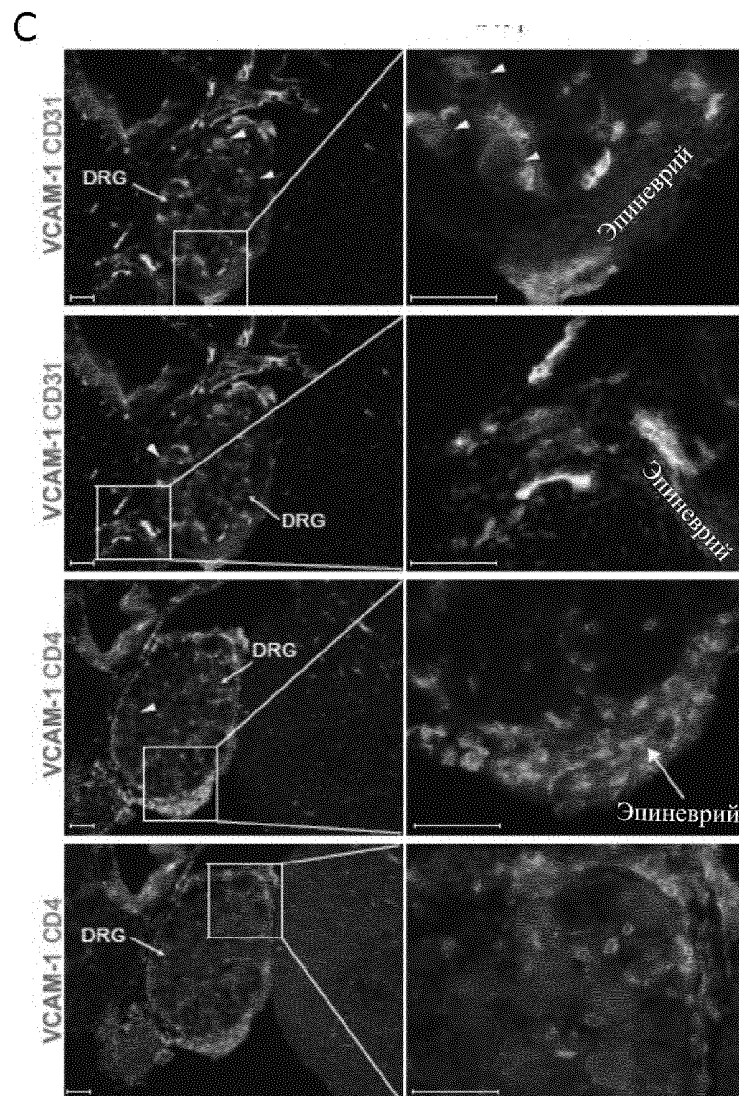
ФИГ. 2Е-ФИГ.2Г



ФИГ. 3А-ФИГ.3D

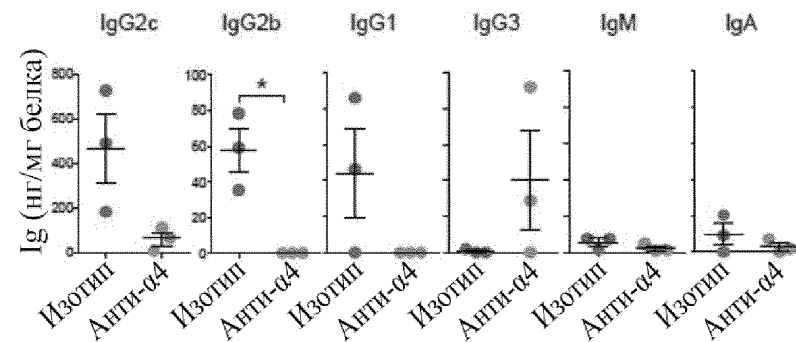


ФИГ. 4А-ФИГ.4В

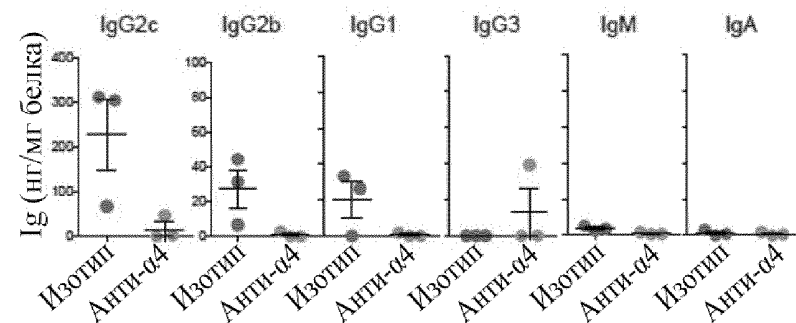


*DRG - Ганглии дорсальных корешков

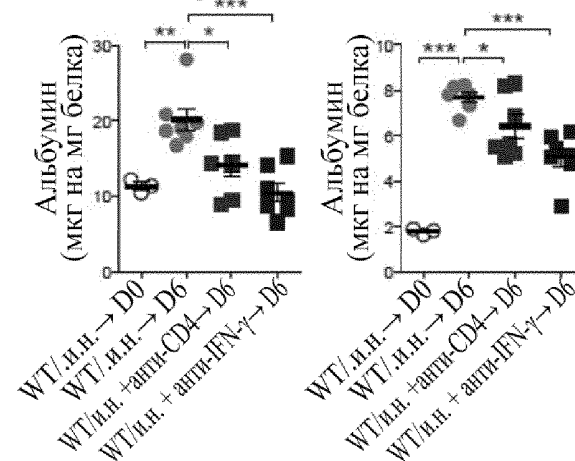
D HSV-2-специфичные Ig в ганглиях дорсальных корешков



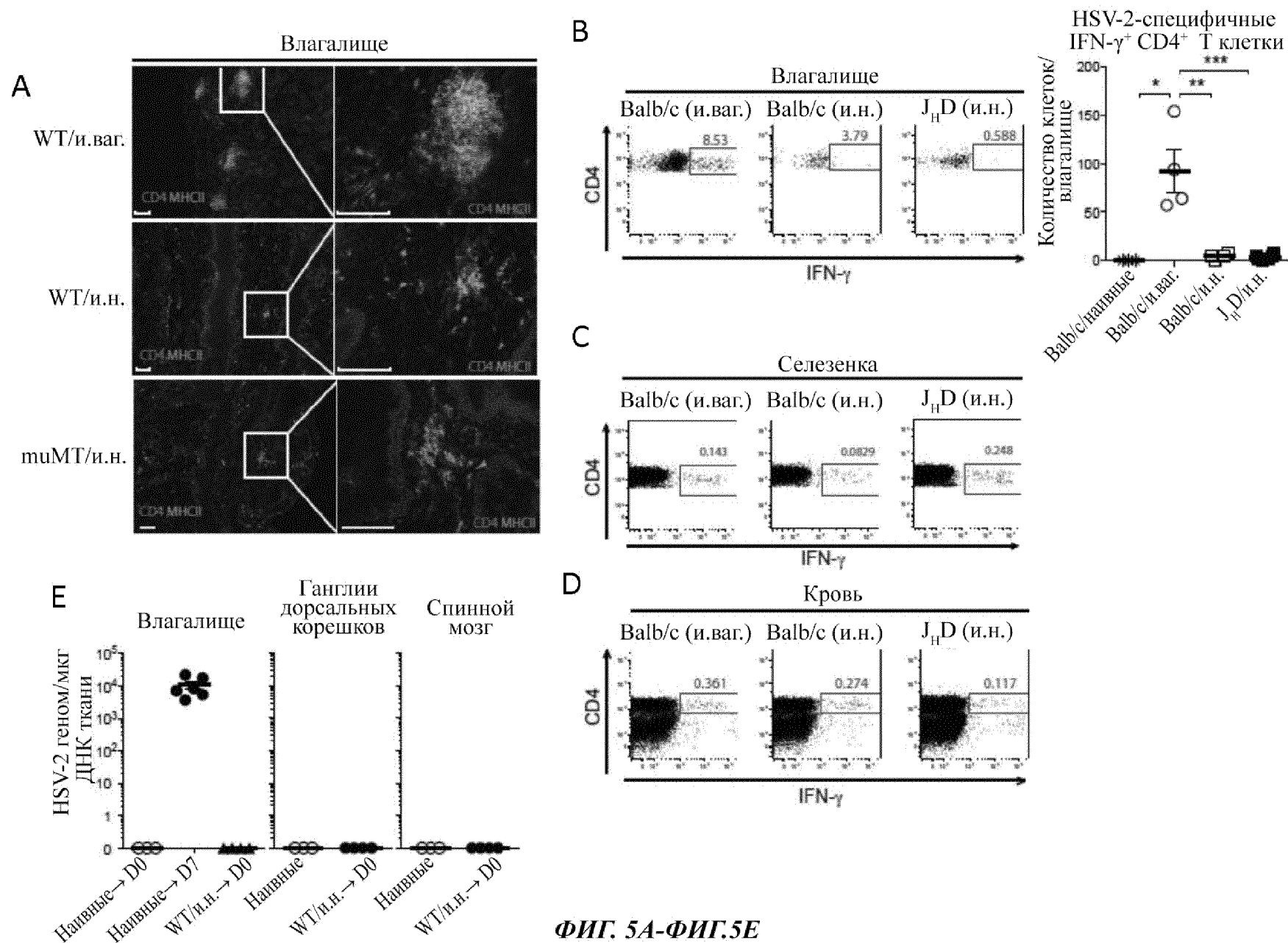
E HSV-2-специфичные Ig в спинном мозге



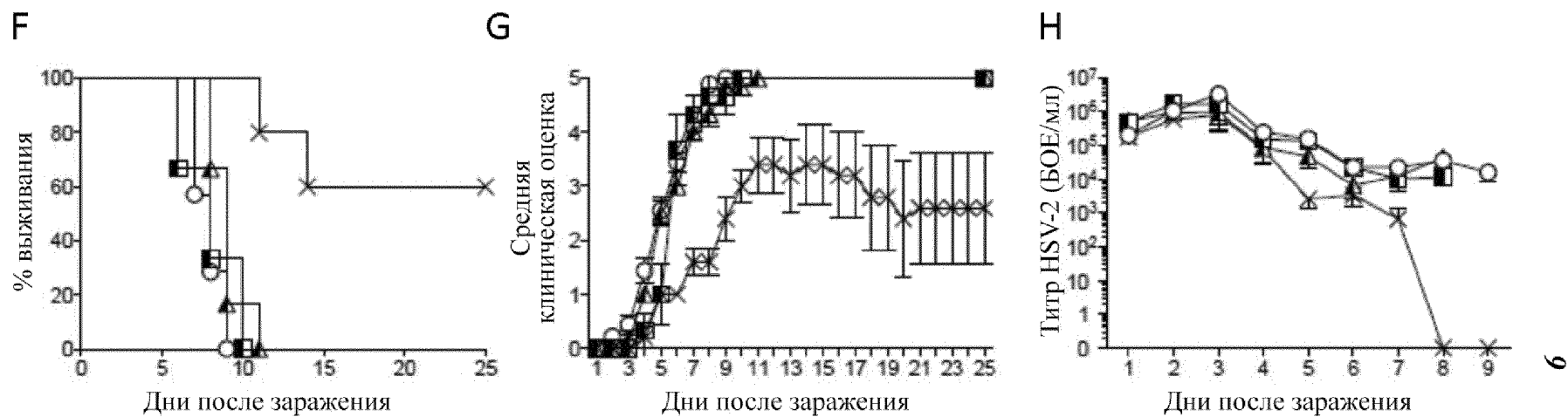
F Ганглии дорсальных корешков Спинной мозг



ФИГ. 4С-ФИГ.4F

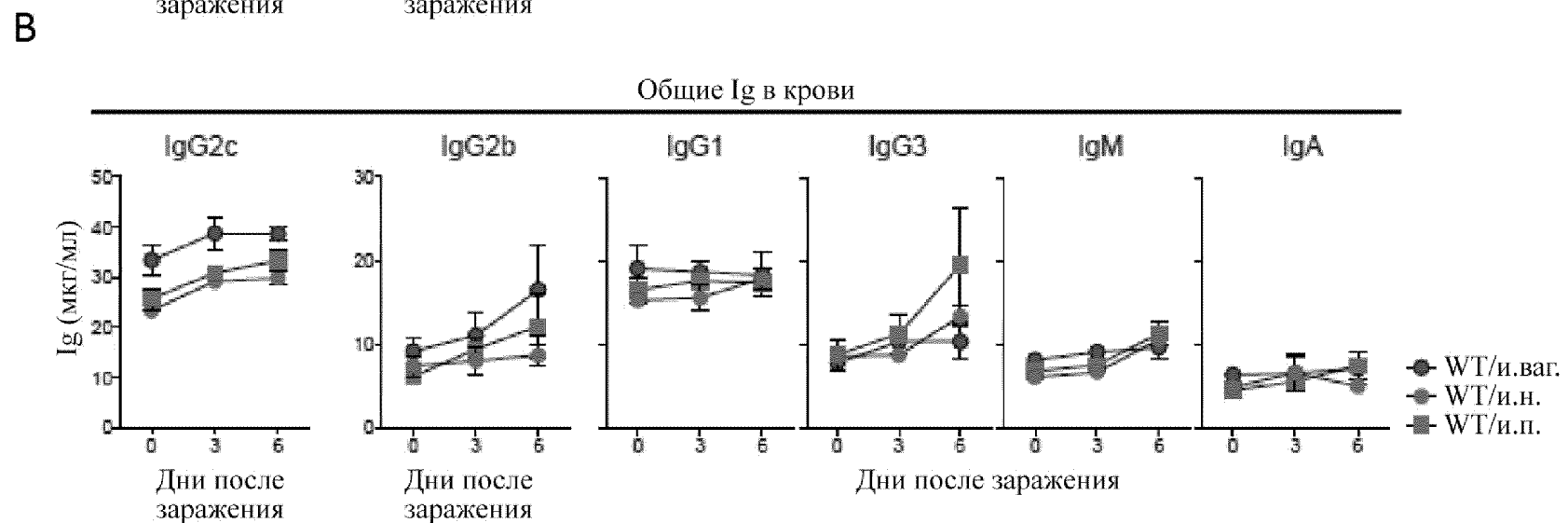
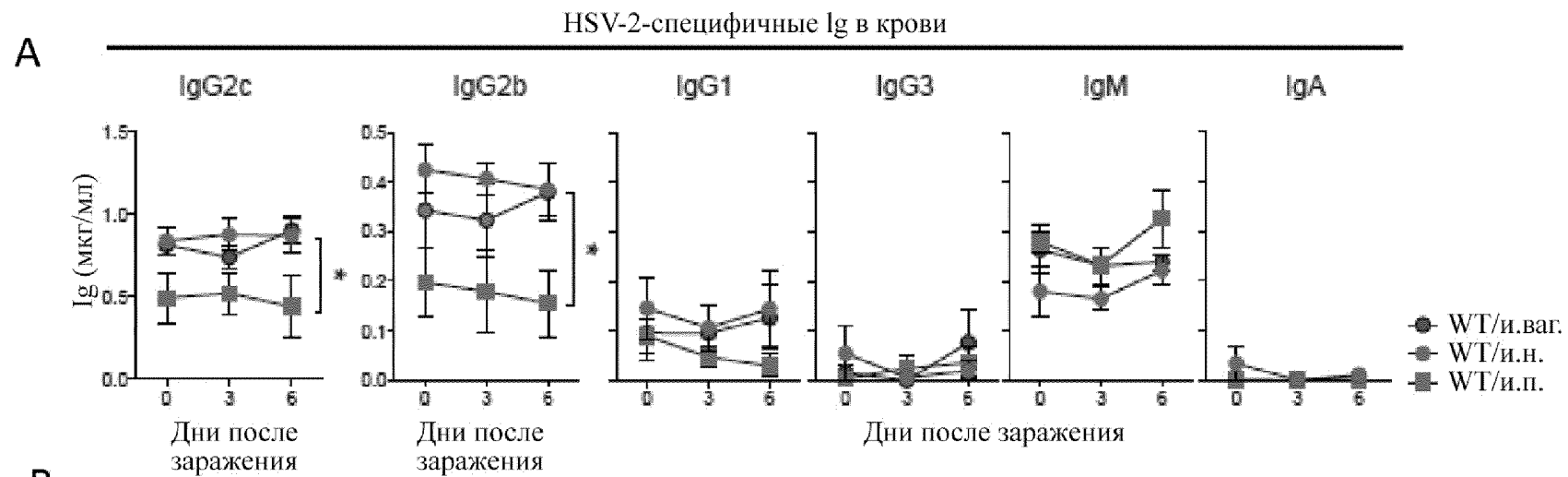


ФИГ. 5А-ФИГ.5Е



№ группы	Символ	Левый партнер	Правый партнер	Заражение вирусом	Количество пар
1	○		Наивные WT	Правый партнер	7
2	×	Иммун. WT	Наивные WT	Правый партнер	7
3	■	Иммун./ tuMT	Наивные WT	Правый партнер	3
4	▲	Иммун. HEL	Наивные WT	Правый партнер	6

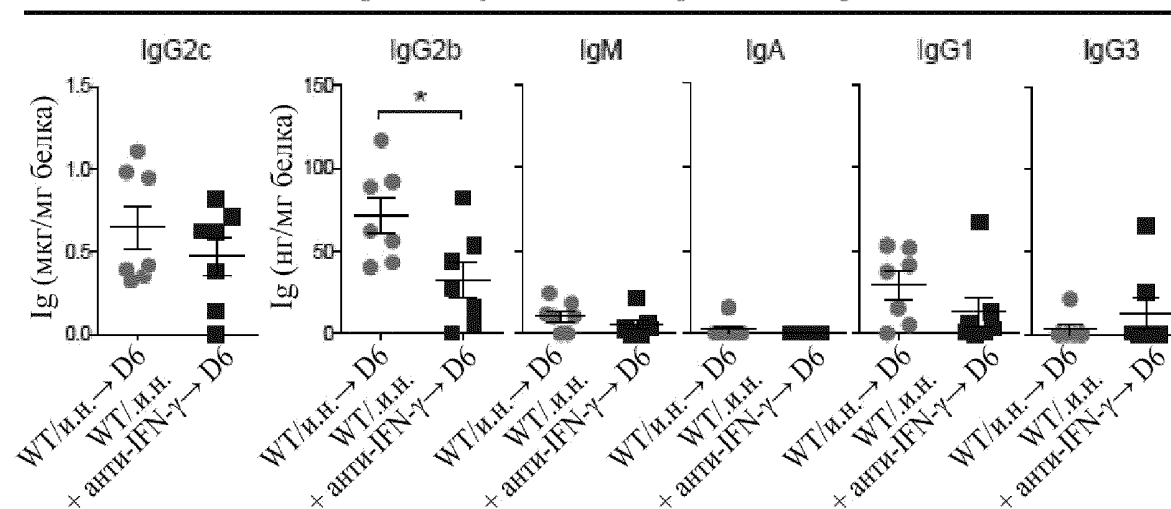
ФИГ. 5F-ФИГ.5H



ФИГ. 6А-ФИГ.6В

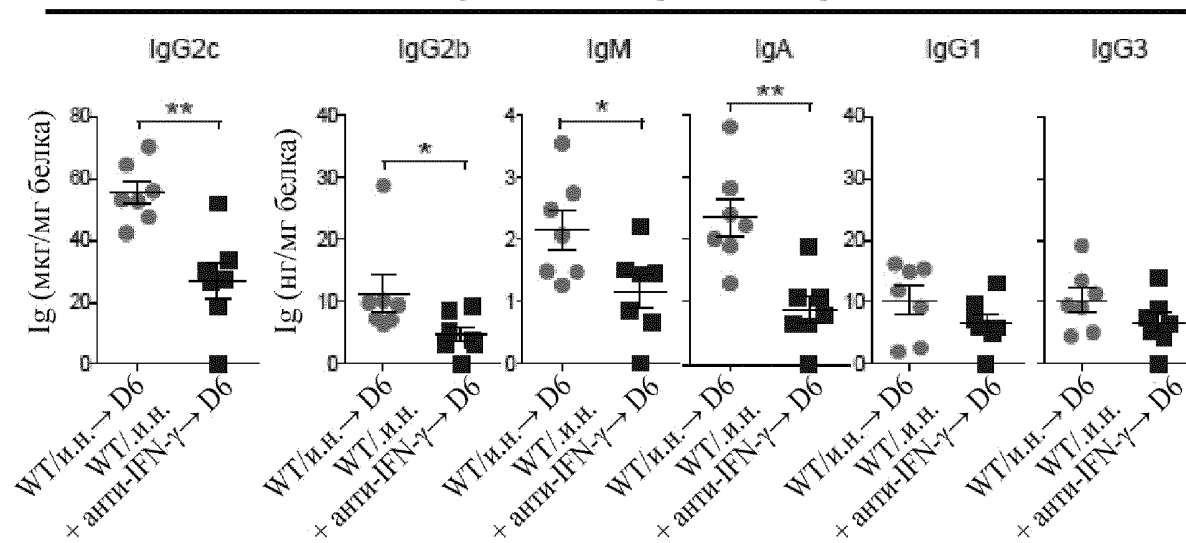
A

HSV-2-специфичные Ig в ганглиях дорсальных корешков

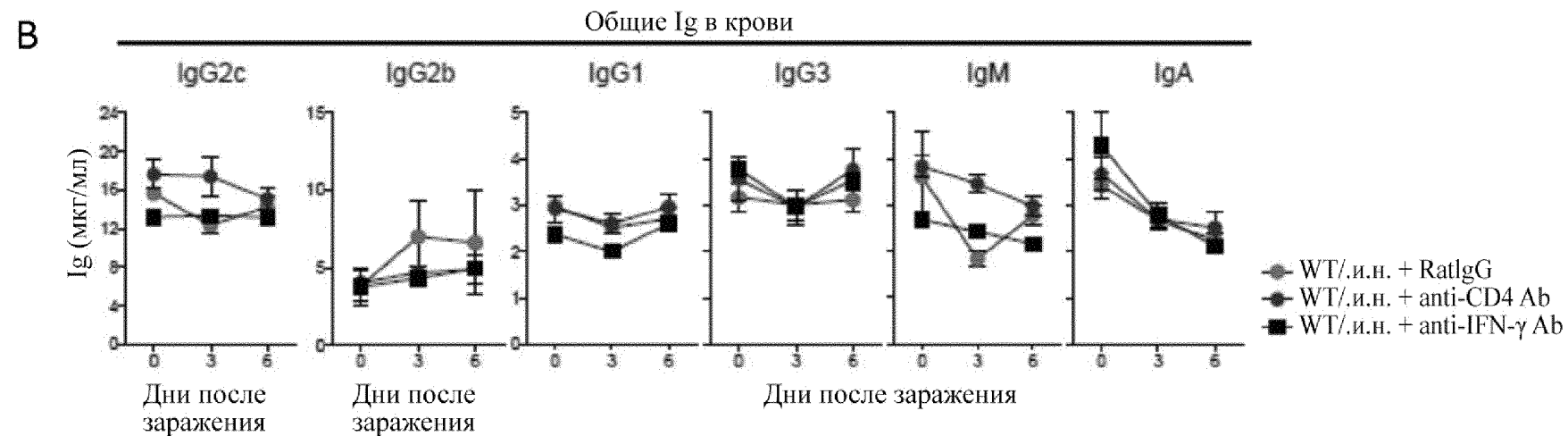
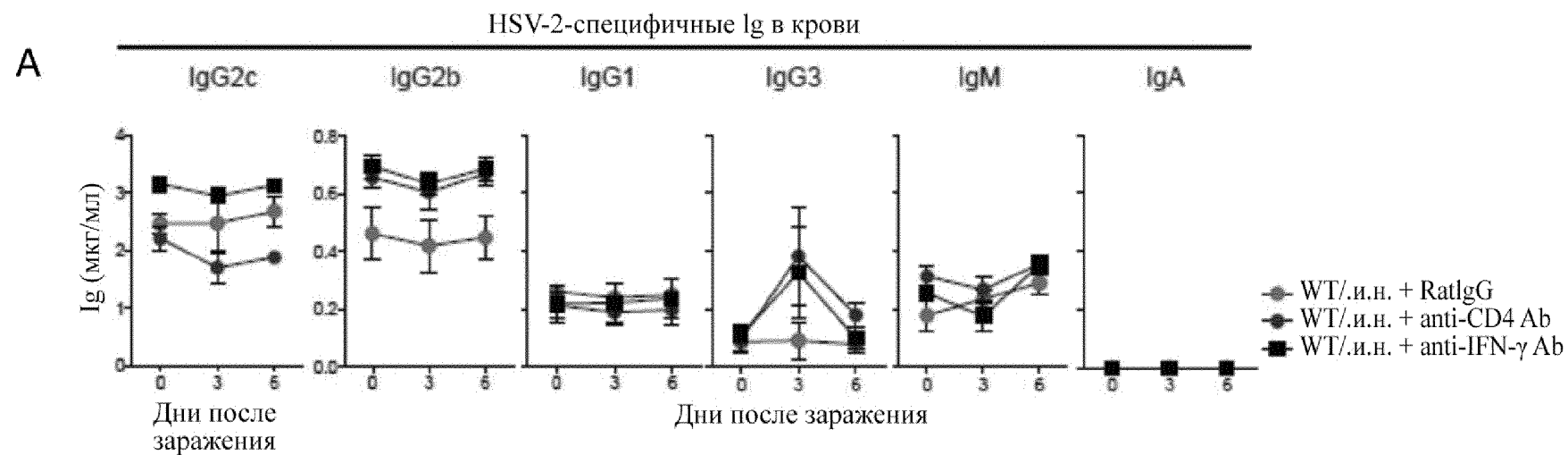


B

Общие Ig в ганглиях дорсальных корешков

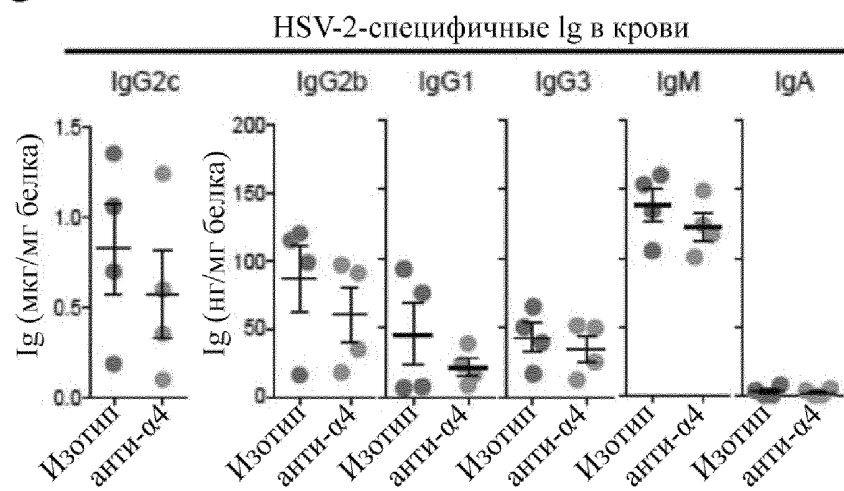


ФИГ. 7А-ФИГ.7В

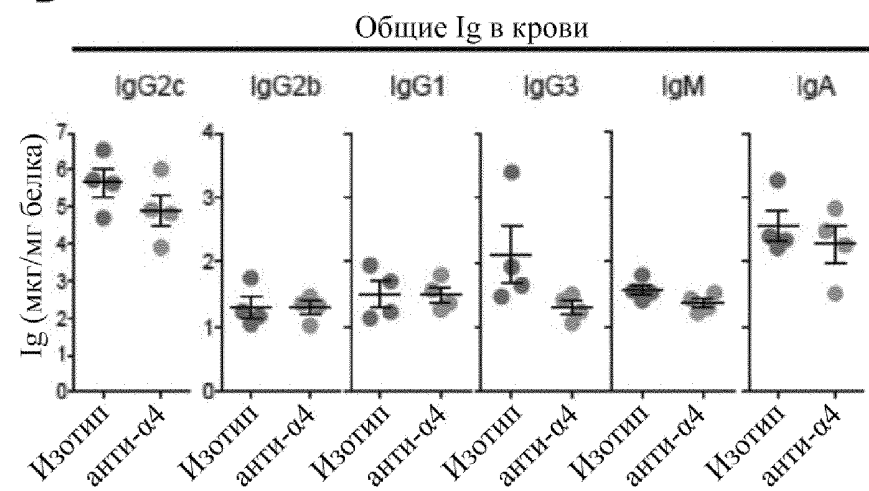


ФИГ. 8А-ФИГ.8В

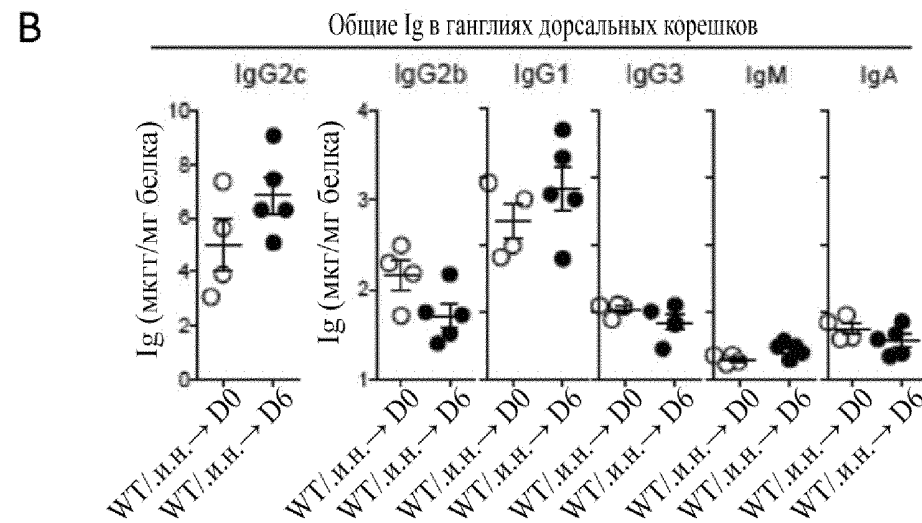
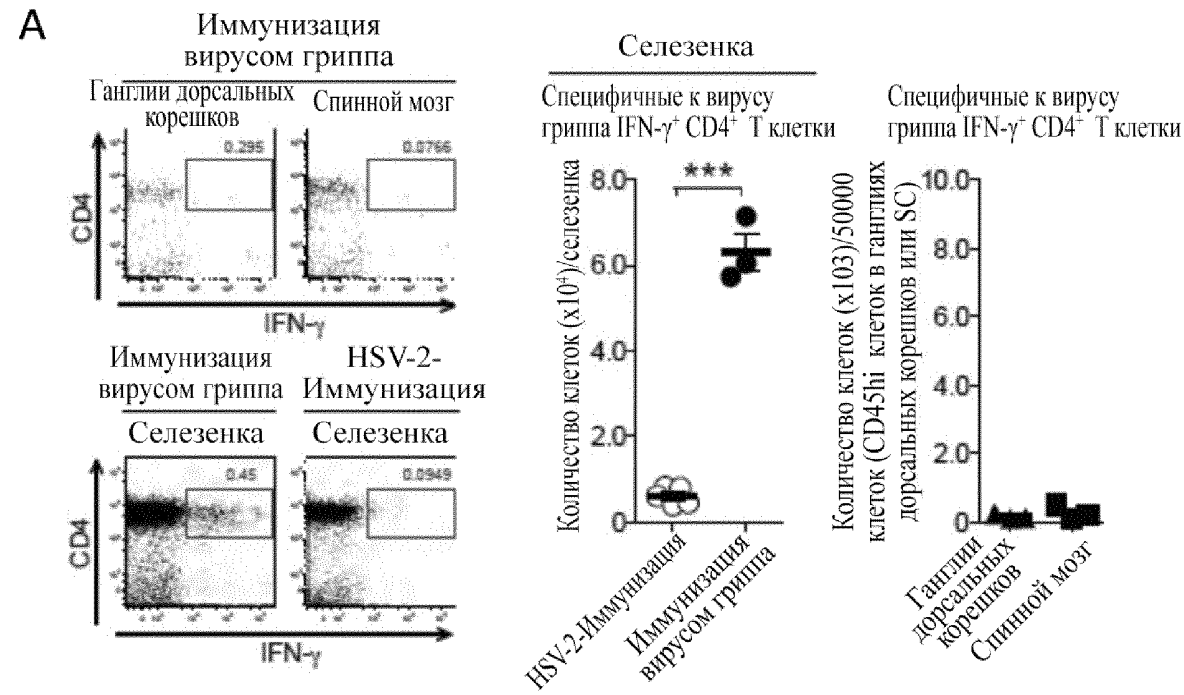
С



D

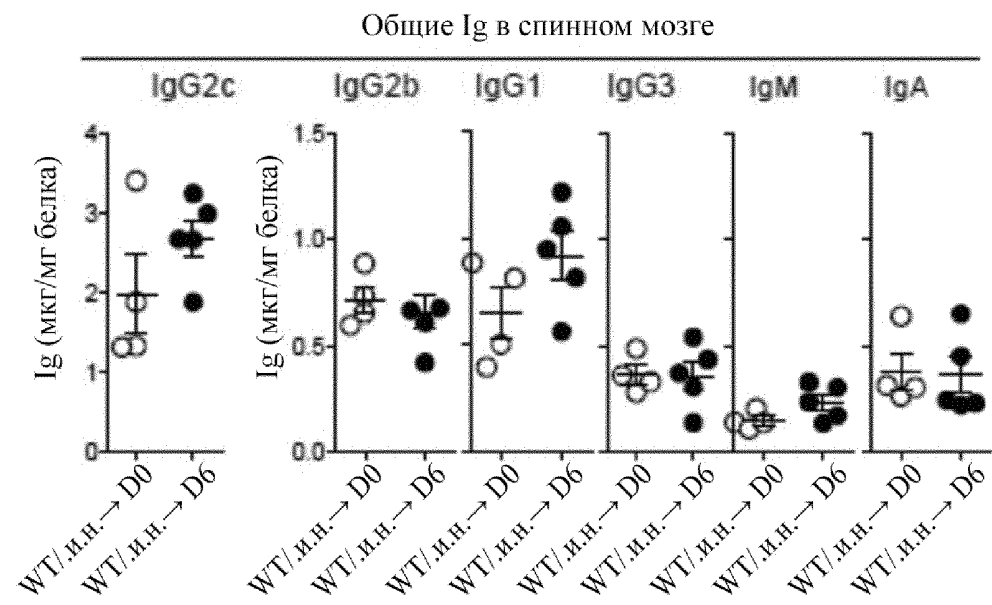


ФИГ. 8С-ФИГ.8D

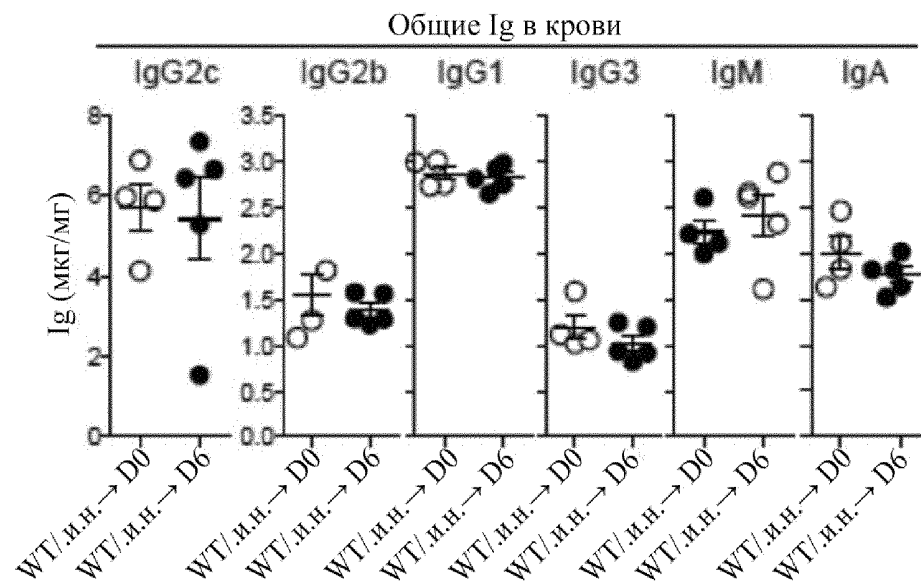


ФИГ. 9А-ФИГ.9В

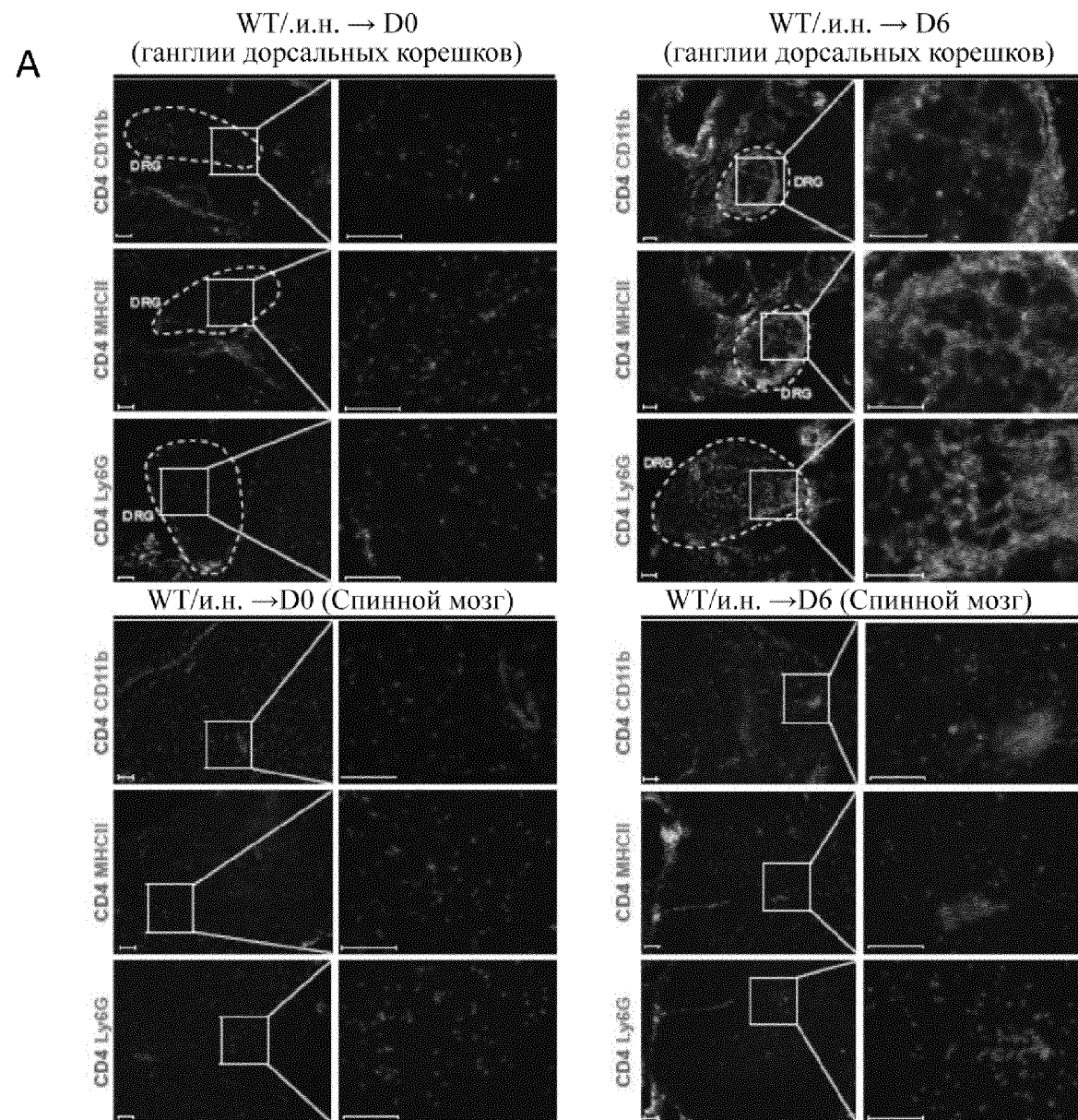
C



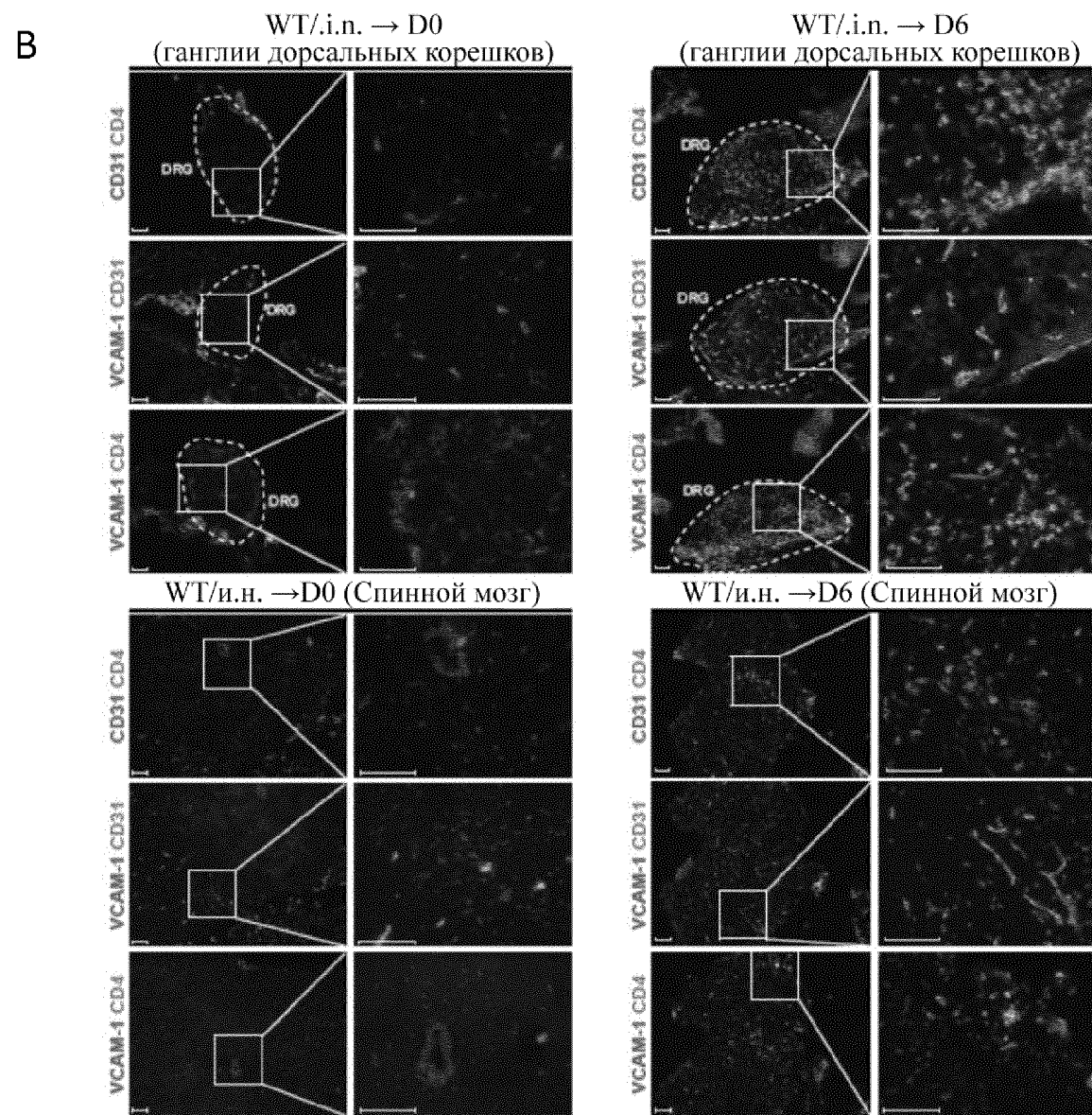
D



ФИГ. 9С-ФИГ.9D

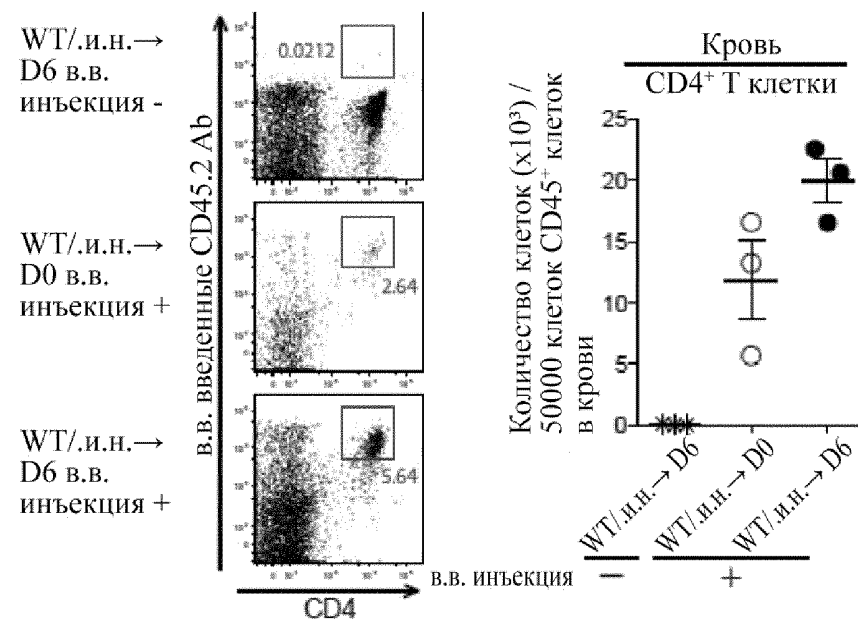


ФИГ. 10А

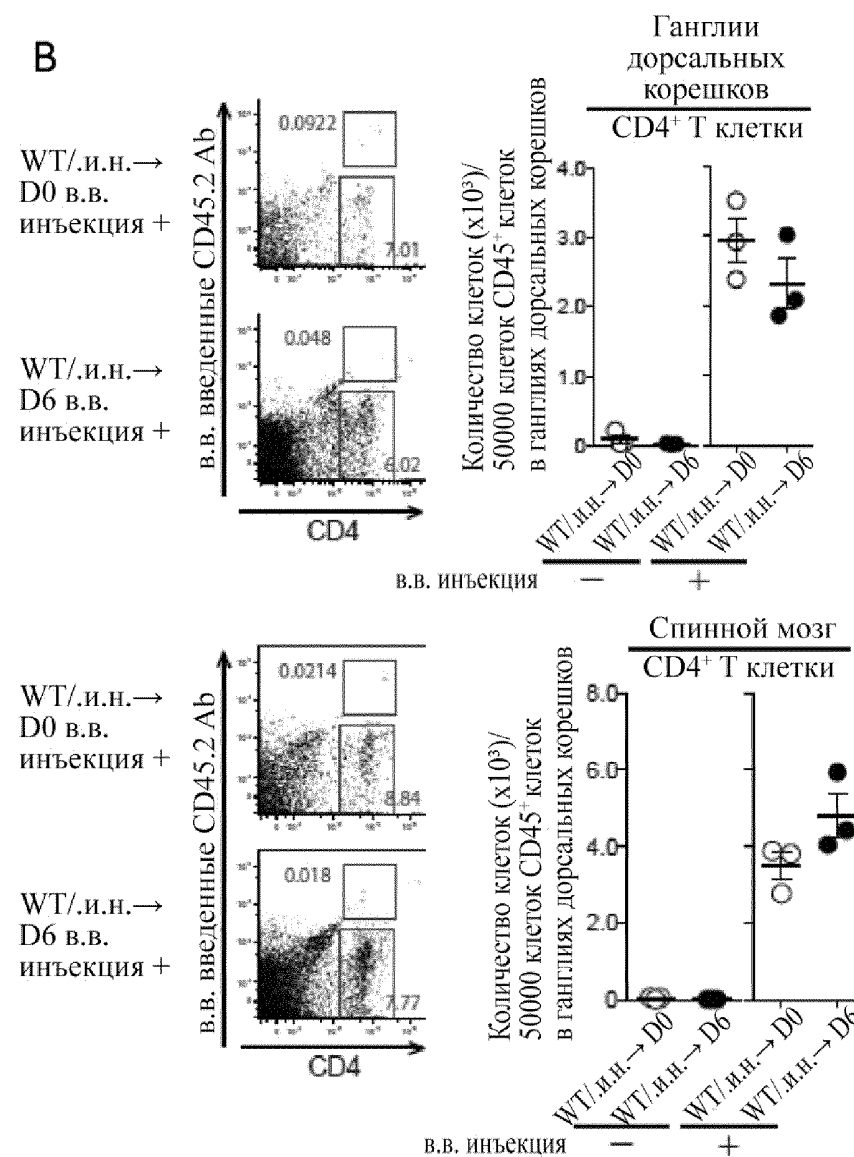


ФИГ. 10В

A



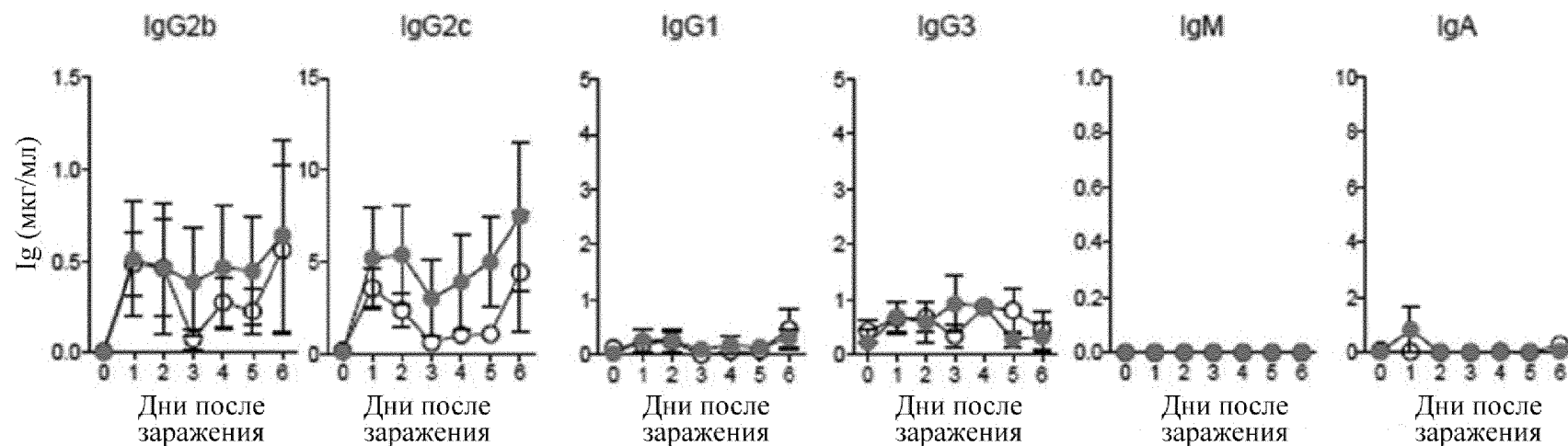
B



ФИГ. 11А-ФИГ.11В

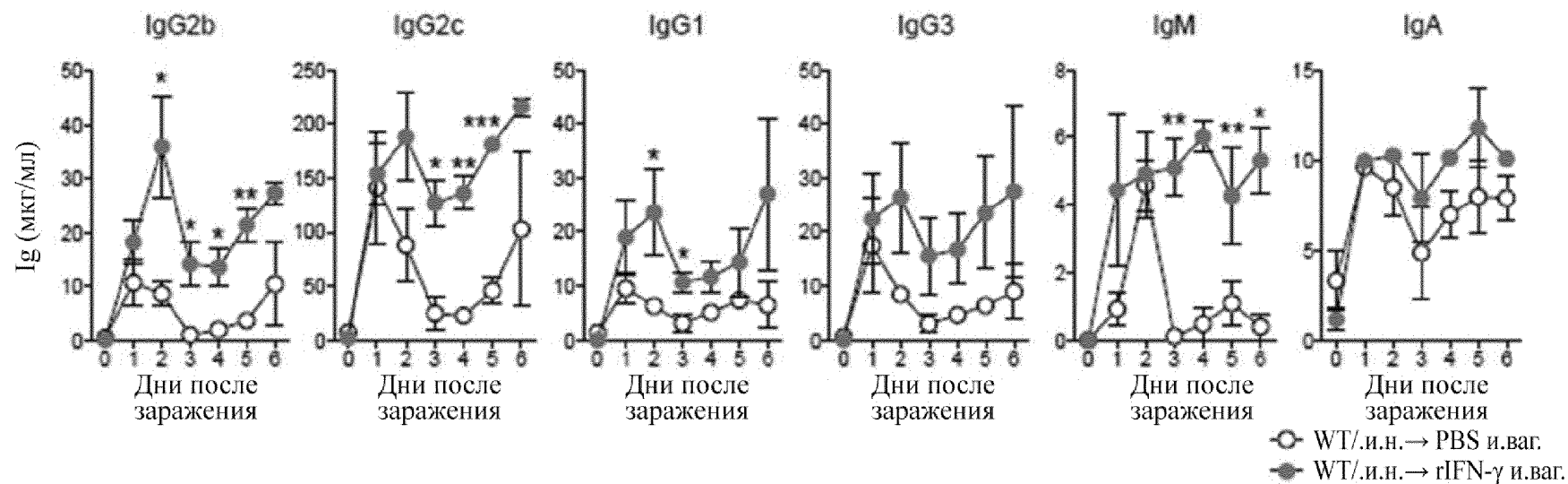
A

HSV-2-специфичные Ig



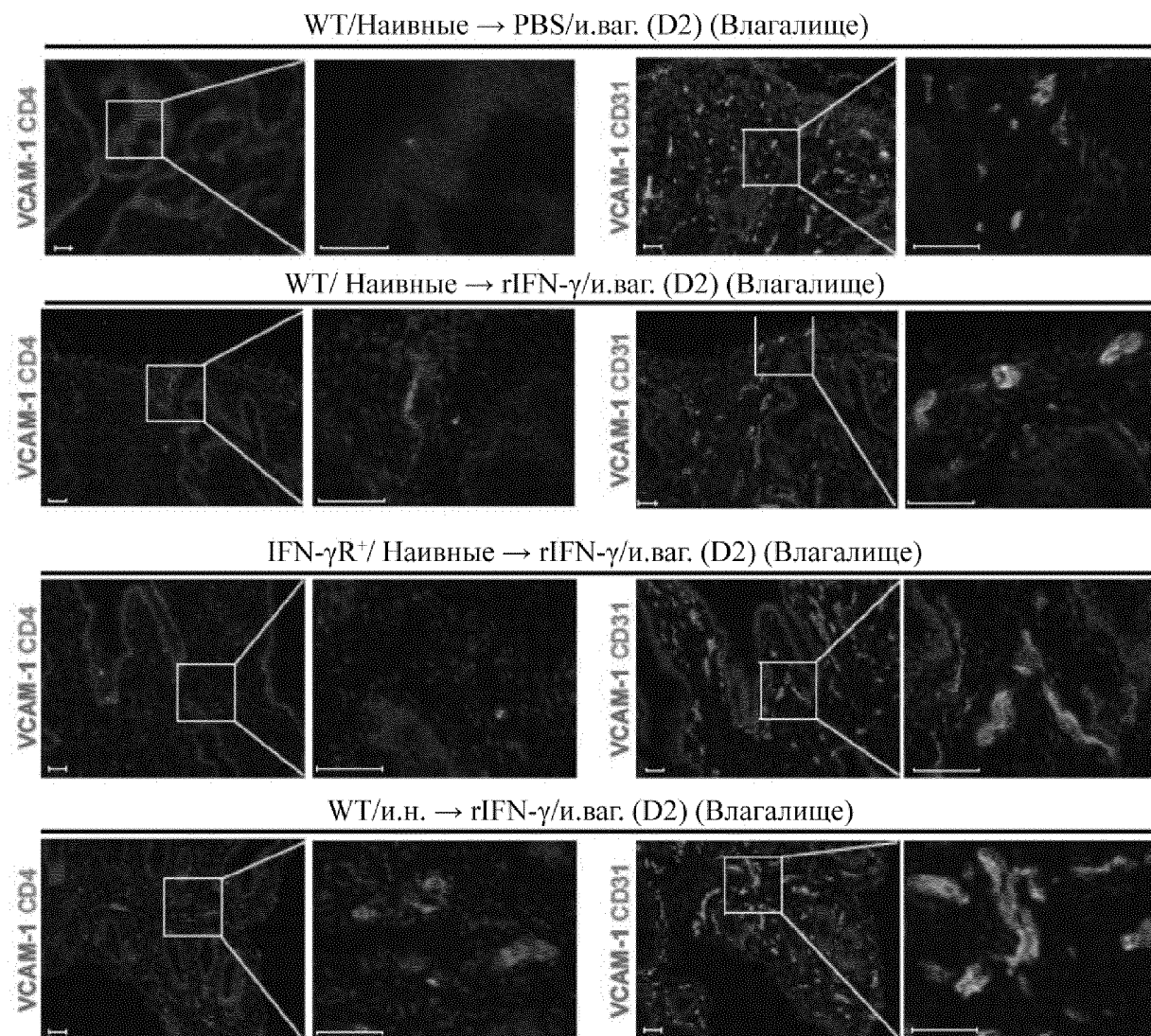
B

Общие Ig



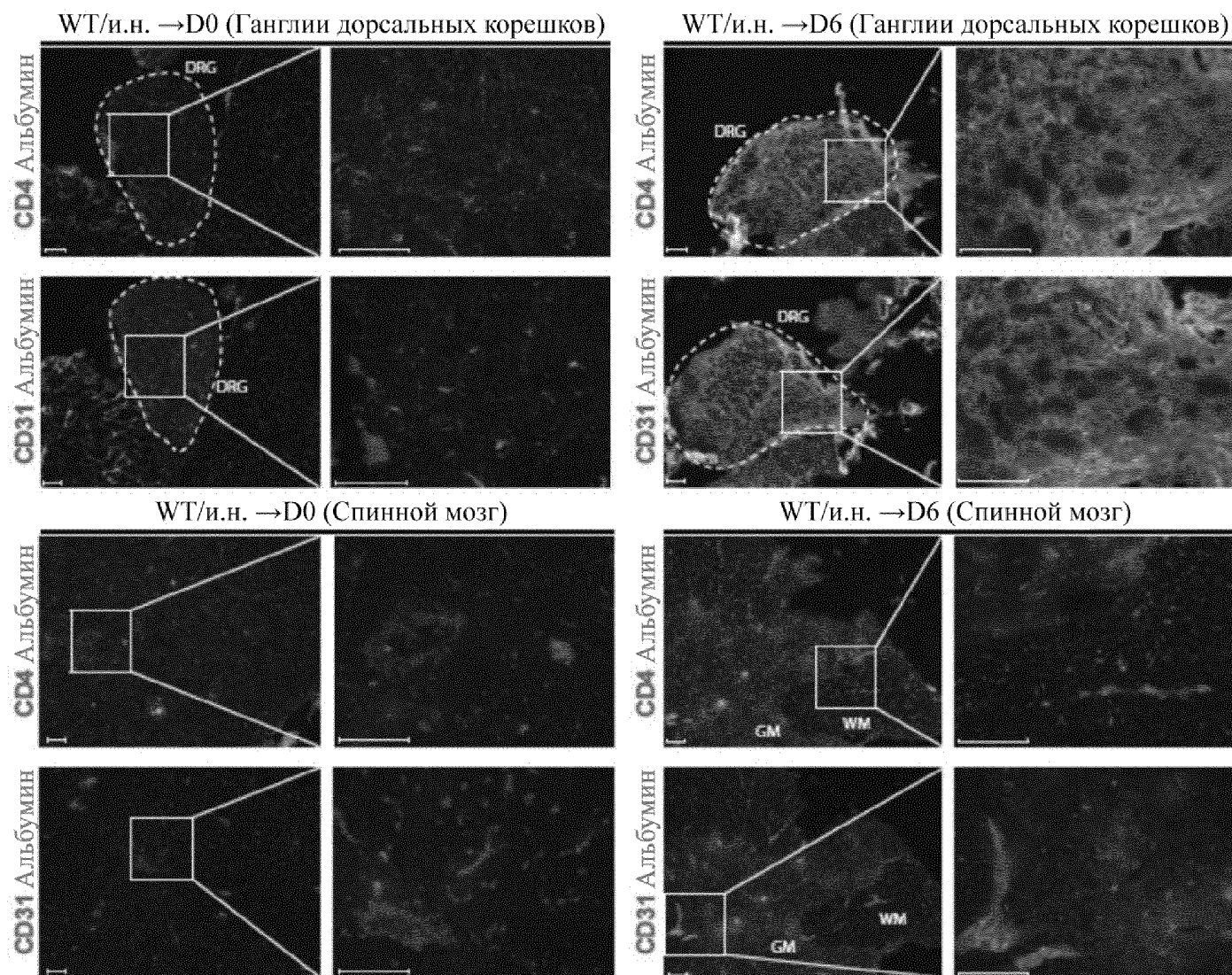
ФИГ. 12А-ФИГ.12В

С



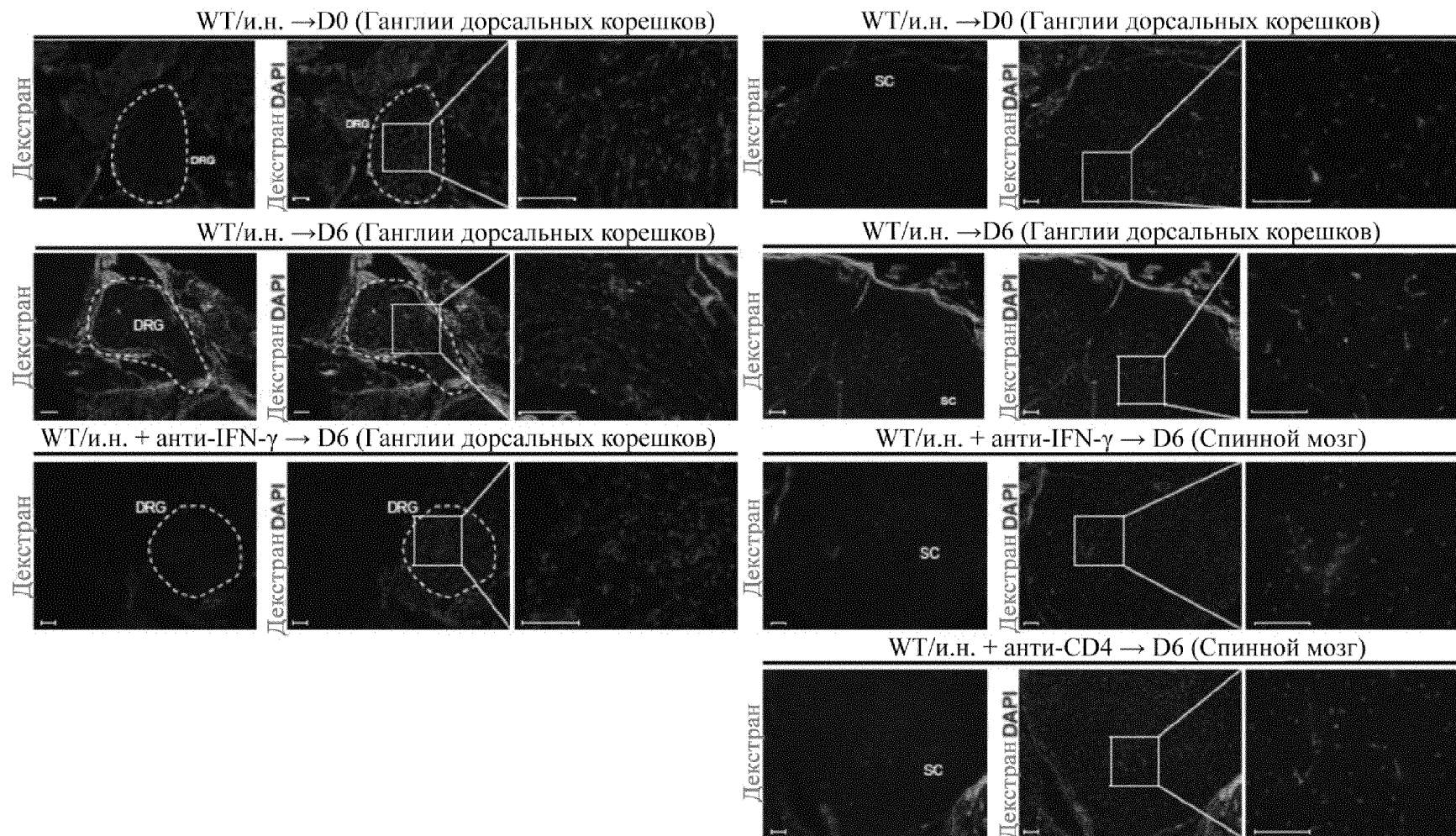
ФИГ. 12С

A



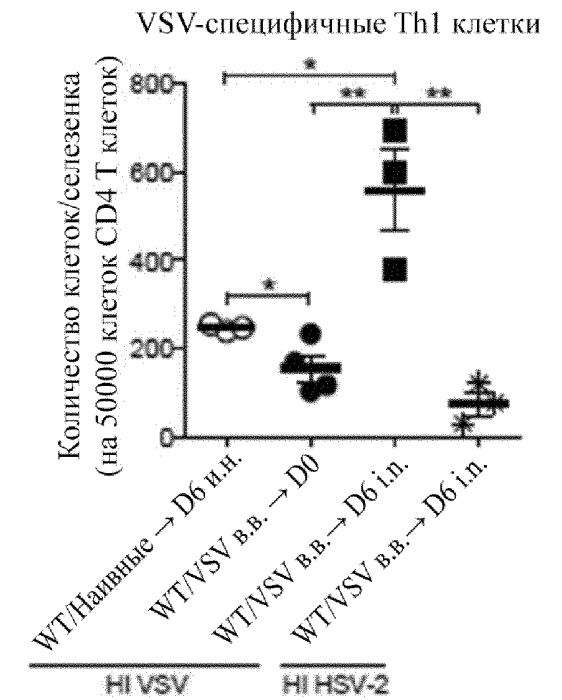
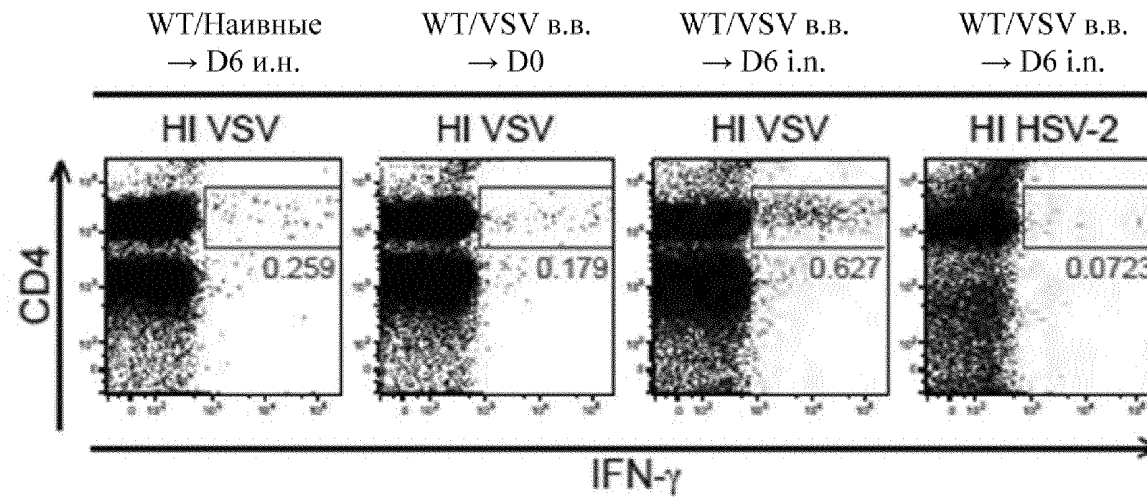
ФИГ. 13А

В

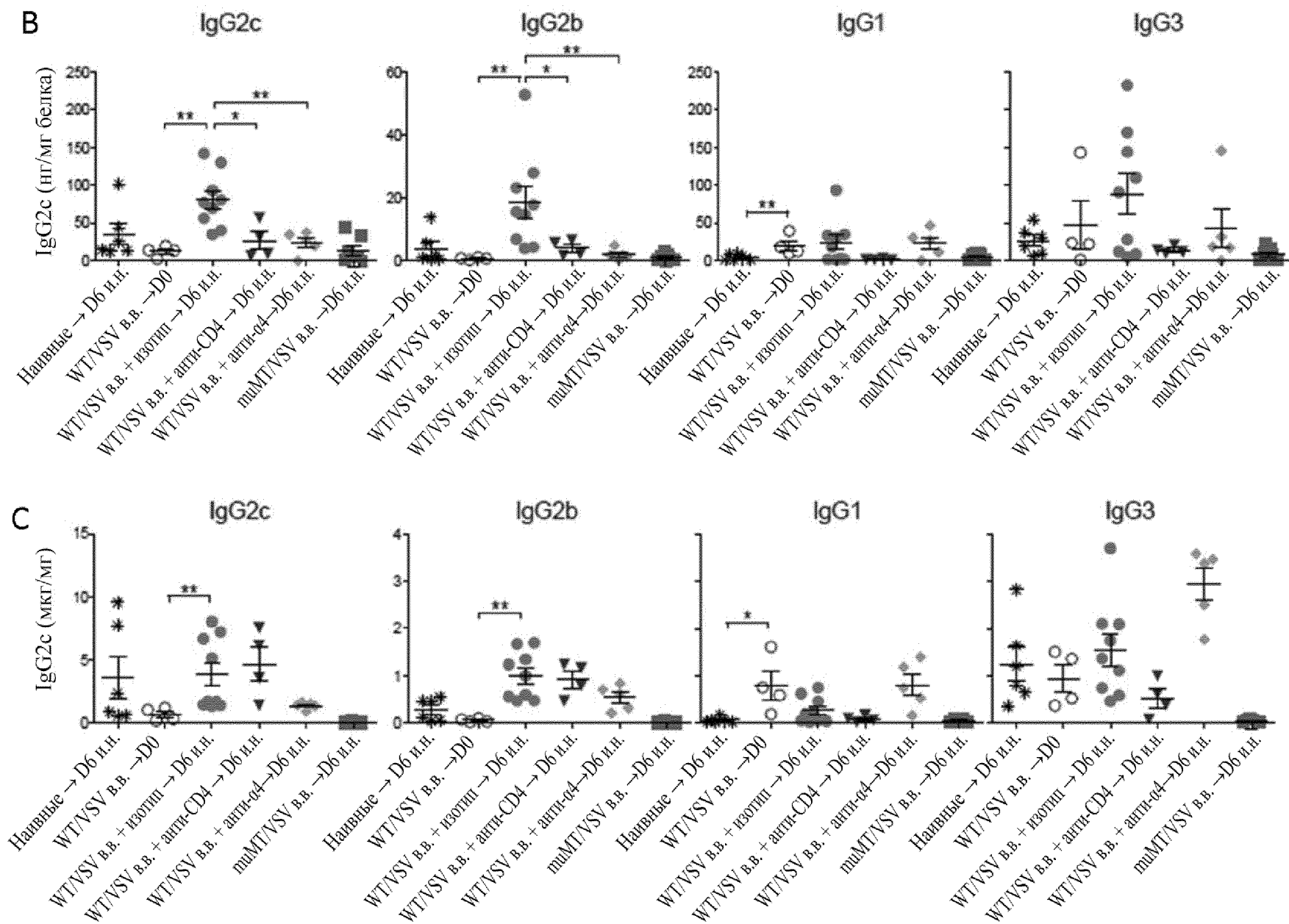


ФИГ. 13В

A



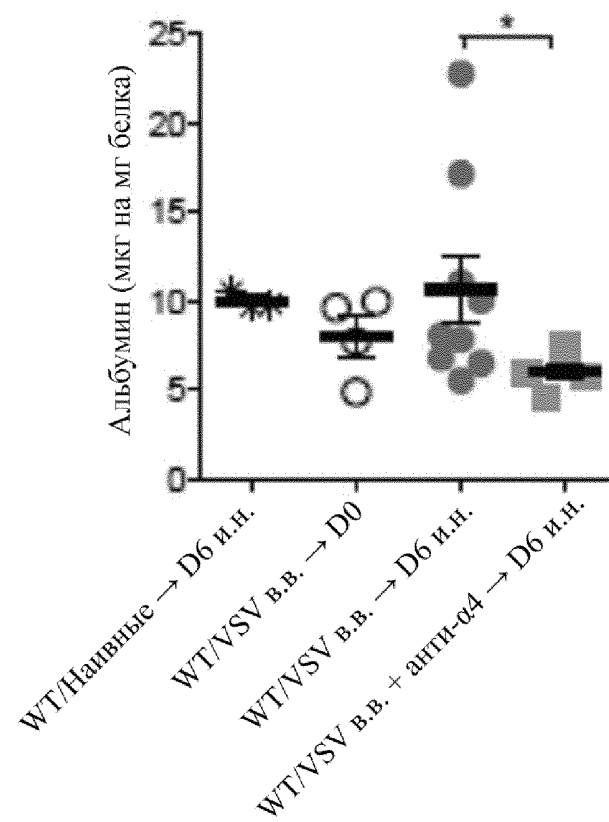
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В-ФИГ.14С

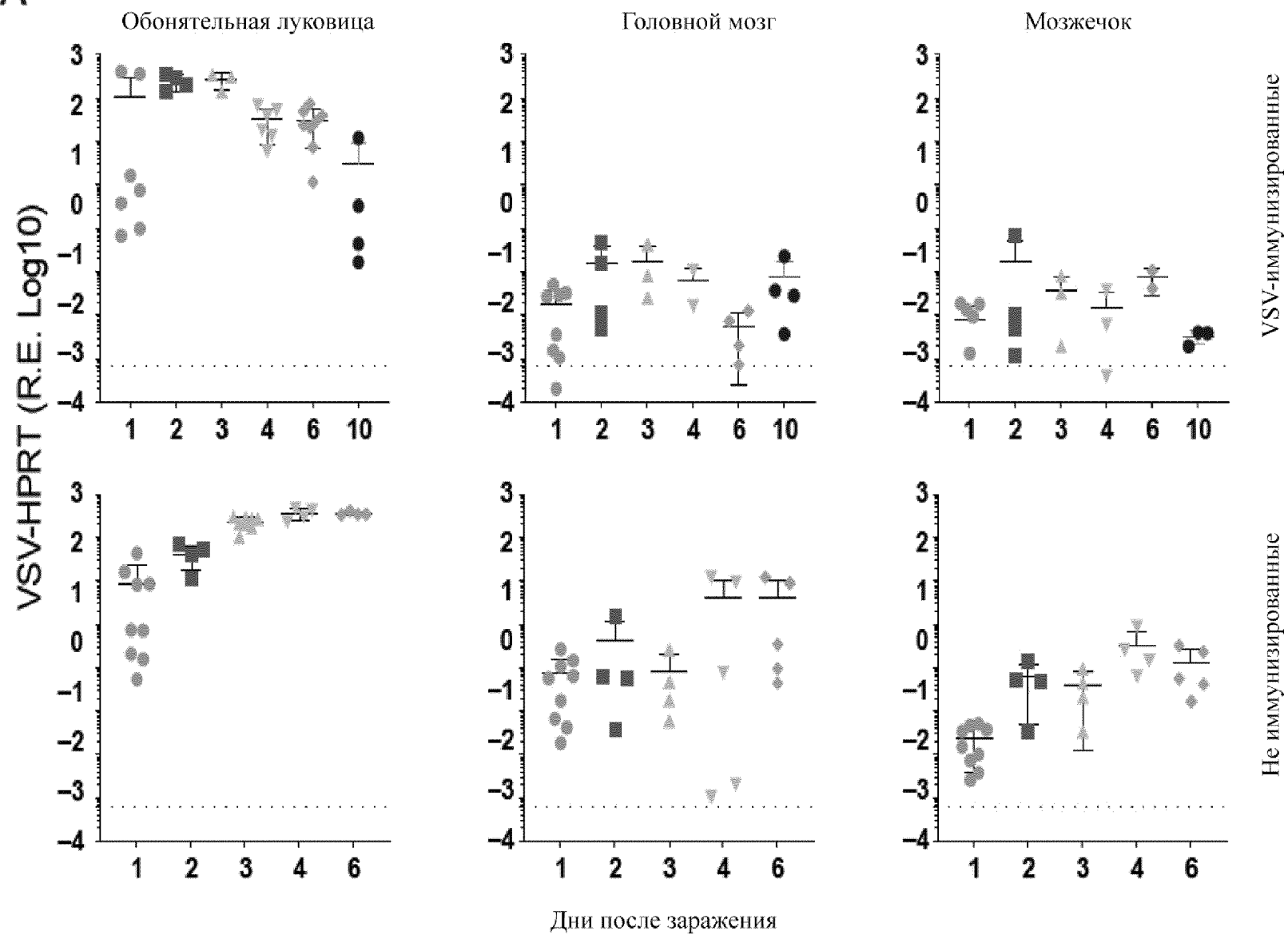
D

Мозг

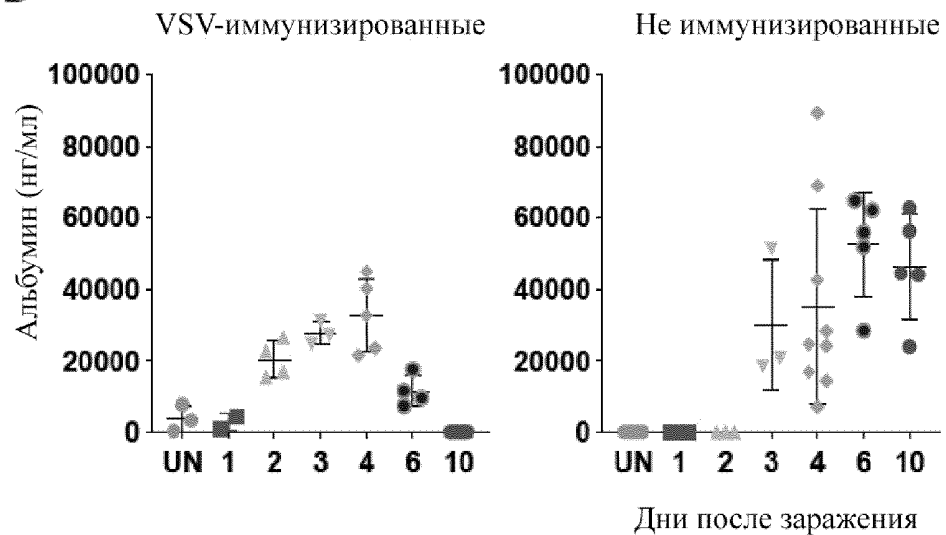
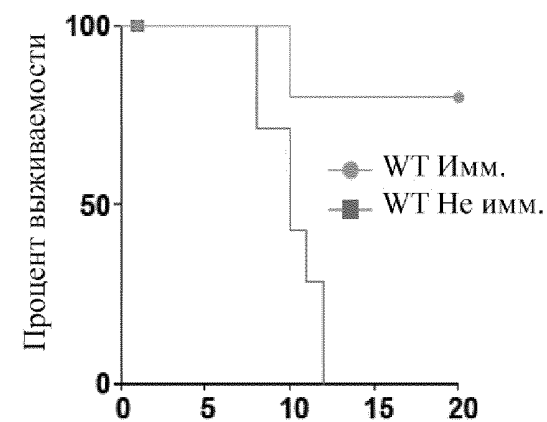
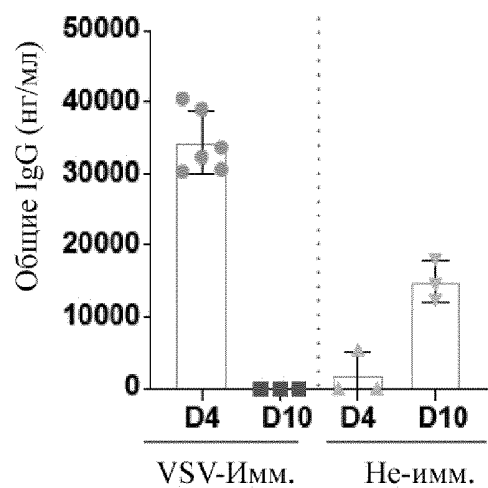
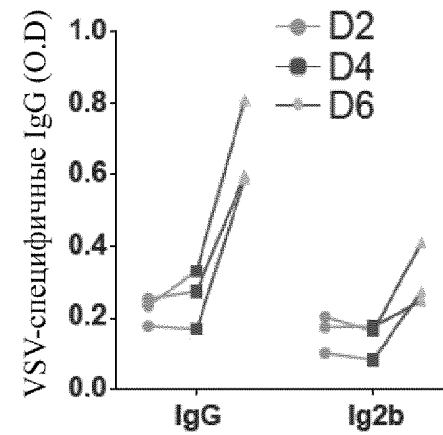
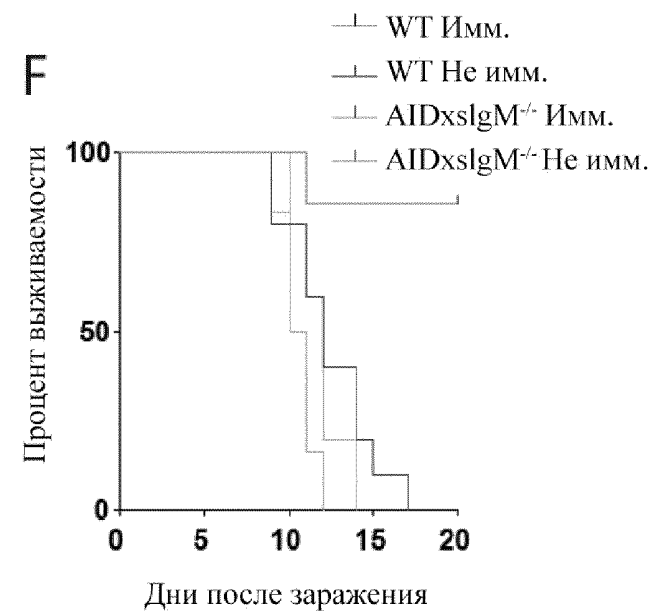


ФИГ. 14D

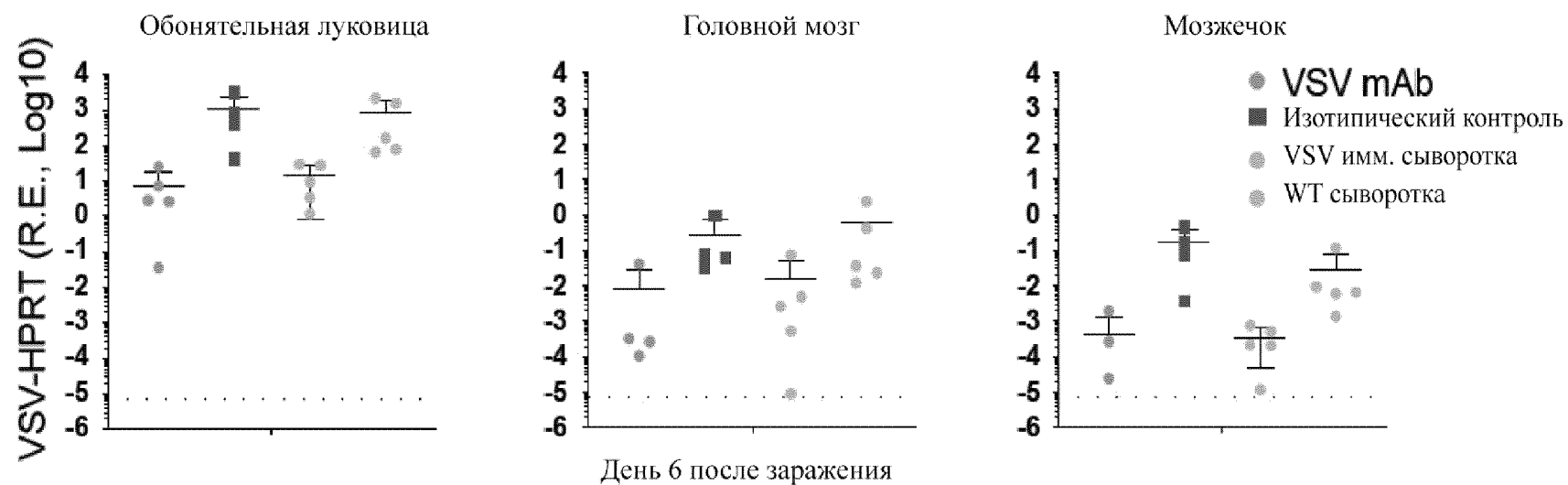
A



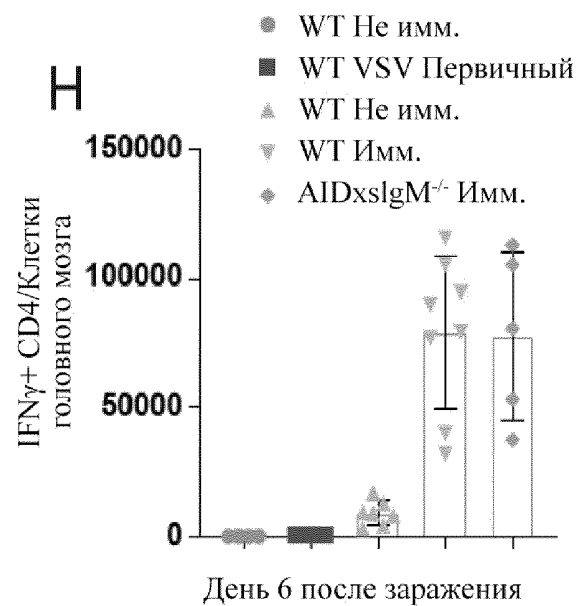
ФИГ. 15А

В**С****Д****Е****Ф****ФИГ.15В-ФИГ.15F**

G



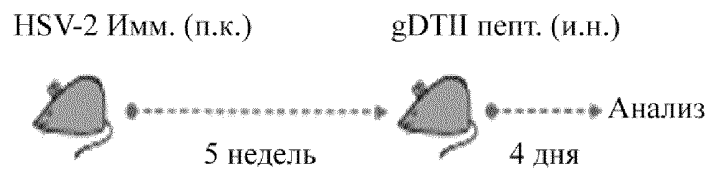
H



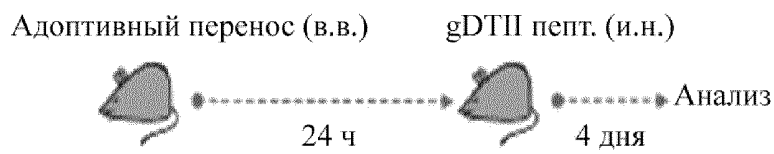
ФИГ. 15G-ФИГ.15H

A

HSV-2 Иммунизация



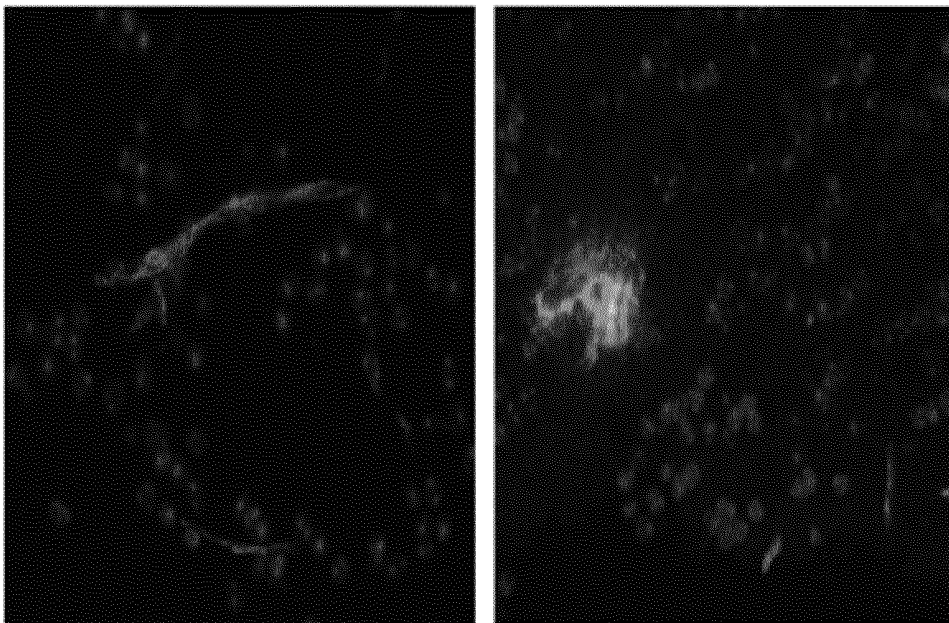
Перенос gDTII-специфичн. CD4+ Т клеток



B

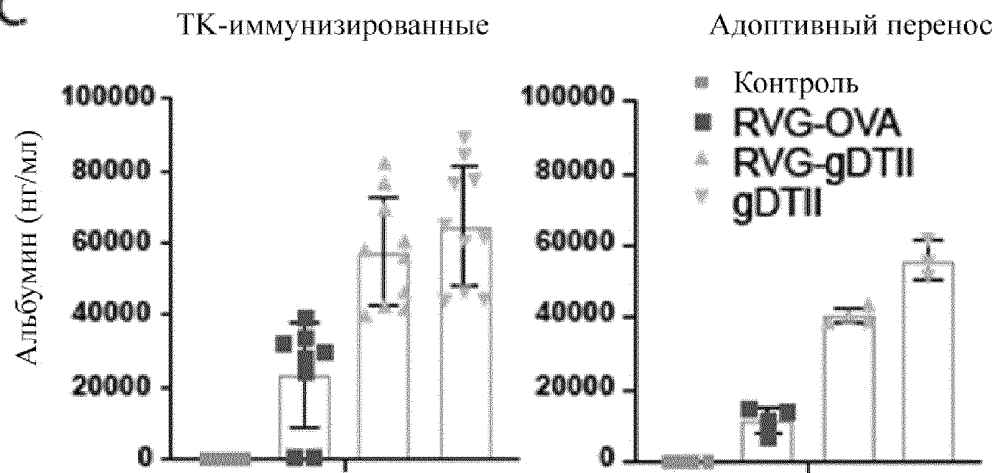
RVG-OVA

gDTII

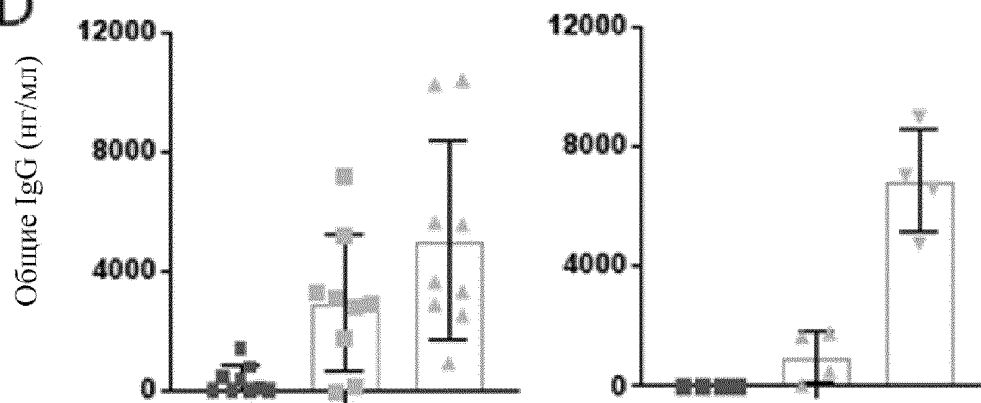
CD31
Декстран
DAPI

ФИГ. 16А-ФИГ.16В

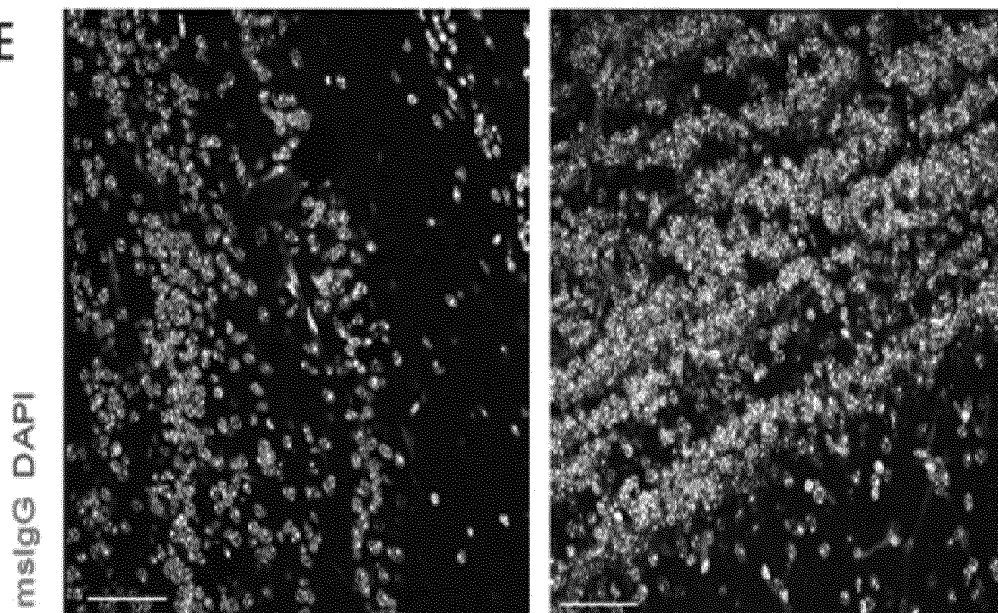
C



D

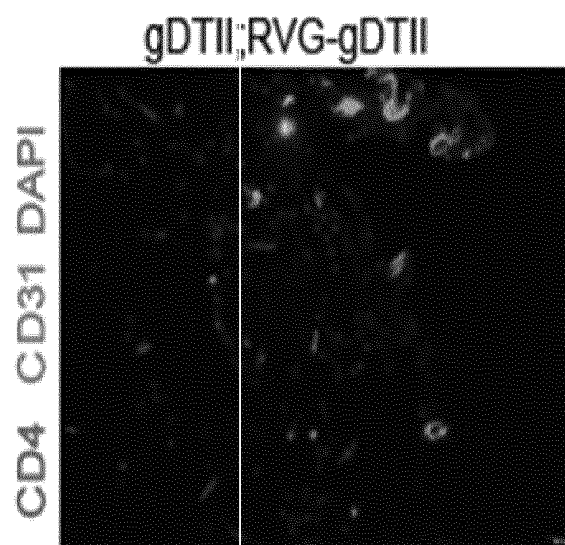
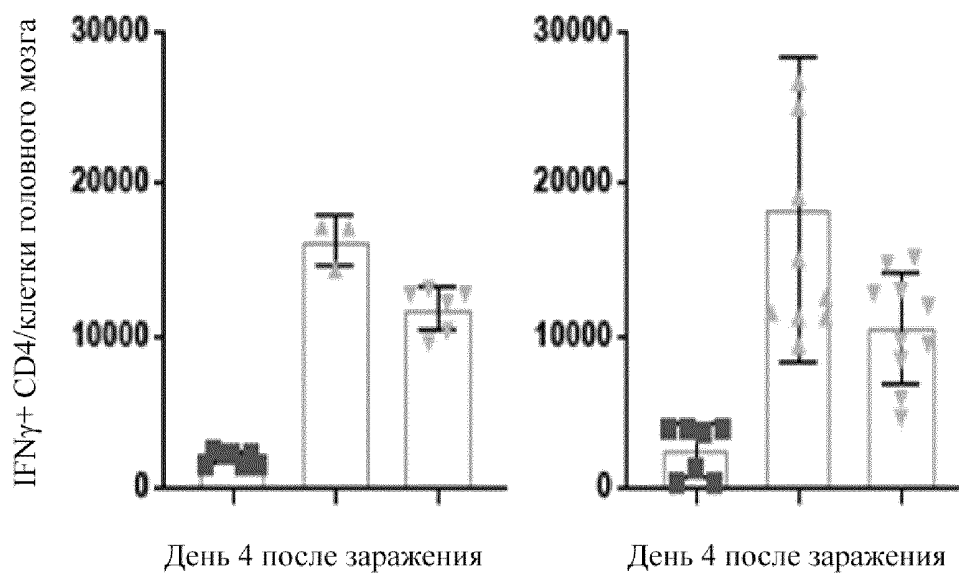


E

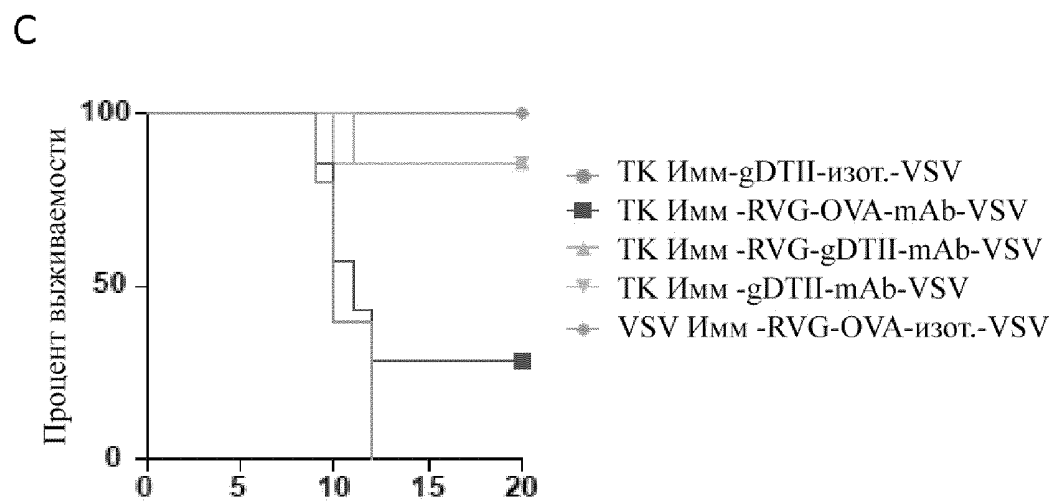
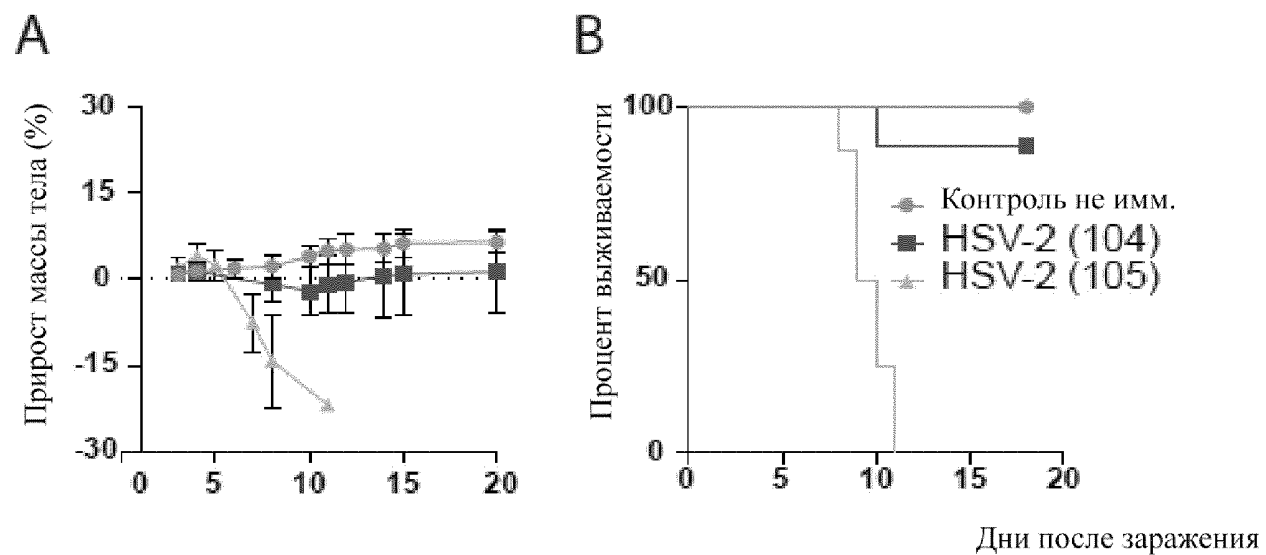


ФИГ. 16С-ФИГ.16Е

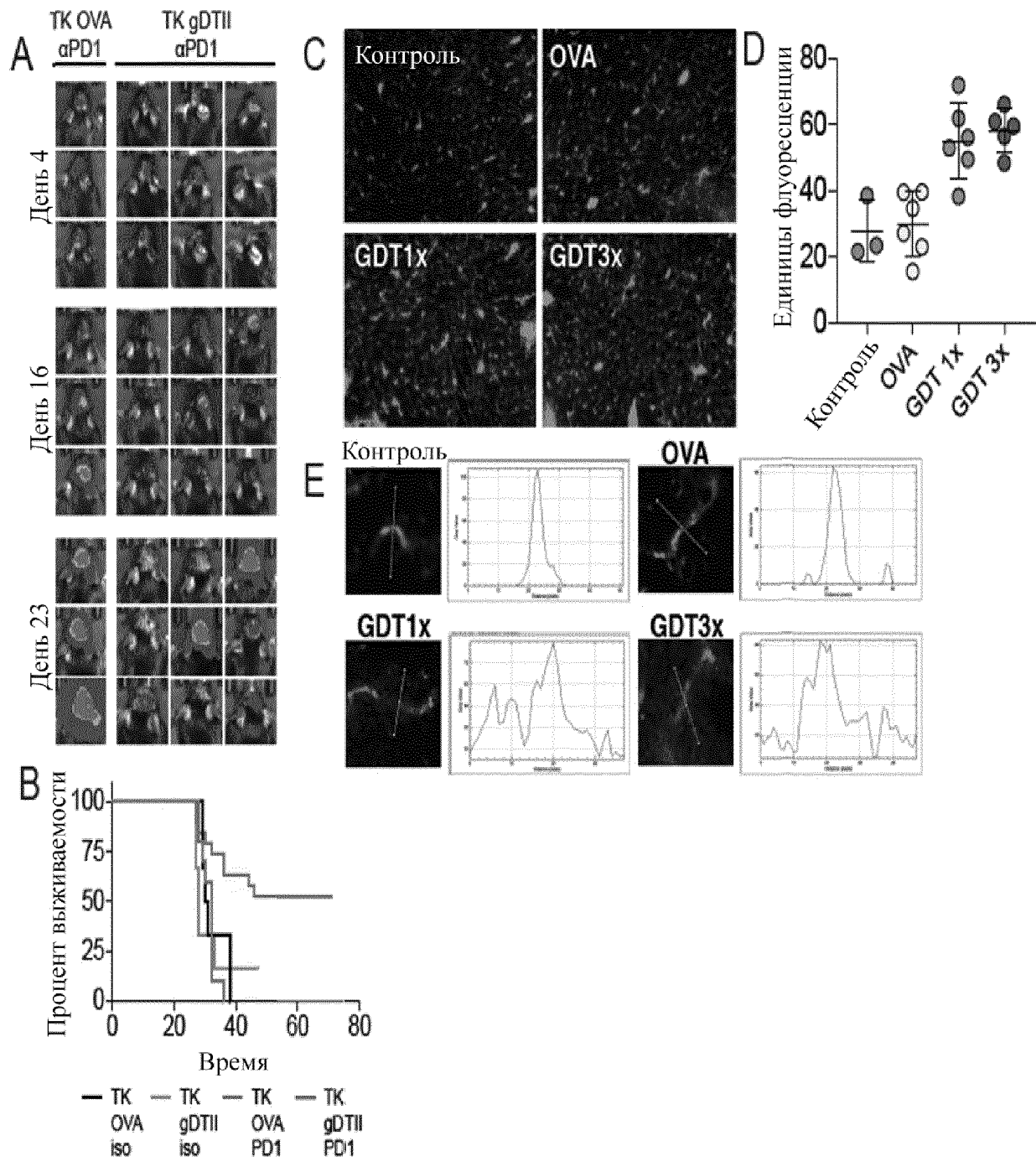
F



ФИГ. 16F

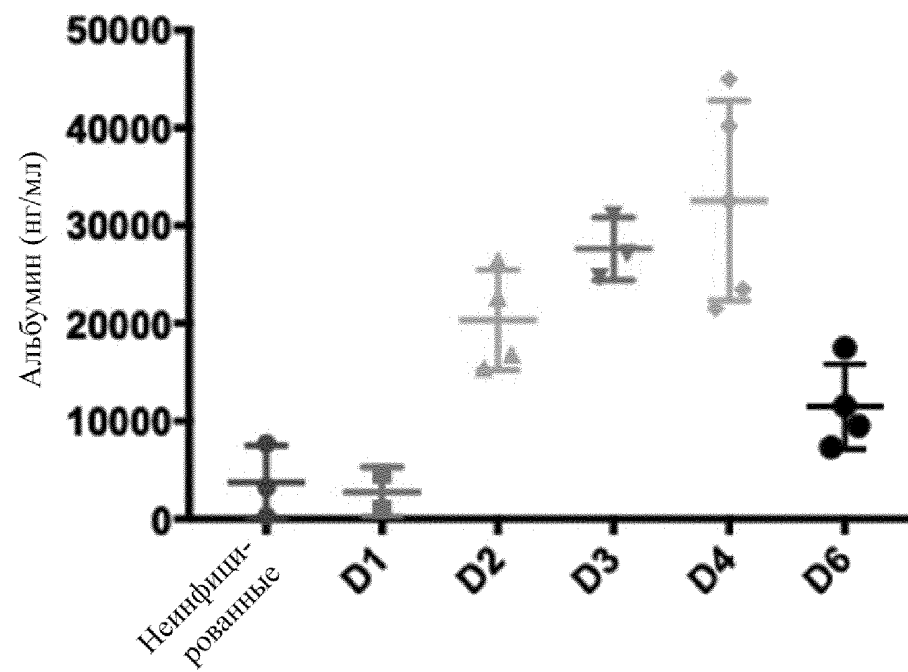


ФИГ. 17А-ФИГ.17С



ФИГ. 18А-ФИГ.18Е

Проницаемость ГЭБ



ФИГ. 19