

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042630**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.07

(21) Номер заявки
201990937

(22) Дата подачи заявки
2017.10.18

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

**(54) ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, ВЫБИРАЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ,
ОГРАНИЧЕННЫЕ ПО МОЛЕКУЛАМ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ E**

(31) **62/409,840**

(32) **2016.10.18**

(33) **US**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/US2017/057106**

(87) **WO 2018/075591 2018.04.26**

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

(72) Изобретатель:
**Пикер Луис, Хансен Скотт, Фрю
Клаус, Мэлоули Дэниэл, Нельсон
Джей, Сэча Джона, Хенкук Миган
(US)**

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

(56) US-A1-20040110188
US-A1-20160114027

HAHN G. et al.: "Human cytomegalovirus
UL131-128 genes are indispensable for virus growth
in endothelial cells and virus transfer to leukocytes",
Journal of Virology, 2004, Vol. 78, No. 18, pp.
10023-10033, See pages 10024, 10026 and Table 1.

US-A1-20160010112

GREY F. et al.: "A human cytomegalovirus-
encoded microRNA regulates expression of multiple
viral genes involved in replication", PLoS Pathogens,
2007, Vol. 3, Issue 11, e163, pp. 1593-1602, See the
whole document.

(57) В изобретении описаны векторы CMV, в которых отсутствуют активные белки UL128, UL130, UL146 и UL147, которые также могут содержать один или более регуляторных элементов микроРНК (MRE), которые ограничивают экспрессию CMV. Иммунизация с помощью описанных векторов CMV позволяет выбирать различные ответы CD8⁺ Т-клеток - CD8⁺ Т-клеток, ограниченных по МНС-Ia, МНС-II или по МНС-E.

B1**042630****042630****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/409840, поданной 18 октября 2016 г., описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению цитомегаловирусных векторов (CMV) для иммунизации и, более конкретно, к генерации Т-клеточных ответов, характеризующихся МНС-Е-рестрикцией. Конкретные варианты осуществления относятся к образованию CD8⁺ Т-клеток, которые ограничены по МНС-Е.

Подтверждение государственной поддержки

Это изобретение было создано при поддержке правительства США в соответствии с условиями грантов P01 AI094417 и R01 AI117802, присужденных Национальными институтами здравоохранения. Правительство Соединенных Штатов имеет определенные права на это изобретение.

Ссылка на список последовательностей, представленный, в электронном виде с помощью efs-web

Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей (название: 3919.014PC01_ST25; размер: 1,063 байта; и дата создания: 18 октября 2017 г.) полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Раскрытие изобретения

В данном документе описаны генетически модифицированные вакцинные векторы CMV. В вариантах осуществления изобретения генетически модифицированных вакцинных векторов CMV генетические модификации, описанные в настоящем документе, изменяют нацеливание на эпитоп и ограничение по главному комплексу гистосовместимости (МНС) ответов CD8⁺ Т-клеток, вызываемых векторами вакцин CMV, включая способность вызывать ответы CD8⁺ Т-клеток, которые распознают уникальные эпитопы протеинов, ограниченных по поверхностноклеточным МНС-II и МНС-E. Ограниченные по МНС-II и МНС-E ответы CD8⁺ Т-клеток, вызванные описанными здесь вакцинными векторами CMV, являются нестандартными и редко наблюдаются при естественных иммунных реакциях на инфекционные агенты. Кроме того, широта и эффективность ограниченных по МНС-II и МНС-E CD8⁺ Т-клеточных ответов, вызванных вакцинными векторами CMV, описанными в данном документе, не наблюдаются с вакцинными векторами CMV, которые не являются генетически модифицированными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения полагают, что ограниченные по МНС-E CD8⁺ Т-клетки могут использовать отсутствие адаптации против патогенного и опухолевого уклонения от иммунитета для ограниченных по МНС-E иммунных ответов, и что генетически модифицированные вакцинные векторы CMV, описанные в настоящем документе, которые могут преимущественно или более исключительно вызывать такие ответы, обеспечивают потенциал для создания уникально мощных вакцин против целевых патогенов и опухолей. В соответствии с этим предположением обнаруживается, что только вакцины, которые вызывают ограниченные по МНС-E CD8⁺ Т-клетки, защищают от заражения приматов, не принадлежащих к человеческому роду, на модели для СПИДа. Кроме того, МНС-E имеет ограниченные полиморфизмы, так что защитные ответы, которые нацелены на ограниченные по МНС-E эпитопы, сохраняются среди людей. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные вакцинные векторы CMV, описанные в данном документе, вызывают ограниченный по МНС-E Т-клеточный ответ, который является общим для генетически разнообразных индивидуумов.

Представленные здесь векторы CMV, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген; и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую элемент распознавания микроРНК (MRE), подавляющий экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения. MRE функционально связан с геном CMV, который является необходимым или усиливающим для культивирования CMV. Векторы не экспрессируют активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог или активный белок UL147 или его ортологи.

Также в данном документе описаны векторы CMV, содержащие первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген; вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую MRE, который подавляет экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения; и третью последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую MRE, который подавляет экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой миелоидного происхождения. MRE функционально связан с геном CMV, который является необходимым или усиливающим для увеличения CMV. Векторы не экспрессируют активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог; или активный белок UL147 или его ортолог.

В данном документе также описаны векторы цитомегаловируса человека (HCMV), содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген. Векторы не экспрессируют: активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог; или активный белок UL147 или его ортолог.

В данном документе также описаны способы генерирования иммунного ответа по меньшей мере на один гетерологичный антиген у субъекта. Способы включают введение субъекту описанного здесь типа вектора CMV в количестве, эффективном для индукции ответа CD8+ Т-клеток по меньшей мере на один гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором, ограничены по МНС-Е или его ортологу. В дополнительных вариантах осуществления менее чем 10% CD8+ Т-клеток, вызванных вектором, ограничены по полиморфному МНС-классу Ia или его ортологу. В альтернативных вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором, ограничены по МНС-класс Ia или его ортологу. В еще других вариантах осуществления по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором, ограничены по МНС-II или его ортологу.

Гетерологичный антиген векторов CMV, описанных в данном документе, может быть любым гетерологичным антигеном, включая патоген-специфический антиген, полученный, например, из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1), вируса простого герпеса типа 2 (HSV-2), вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса папилломы, паразитов *Plasmodium* и микобактерии туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*). В других вариантах осуществления гетерологичный антиген может представлять собой опухолевый антиген, включающий, например, опухолевый антиген, связанный с острым миелоидным лейкозом, хроническим миелоидным лейкозом, миелодиспластическим синдромом, острым лимфобластным лейкозом, хроническим лимфолейкозом, неходжкинской лимфомой, множественной миеломой, злокачественной меланомой, раком молочной железы, раком легких, раком яичников, раком простаты, раком поджелудочной железы, раком толстой кишки, почечно-клеточным раком и опухолями из зародышевых клеток. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген может представлять собой тканеспецифический антиген или собственный антиген хозяина, включая, например, антиген, полученный из вариабельной области Т-клеточного рецептора, или антиген, полученный из вариабельной области В-клеточного рецептора. Также здесь описан способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е-пептидные комплексы. Этот способ включает введение первому субъекту вектора CMV в количестве, эффективном для генерирования набора CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е/пептид. Вектор CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог; или активный белок UL147 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую MRE, подавляющий экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения. Гетерологичный антиген может быть любым антигеном, включая патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, аутоантиген или тканеспецифический антиген. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать идентификацию первого CD8+ Т-клеточного рецептора из набора CD8+ Т-клеток, где первый CD8+ Т-клеточный рецептор (TCR) распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления первый CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют секвенированием ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или более Т-клеток, выделенных из первого субъекта или второго субъекта, вектором экспрессии, где вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, где второй CD8+ Т-клеточный рецептор включает CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, тем самым генерируя одну или более трансфектированных CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать введение трансфектированных CD8+ Т-клеток первому или второму субъекту для лечения болезни, такой как рак, патогенная инфекция или аутоиммунное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать введение трансфектированных CD8+ Т-клеток первому или второму субъекту для индукции аутоиммунного ответа на аутоантиген или тканеспецифический антиген.

Также здесь описаны трансфектированные CD8+ Т-клетки, которые распознают МНС-Е-пептидные комплексы, полученные способом, включающим стадии: (1) введение первому субъекту вектора CMV в количестве, эффективном для генерирования набора CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е/пептидные комплексы, (2) выявление первого CD8+ Т-клеточного рецептора из набора CD8+ Т-клеток, где первый CD8+ Т-клеточный рецептор распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный комплекс; (3) выделение одной или более CD8+ Т-клеток из первого субъекта или второго субъекта; и (4) трансфекцию одной или более CD8+ Т-клеток, выделенных из первого или второго субъекта вектором экспрессии, тем самым создавая трансфектированную Т-клетку, которая распознает МНС-Е-пептидные комплексы. Вектор CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог; или активный белок UL147 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV дополнительно содержит

вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую MRE, подавляющий экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения. Вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8⁺ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8⁺ Т-клеточный рецептор, где второй CD8⁺ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первый CD8⁺ Т-клеточный рецептор. Гетерологичный антиген может быть любым антигеном, включая патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, аутоантиген или тканеспецифический антиген. Здесь также описаны способы лечения болезни, такой как рак, патогенная инфекция или аутоиммунное заболевание или расстройство, при этом способ включает введение трансфектированной CD8⁺ Т-клетки, которая распознает МНС-Е-пептидные комплексы, первому или второму субъекту.

Краткое описание чертежей

Варианты осуществления будут легко поняты из последующего подробного описания в сочетании с прилагаемыми чертежами. Варианты осуществления иллюстрируются в качестве примера, а не в порядке ограничения рисункам прилагаемых чертежей.

Фиг. 1 демонстрирует нацеливание эпитопов и МНС-рестрикцию SIVgag-специфических CD8⁺ Т-клеток, выявленных дифференциально запрограммированными векторами RhCMV/SIVgag. SIVgag-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы, вызванные обозначенными RhCMV векторами, были эпитоп-картированы с использованием проточной цитометрии внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) для выявления распознавания 125 последовательных 15-мерных gag пептидов (с 11 перекрывающимися аминокислотами). Отдельные пептиды, приводящие к специфическим реакциям CD8⁺ Т-клеток, обозначены прямоугольником с узором из прямоугольников, обозначающего МНС-рестрикцию, как определено блокированием с помощью mAb анти-пан-МНС-I W6/32 (который блокирует распознавание обоих неpolиморфной МНС-Е и polиморфной МНС-Ia молекул), МНС-Е, блокирующего пептид VL9 и МНС-II, блокирующего пептид CLIP. Ограничение по МНС-Ia-, МНС-Е- и МНС-II основывалось на > 90% блокировании ответа только W6/32 (без заливки), только VL9 (диагональная штриховка) и только CLIP (горизонтальная штриховка), соответственно, ответы, не соответствующие этим критериям, помечены как неопределенные (сплошная заливка). Стрелки указывают на супертопы МНС-II (горизонтальная штриховка) и на супертопы МНС-Е супертопы МНС-Е (диагональная штриховка).

Фиг. 2 демонстрирует результат повторного введения лимитирующей дозы внутриректально SIVmac239 для макак-резусов (RM) либо оставленных невакцинированными (n = 15; нижняя панель), либо вакцинированных с помощью: вектора штамма 68-1 RhCMV/SIV (n = 15; верху левая панель); вектора штамма 68-1,2 RhCMV (n = 15; верхняя средняя панель) или UL128-усеченный (Δ UL128) вектор 68-1,2 RhCMV (n = 14; верхняя правая панель). Все векторы экспрессировали одинаковые SIV Gag, Retanef (Rev/Nef/Tat) и 5'-Pol инсерции.

Фиг. 3 демонстрирует карту покрытия при секвенировании для конструкций CyCMV. После секвенирования следующего поколения CyCMV-BAC все считанные последовательности, проходящие контроль качества, были приведены в соответствие с согласованным de novo секвенированием CyCMV-BAC. Показана ORF карта согласованной последовательности для каждой из конструкций. Верхний столбец показывает процент идентичности нуклеотидов между данным BAC и родительской последовательностью BAC, причем темно-серый цвет означает идентичность на 100%. Последовательность SIVgag, заменяющая ORF Cy13.1 и гомологи CyCMV HCMV UL128, UL130, UL146 и UL147, изображены светло-серым цветом на верхней панели.

Единственная разница последовательностей между родительским BAC и CyCMV Δ RL13/Gag заключается в замене гомолога CyCMV RL13 на SIVgag. В CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 дополнительно отсутствуют гомологи UL128 и UL130, тогда как шесть гомологов HCMV UL146 и UL147 дополнительно удалены в CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 Δ UL146-147. Никаких нежелательных рекомбинаций или ложных мутаций нет в большинстве последовательностей.

Фиг. 4 демонстрирует схематические конструкции CyCMV, полученные путем клонирования в бактериальной искусственной хромосоме (31908) и с делециями в генах, гомологичных HCMV UL128 и UL130(Δ UL128-UL130) в единственном варианте или в комбинации с семьей из шести генов, гомологичных HCMV UL146 и UL147(Δ UL128-UL130 + семейство Δ UL146/7).

Фиг. 5A-5C демонстрируют графики проточной цитометрии моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) из CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 вектор-вакцинированных макак циномолюс. Фиг. 5A демонстрирует графики проточной цитометрии PBMC из CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 вектор-вакцинированных макак циномолюс, стимулированных 15-мерными пептидами SIVgag, перекрывающимися четырьмя аминокислотами (GAG ORF) или указанными пептидами SIVgag, соответствующими супертопам МНС-II или МНС-Е (Gag53 = пептид, соответствующий аминокислотной последовательности 211-222 в gag белке SIVmac239; Gag73 = AA 290-301, Gag69 = AA 276-284, Gag120 = AA 482-490). Фиг. 5B демонстрирует репрезентативные графики проточной цитометрии CD8⁺ Т-клеток после инкубации с не-супертопами МНС-II или МНС-Ia-рестриктированными пептидами (Gag12 = AA 45-59 в SIVmac239gag, Gag33 = 132-140 AA) в присутствии пан-МНС-I, блокирующего mAb W6/32 (анти-МНС-

I, блокирующий как МНС-Е, так и МНС-Ia), МНС-II-связывающий CLIP пептид (анти-МНС-II) или МНС-Е-связывающий VL9 пептид (анти-МНС-Е). Фиг. 5С демонстрирует нацеливание на эпитоп и МНС-рестрикцию SIVgag-специфических CD8⁺ Т-клеток с использованием проточной цитометрии ICS для обнаружения распознавания 125 последовательных 15-мерных gag пептидов (с перекрыванием 11 аминокислот). Отдельные пептиды, приводящие к специфическим реакциям CD8⁺ Т-клеток, обозначены прямоугольником с узором из прямоугольников, демонстрирующие МНС-рестрикцию, как определено путем блокирования с помощью анти-пан-МНС-I mAb W6/32, МНС-Е-блокирующего пептида VL9 и МНС-II-блокирующего пептида CLIP. Ограничение по МНС-Ia-, МНС-Е- и МНС-II основывалось на > 90% блокировании отклика только W6/32 (метки штриховки направлены от левого нижнего угла к верхнему правому углу), только VL9 (линии штриховки направлены от нижнего правого угла к верхнему левому углу; горизонтальные линии штриховки) и только CLIP (сплошная заливка) соответственно, при этом ответы, не соответствующие этим критериям, помечены как неопределенные (нет заливки).

Фиг. 6А-6С демонстрируют графики проточной цитометрии PBMC из CyCMVΔRL13/GagΔUL128-130ΔUL146-147 вектор-вакцинированных макак циномогус. Фиг. 6А демонстрирует графики проточной цитометрии PBMC из CyCMVΔRL13/GagΔUL128-130ΔUL146-147 вектор-вакцинированных макак циномогус, стимулированных 15-мерными пептидами SIVgag, перекрывающимися четырьмя аминокислотами (GAG ORF) или с указанными пептидами SIVgag, соответствующими супертопам МНС-II или МНС-Е. Фиг. 6В демонстрирует репрезентативные графики проточной цитометрии CD8⁺ Т-клеток после инкубации с суперотопом МНС-II- или МНС-Е-рестриктированными пептидами в присутствии пан-МНС-I, блокирующего mAb W6/32 (анти-МНС-I), МНС-II, связывающего пептид CLIP (анти-МНС-II) или МНС-Е, связывающего пептид VL9 (анти-МНС-Е). Фиг. 6С демонстрирует нацеливание на эпитоп и ограничение по МНС SIVgag-специфических CD8⁺ Т-клеток с использованием проточной цитометрии ICS для обнаружения распознавания 125 последовательных 15-мерных пептидов gag (с перекрыванием 11 аминокислот). Отдельные пептиды, приводящие к специфическим ответам CD8⁺ Т-клеток, обозначены прямоугольником с рисунком прямоугольника, демонстрирующие МНС-рестрикцию, как определено путем блокирования анти-пан-МНС-I mAb W6/32, МНС-Е, блокирующего пептид VL9, и МНС-II, блокирующего пептид CLIP. Ограничение по МНС-Ia-, МНС-Е- и МНС-II основывалось на > 90% блокировании отклика только W6/32 (метки штриховки направлены от левого нижнего угла к верхнему правому углу), только VL9 (линии штриховки направлены от нижнего правого угла к верхнему левому углу; горизонтальные линии штриховки) и только СЫР (сплошная заливка) соответственно, при этом ответы, не соответствующие этим критериям, помечены как неопределенные (нет заливки).

Фиг. 7 демонстрирует схематические конструкции изолята 68-1 RhCMV и RhCMV, созданных с помощью генного инжиниринга 68-1 в полноразмерный геном дикого типа (FL). Определенные конструкции FL были удалены для генов RhCMV, гомологичных HCMV UL128 и UL130 (ΔUL128-UL130) только или в комбинации с семейством из шести генов RhCMV, гомологичных HCMV UL146 и UL147 (ΔUL128-UL130 + семейство ΔUL146/7).

Фиг. 8А-8Д демонстрируют ответы CD8⁺ Т-клеток на цельный SIVgag (с использованием перекрывающихся пептидов) или на указанные ограниченные по МНС-Е или МНС-II "суперотопные" пептиды у макак-резус, инокулированных указанными конструкциями. Т-клеточные ответы измеряли с помощью ICS в PBMC в указанные дни после инокуляции. Фиг. 8А демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток у макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gag. Фиг. 8В демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток у макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gagΔUL128-UL130. Фиг. 8С демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gagΔUL128-UL130ΔUL146 (3). Фиг. 8Д демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gagΔUL128-UL130ΔUL147(6). Фиг. 9А-9С демонстрируют ответы CD8⁺ Т-клеток на цельный SIVgag (с использованием перекрывающихся пептидов) или на указанные рестриктированные по МНС-Е или МНС-II "суперотопные" пептиды у макак-резус, инокулированных указанными конструкциями. Т-клеточные ответы измеряли с помощью ICS в PBMC в указанные дни после инокуляции. Фиг. 9А демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток у макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gagΔUL128-UL130HCMVUL146-UL147. Фиг. 9В демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток у макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gagΔUL128-UL130HCMVUL146. Фиг. 9С демонстрирует ответы CD8⁺ Т-клеток макак-резус, инокулированных FL-RhCMVΔRL13gagΔUL128-UL130HCMVUL147. Фиг. 10 демонстрирует схему получения мутантного вируса RhCMV Rh156/Rh108miR-126-3p путем рекомбинации galK. Rh156 и Rh108 являются RhCMV гомологами основных HCMV генов UL122 (IE2) и UL79, соответственно. Фиг. 11 демонстрирует столбчатую диаграмму, показывающую экспрессию miR-126-3p в указанных типах клеток (фибробласты легких резуса, эндотелиальные клетки пупочной вены резуса, макрофаги резуса, полученные из моноцитов CD14⁺, полученные из PBMC и культивированные в присутствии m-CSF в течение 10 дней). Экспрессию MiR измеряли с помощью qPCR из 10 нг РНК. Количество копий определяли по стандартной кривой.

Фиг. 12 демонстрирует набор из двух графиков, на которых показана многоступенчатая кривая роста с использованием вируса RhCMV 68-1 RTN Rh156/Rh108 miR-126-3p ("68-1 miR-126") или RhCMV

68-1 RTN Rh156/Rh108 miR-126 мутантный ("68-1 miR-126mut") вирус в фибробластах резуса, трансфектированных мимиками miR-126-3p ("+" miR-126") или контрольными miPHK ("+" Neg"). Штамм 68-1 RhCMV лишен гомологов HCMV UL128 и UL130, также как и UL146 и UL147. RTN = слитый белок rev, tat и nef белков SIVmac239, экспрессирующийся через промотор EF1a и вставленный в ген Rh211 RhCMV. Этот вирус содержит четыре нацеливающие последовательности для miR126-3p в 3'-нетранслируемых областях каждого Rh156 и Rh108.

Фиг. 13 демонстрирует набор из двух графиков, на которых показана многоступенчатая кривая роста с использованием вируса RhCMV 68-1.2 Rh156/Rh108 miR-126-3p ("68-1.2 miR-126") или мутантного вируса RhCMV 68-1 Rh156 Rh108 miR-126. ("68-1.2 miR-126mut") в эндотелиальных клетках. Штамм 68-1.2 содержит гомологи UL128 и UL130 другого штамма RhCMV и лишен гомологов UL146 и UL147. Этот вирус содержит четыре нацеливающие последовательности для miR126-3p в 3'-нетранслируемых областях каждого Rh156 и Rh108.

Фиг. 14 демонстрирует частоты SIVgag-специфичных Т-клеток у макак-резус (RM), инокулированных 68-1 RhCMVmiR126/SIVgag, и нацеливание на связанный с ним эпитоп МНС-рестрикцию SIVgag-специфических CD8+ Т-клеток. Штамм 68-1 RhCMV лишен гомологов HCMV UL128 и UL130, также как и UL146 и UL147. SIVgag SIVmac239 экспрессируется через промотор EF1a и встраивается в ген Rh211 RhCMV. Этот вирус содержит четыре нацеливающие последовательности для miR126-3p в 3'-нетранслируемых областях каждого Rh156 и Rh108.

На верхних панелях фиг. 14 продемонстрированы частоты SIVgag-специфичных Т-клеток, измеренные в течении времени у 2 RM, инокулированных 68-1 RhCMVmiR126/SIVgag. Верхняя левая панель демонстрирует ответ CD4+ и CD8+ Т-клеток на SIVgag у каждого RM на пул из 125 перекрывающихся 15-мерных пептидов, перекрывающихся 4 аминокислотами и покрывающих весь белок SIVgag. Верхняя средняя панель демонстрирует ответ CD8+ Т-клеток у каждого RM на два супертопных пептида SIVgag Gag69 и Gag120, презентованных МНС-Е. Верхняя правая панель демонстрирует ответ CD8+ Т-клеток у каждого RM на два супертопных пептида SIVgag Gag53 и Gag73, презентованных МНС-II. Нижняя панель на фиг. 14 демонстрирует нацеливание на эпитоп и МНС-рестрикцию SIVgag-специфических CD8+ Т-клеток с отдельными пептидами, что приводит к специфическим ответам CD8+ Т-клеток, обозначенным прямоугольником. Рисунок прямоугольника обозначает МНС-рестрикцию, что определяется блокированием с помощью анти-пан-МНС-I mAb W6/32, МНС-Е блокированием пептида VL9 и МНС-II блокированием пептида CLIP. МНС-Ia-, МНС-Е- и МНС-II-рестрикция основывалось на > 90% блокировании отклика только W6/32 (сплошная заливка), только W6/32 и VL9 (средняя заливка) и только CLIP (легкая заливка), соответственно, при этом ответы, не соответствующие этим критериям, помечены как неопределенные (нет заливки).

Фиг. 15 представляет собой набор графиков проточной цитометрии, демонстрирующих РВМС от макак резус, вектор-вакцинированных miR126/gag штамма RhCMV 68-1, стимулированных 15-мерными пептидами SIVgag, перекрывающимися четырьмя аминокислотами (SIVgag ORF) или указанными пептидами SIVgag, соответствующими супертопам МНС-II или МНС-Е. CD8+ Т-клетки, отвечающие на МНС-Е или МНС-II-связанные пептиды SIVgag, идентифицировали посредством экспрессии CD69 и TNF-α.

Фиг. 16 демонстрирует схему генерации RhCMV Rh156/Rh108 miR-126-3p/miR-142-3p мутантного вируса посредством galK рекомбинации. Rh156 и Rh108 являются RhCMV гомологами основных генов HCMV UL122 (IE2) и UL79, соответственно. Фиг. 17 демонстрирует частоты SIVgag-специфичных Т-клеток у макак-резус (RM), инокулированных 68-1 RhCMVmiR126miR142/SIVgag, и связанное с ним нацеливание на эпитоп и ограничение по МНС SIVgag-специфических CD8+ Т-клеток. Штамм 68-1 RhCMV лишен гомологов HCMV UL128 и UL130, также как и UL146 и UL147. SIVgag SIVmac239 экспрессируется через промотор EF1a и встраивается в ген RhCMV Rh211. Этот вирус содержит две нацеливающие последовательности для miR126-3p и две нацеливающие последовательности для миелоид-специфического miR142-3p в 3'-нетранслируемых областях каждого Rh156 и Rh108.

На верхней панели фиг. 17 показаны частоты SIVgag-специфических Т-клеток, измеренные в течении времени у одного RM, инокулированного 68-1 RhCMV miR126miR142/SIVgag. Верхняя левая панель на фиг. 17 демонстрирует ответ CD4+ и CD8+ Т-клеток на SIVgag у каждого RM на пул из 125 перекрывающихся 15-мерных пептидов, перекрывающихся 4 аминокислотами и покрывающих весь белок SIVgag. Верхняя средняя панель на фиг. 17 демонстрирует ответ CD8+ Т-клеток в каждого RM на два общих пептида SIVgag, презентованных МНС-Е. В верхней правой панели на фиг. 17 показан ответ CD8+ Т-клеток у каждого RM на два общих пептида SIVgag, презентованных МНС-II. Нижняя панель на фиг. 17 показывает нацеливание на эпитоп и ограничение по МНС SIVgag-специфических CD8+ Т-клеток с отдельными пептидами, приводящими к специфическим CD8+ Т-клеточным ответам, обозначенные прямоугольником. Рисунок прямоугольника обозначает ограничение по МНС, что определяется блокированием mAb анти-пан-МНС-I mAb W6/32, МНС-Е блокированием пептида VL9 и МНС-II блокированием пептида CLIP. МНС-Ia-, МНС-Е- и МНС-II-рестрикция основывалось на > 90% блокировании ответа только W6/32 (без заполнения), только W6/32 и VL9 (диагональные штриховки) и только CLIP

(горизонтальные штриховки), соответственно, при этом ответы, не соответствующие этим критериям, помечены как неопределенные (сплошная заливка). Эти результаты показывают, что 68-1 RhCMV (= исключено для гомологов UL128, UL130, UL146, UL147) mir126mir142/SIVgag вызывает только ограниченные по MHC-Ia CD8+ Т-клетки.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

В последующем подробном описании делается ссылка на прилагаемые чертежи, которые составляют его часть и на которых демонстрируются в качестве иллюстрации варианты осуществления, которые могут быть осуществлены на практике. Следует понимать, что могут быть использованы другие варианты осуществления и могут быть сделаны структурные или логические изменения, не выходя за рамки объема открытия. Следовательно, последующее подробное описание не следует рассматривать в ограничивающем смысле, а объем вариантов осуществления определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Различные операции могут быть описаны как множественные дискретные операции по очереди способом, который может быть полезен для понимания вариантов осуществления; однако порядок описания не следует истолковывать как подразумевающий, что эти операции зависят от порядка.

Описание может использовать описания на основе перспективы, такие как вверх/вниз, сзади/спереди и сверху/снизу. Такие описания просто используются для облегчения обсуждения и не предназначены для ограничения применения вариантов осуществления изобретения.

Могут быть использованы термины "соединенный" и "связанный" вместе с их производными. Следует понимать, что эти термины не предназначены в качестве синонимов друг для друга. Скорее в конкретных вариантах осуществления "соединенный" может использоваться для указания того, что два или более элемента находятся в прямом физическом или электрическом контакте друг с другом. "Связанный" может означать, что два или более элемента находятся в прямом физическом или электрическом контакте. Однако "связанный" может также означать, что два или более элемента не находятся в прямом контакте друг с другом, но все же кооперируются или взаимодействуют друг с другом.

Для целей описания фраза в форме "А/В" или в форме "А и/или В" означает (А), (В) или (А и В). Для целей описания фраза в форме "по крайней мере один из А, В и С" означает (А), (В), (С), (А и В), (А и С), (В и С) или (А, В и С). Для целей описания фраза в форме "(А) В" означает (В) или (АВ), то есть А является необязательным элементом. В описании могут использоваться термины "вариант осуществления" или "варианты осуществления", каждый из которых может относиться к одному или нескольким из одинаковых или различных вариантов осуществления. Кроме того, термины "содержащий", "включающий", "имеющий" и тому подобное, используемые в отношении вариантов осуществления, являются синонимами.

Варианты осуществления в данном документе представляют рекомбинантные векторы CMV, включая, но не ограничиваясь этим, рекомбинантные векторы CMV, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный белковый антиген и по меньшей мере один элемент распознавания микроРНК, специфичный для микроРНК, экспрессируемой клеткой эндотелиальной линии, которая функционально связана с геном CMV, который является необходимым или увеличивающим рост CMV. Векторы не экспрессируют: активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; или активные белки UL146/147 или их ортологи. В настоящем документе также представлены векторы человеческого цитомегаловируса (HCMV), включая без ограничений рекомбинантные векторы HCMV, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный белковый антиген и не экспрессирующие активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; или активные белки UL146/147 или их ортологи. Далее описаны способы использования новых рекомбинантных векторов CMV, такие как способы генерирования иммунного ответа на гетерологичный антиген у субъекта.

1. Термины

Если не указано иное, технические термины используются в соответствии с обычным использованием.

Все публикации, патенты, патентные заявки, интернет-сайты и регистрационные номера/базы данных последовательностей (включая как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности), процитированные в данном документе, тем самым включены в качестве ссылки в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка, интернет-сайт или регистрационный номер/база данных последовательности были специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки.

Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут использоваться при практическом применении или тестировании этого открытия, подходящие способы и материалы описаны ниже. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Чтобы облегчить рассмотрение различных вариантов осуществления изобретения, предоставлены следующие пояснения конкретных терминов:

Антиген.

Используемые в настоящем документе термины "антиген" или "иммуноген" используются взаимно-

заменяемо для обозначения вещества, обычно белка, который способен индуцировать иммунный ответ у субъекта. Термин также относится к белкам, которые являются иммунологически активными в том смысле, что после введения субъекту (либо непосредственно, либо путем введения субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, который кодирует белок) белок способен вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против этого белка.

Введение.

Используемый в настоящем документе термин "введение" означает предоставить или дать субъекту агент, такой как композиция, содержащая эффективное количество вектора CMV, содержащего экзогенный антиген, любым эффективным путем. Типичные пути введения включают, но не ограничиваются ими, инъекционные (такие как подкожный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный и внутривенный), оральный, сублингвальный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути.

Эффективное количество.

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству агента, такого как вектор CMV, содержащий гетерологичный антиген или трансфицированную CD8+ Т-клетку, которая распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс, достаточного для генерирования желаемого ответа, такого как уменьшение или устранение признака или симптома состояния или заболевания или индукция иммунного ответа на антиген. В некоторых примерах "Эффективное количество" - это количество, которое лечит (включая профилактику) один или более симптомов и/или основные причины любого расстройства или заболевания. Эффективное количество может представлять собой терапевтически эффективное количество, включая количество, которое предотвращает развитие одного или более признаков или симптомов конкретного заболевания или состояния, таких как один или более признаков или симптомов, связанных с инфекционным заболеванием, раком или аутоиммунным заболеванием.

МикроРНК.

Используемый в настоящем документе термин "микроРНК" или "miРНК" относится к основному классу биомолекул, участвующих в контроле экспрессии генов. Например, в человеческом сердце, печени или мозге микроРНК играют роль в тканевой спецификации или определении генезиса клеток. Кроме того, микроРНК влияют на различные процессы, включая раннее развитие, пролиферацию и гибель клеток, а также апоптоз и жировой обмен. Большое количество генов микроРНК, разнообразные паттерны экспрессии и обилие потенциальных мишеней для микроРНК позволяют предположить, что микроРНК могут быть значительным источником генетического разнообразия. Зрелая микроРНК обычно представляет собой некодирующую РНК размером 18-25 нуклеотидов, которая регулирует экспрессию мРНК, включая последовательности, комплементарные микроРНК. Известно, что эти небольшие молекулы РНК контролируют экспрессию генов, регулируя стабильность и/или трансляцию мРНК. Например, микроРНК связываются с 3'-UTR мРНК-мишени и подавляют трансляцию. МикроRNAs также могут связываться с мРНК-мишенями и опосредовать молчание генов через RNAi-путь. МикроРНК также могут регулировать экспрессию генов, вызывая конденсацию хроматина.

МикроРНК заставляет замолчать трансляцию одной или более специфических молекул мРНК путем связывания с элементом распознавания микроРНК (MRE), который определяется как любая последовательность, которая определяет пары оснований и взаимодействует с микроРНК где-нибудь на транскрипте мРНК. Часто MRE присутствует в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК, но также может присутствовать в кодирующей последовательности или в 5'-UTR. MRE не обязательно являются идеальными дополнениями к микроРНК, обычно имеют только несколько оснований комплементарности к микроРНК и часто содержат одно или более несовпадений в этих основаниях комплементарности. MRE может представлять собой любую последовательность, способную связываться с микроРНК в достаточной степени, чтобы трансляция гена, с которым функционально связан MRE (таким как ген CMV, который является существенным или усиливающим рост *in vivo*) подавлялась с помощью механизма молчания микроРНК, такого как RISC.

Мутация.

Используемый в настоящем документе термин "мутация" относится к любому отличию в последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида от нормальной, консенсусной или "дикой" последовательности. Мутант представляет собой любую последовательность белка или нуклеиновой кислоты, содержащую мутацию. Кроме того, клетка или организм с мутацией также могут называться мутантом. Некоторые типы мутаций кодирующих последовательностей включают точечные мутации (различия в отдельных нуклеотидах или аминокислотах); молчащие мутации (различия в нуклеотидах, которые не приводят к аминокислотным изменениям); делеции (различия, в которых один или более нуклеотидов или аминокислот отсутствуют, вплоть до делеции всей кодирующей последовательности гена); мутации рамки сдвига (различия, при которых делеция ряда нуклеотидов, неделимых на 3, приводит к изменению аминокислотной последовательности). Мутация, которая приводит к различию в аминокислоте, также можно назвать мутацией аминокислотной замены. Мутации аминокислотной замены могут быть описаны заменой аминокислоты относительно дикого типа в конкретной позиции в аминокислотной последо-

вательности.

Нуклеотидные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот: Термины "нуклеотидные последовательности" и "последовательности нуклеиновых кислот" относятся к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или последовательностям рибонуклеиновой кислоты (РНК), в том числе, без ограничения, мессенджер РНК (мРНК), гибриды ДНК/РНК, или синтетические нуклеиновые кислоты. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной, или частично или полностью двухцепочечной (дуплекс). Дуплексные нуклеиновые кислоты могут быть гомодуплексными или гетеродуплексными.

Функционально связанный: в том качестве, в котором термин "функционально связанный" используется в данном документе, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, если первая последовательность нуклеиновой кислоты размещена таким образом, что она оказывает влияние на вторую последовательность нуклеиновой кислоты. Например, MRE функционально связан с кодирующей последовательностью, которую он заглушает, если связывание микроРНК с MRE заглушает экспрессию кодирующей последовательности. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными или могут действовать на расстоянии.

Промотор: используемый в настоящем документе термин "промотор" может относиться к любой из ряда последовательностей контроля нуклеиновой кислоты, которые направляют транскрипцию нуклеиновой кислоты. Как правило, эукариотический промотор включает необходимые последовательности нуклеиновой кислоты вблизи стартового сайта транскрипции, такие как, в случае промотора полимеразы типа II, элемент ТАТА или любая другая специфическая последовательность ДНК, которая распознается одним или несколькими факторами транскрипции. Экспрессия с помощью промотора может быть дополнительно модулирована элементами энхансера или репрессора. Многочисленные примеры промоторов доступны и хорошо известны специалистам в данной области. Нуклеиновую кислоту, содержащую промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, можно назвать вектором экспрессии.

Рекомбинантный.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантный" применительно к нуклеиновой кислоте или полипептиду относится к такому, который имеет последовательность, которая не встречается в природе, или имеет последовательность, которая образована искусственной комбинацией двух или более отдельно разделенных сегментов последовательности, например, вектор CMV, включающий в себя гетерологичный антиген и/или производит дефект репликации, путем добавления элемента ответа микроРНК, функционально связанного с геном CMV, который необходим или усиливает рост *in vivo*. Эта искусственная комбинация часто достигается химическим синтезом или чаще искусственным манипулированием изолированными сегментами нуклеиновых кислот, например методами генной инженерии. Рекомбинантный полипептид может также относиться к полипептиду, который был получен с использованием рекомбинантных нуклеиновых кислот, включая рекомбинантные нуклеиновые кислоты, перенесенные в организм хозяина, который не является природным источником полипептида (например, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые образуют вектор CMV, содержащий гетерологичный антиген).

Дефектный по репликации.

Используемый в настоящем документе термин "дефектный по репликации" CMV представляет собой вирус, который, оказавшись в клетке-хозяине, не может подвергнуться вирусной репликации, существенно ограничен в своей способности реплицировать свой геном и, таким образом, продуцировать вирионы, недостаточно распространен или недостаточно распределен. Например, вирусы с дефицитом репликации, которые имеют недостаточное распространение, способны реплицировать свои геномы, но не способны инфицировать другую клетку либо потому, что вирусные частицы не высвобождаются из зараженной клетки, либо потому, что высвобождаются неинфекционные вирусные частицы. В другом примере вирусы с дефицитом репликации, которые имеют недостаточное распространение, способны реплицировать свои геномы и могут инфицировать другую клетку, но не секретируются от инфицированного хозяина, и, следовательно, вирус не может распространяться от хозяина к хозяину. В некоторых вариантах осуществления CMV с дефицитом репликации представляет собой CMV, содержащий мутацию, которая приводит к отсутствию экспрессии одного или более генов, необходимых для репликации вируса ("необходимые гены") или необходимых для оптимальной репликации ("усиливающие гены"). Необходимые и усиливающие гены CMV были описаны в данной области техники (в частности, US 2013/0136768, который включен в этот документ посредством ссылки) и описаны в данном документе.

Фармацевтически приемлемые носители.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" является общепринятым. Remington's Pharmaceutical Sciences, EW Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition, 1995, описывает композиции и составы, подходящие для фармацевтической поставки композиций, описанных в этом документе. В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные препараты обычно содержат инъецируемые жидкости, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, фи-

физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или тому подобное в качестве носителя. Для твердых композиций (таких, как порошки, пилюли, таблетки или капсулы), обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, фармацевтические марки маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции для введения могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и буферные агенты и тому подобное, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана. Полинуклеотид: используемый в данном документе термин "полинуклеотид" относится к полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Полинуклеотид состоит из четырех оснований: аденин, цитозин, гуанин и тимин/урацил (урацил используется в РНК). Кодировочная последовательность из нуклеиновой кислоты определяет последовательность белка, кодируемого нуклеиновой кислотой.

Полипептид: термины "белок", "пептид", "полипептид" и "аминокислотная последовательность" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот, и он может прерываться химическими группами, отличными от аминокислот. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгация с меткой или биоактивным компонентом.

Идентичность последовательности/сходство.

Как используется в настоящем документе, идентичность/сходство между двумя или более последовательностями нуклеиновой кислоты или двумя или более аминокислотными последовательностями выражается в терминах идентичности или сходства между последовательностями. Идентичность последовательности может быть измерена с точки зрения процентной идентичности; чем выше процент, тем более идентичны последовательности. Сходство последовательностей может быть измерено в терминах процентной идентичности или сходства (которое учитывает консервативные аминокислотные замены); чем выше процент, тем более похожи последовательности. Полипептиды или их белковые домены, которые имеют значительную идентичность последовательности, а также функционируют одинаково или сходно друг с другом (например, белки, которые выполняют одни и те же функции у разных видов или мутантные формы белка, которые не изменяют функцию белка или его величину), могут называться "гомологами".

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Различные программы и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith & Waterman, *Adv Appl Math* 2, 482 (1981); Needleman & Wunsch, *J Mol Biol* 48, 443 (1970); Pearson & Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 2444 (1988); Higgins & Sharp, *Gene* 73, 237-244 (1988); Higgins & Sharp, *CABIOS* 5, 151-153 (1989); Corpet et al., *Nuc Acids Res* 16, 10881-10890 (1988); Huang et al., *Computer App Biosci* 8, 155-165 (1992); и Pearson et al., *Meth Mol Bio* 24, 307-331 (1994). Кроме того, Альтшул и др., *J Mol Biol* 215, 403-410 (1990), подробно описывают способы выравнивания последовательностей и расчеты гомологии.

Базовый инструмент поиска локального выравнивания NCBI (BLAST) (Altschul et al., (1990) *supra*) доступен из нескольких источников, включая Национальный центр биологической информации (NCBI, Национальная медицинская библиотека, корпус 38A, комната 8N805, Bethesda, MD 20894) и в интернете, для использования в связи с программами анализа последовательности blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx. Дополнительную информацию можно найти на веб-сайте NCBI.

BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, в то время как BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Если две сравниваемые последовательности имеют общую гомологию, то выбранный выходной файл представит эти области гомологии в виде выровненных последовательностей. Если две сравниваемые последовательности не имеют гомологии, выбранный выходной файл не будет представлять выровненных последовательностей. После выравнивания количество совпадений определяют путем подсчета количества положений, в которых идентичный нуклеотидный или аминокислотный остаток представлен в обеих последовательностях. Процент идентичности последовательности определяется путем деления числа совпадений либо на длину последовательности, указанной в идентифицированной последовательности, либо на сочлененную длину (например, 100 последовательных нуклеотидов или аминокислотных остатков из последовательности, указанной в идентифицированной последовательности) с последующим умножением полученного значения на 100. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет 1166 совпадений, будучи выровнена с тестовой последовательностью, имеющей 1154 нуклеотида, на 75,0% идентична тестовой последовательности ($1166 \div 1554 \times 100 = 75,0$). Процент идентичности последовательности округляется до десятых. Например, 75,11, 75,12, 75,13 и 75,14 округляются до 75,1, а 75,15, 75,16, 75,17, 75,18 и 75,19 округляются до 75,2. Значение длины всегда будет целым числом. В другом примере целевая последовательность, содержащая 20-нуклеотидный участок, которая выравнивается с 20 последовательными нуклеотидами из идентифицированной последовательности, как указано далее, содержит участок,

которая имеет 75-процентную идентичность последовательности с этой идентифицированной последовательностью (то есть $15 \div 20 \cdot 100 = 75$). Для сравнения аминокислотных последовательностей, содержащих более 30 аминокислот, используется тождество последовательностей Blast 2 с использованием матрицы BLOSUM62 по умолчанию с установленными параметрами по умолчанию (штрафы за внесение делеции 11 и за продолжение делеции 1). Гомологи, как правило, характеризуются наличием по меньшей мере 70% идентичности последовательностей, подсчитанных по выравниванию по всей длине с аминокислотной последовательностью с использованием NCBI Basic Blast 2.0, выверяемый blastp с базами данных, такими как база данных nr, база данных swissprot и база данных запатентованных последовательностей. Запросы, выполняемые с помощью программы blastn, фильтруются с помощью DUST (Hancock & Armstrong, Comput Appl Biosci 10, 67-70 (1994). Другие программы используют SEG. Кроме того, может быть выполнено ручное выравнивание. Белки с еще большим сходством будут демонстрировать увеличение процентной идентичности при оценке этим методом, например, идентичность последовательности белка, по меньшей мере, примерно на 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%.

При выравнивании коротких пептидов (менее чем, приблизительно, 30 аминокислот) выравнивание выполняется с использованием тождества последовательностей Blast 2, используя матрицу PAM30, установленную на параметры по умолчанию (штрафы за открытие составят 9 и за продолжение делеции 1). Белки с еще большим сходством с эталонной последовательностью будут демонстрировать увеличение процентной идентичности при оценке этим методом, например, по меньшей мере, приблизительно 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичность последовательности с белком. Когда меньше чем полная последовательность сравнивается на предмет идентичности последовательности, гомологи, как правило, будут обладать по меньшей мере 75% идентичностью последовательности в коротких окнах из 10-20 аминокислот и могут обладать идентичностью последовательности, по крайней мере, на 85, 90, 95 или 98% в зависимости от их идентичности эталонной последовательности. Методы определения идентичности последовательности по таким коротким окнам описаны на веб-сайте NCBI.

Одним из признаков того, что две молекулы нуклеиновой кислоты тесно связаны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях, как описано выше. Последовательности нуклеиновых кислот, которые не проявляют высокой степени идентичности, могут, тем не менее, кодировать идентичные или сходные (консервативные) аминокислотные последовательности из-за вырожденности генетического кода. Изменения в последовательности нуклеиновой кислоты могут быть сделаны с использованием этого вырождения для получения множества молекул нуклеиновой кислоты, которые все кодируют, по существу, один и тот же белок. Такие гомологичные последовательности нуклеиновой кислоты могут, например, иметь идентичность последовательности по меньшей мере приблизительно на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 или 99% по отношению к нуклеиновой кислоте, кодирующей белок.

Субъект.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к живым многоклеточным организмам позвоночных, категории, которая включает млекопитающих как человека, так и не принадлежащих к человеческому роду млекопитающих.

Супертотоп.

Используемый в настоящем документе термин "супертотоп" или "суперотоп пептид" относится к эпиту или пептиду, который распознается Т-клетками в более чем 90% популяции, независимо от гаплотипа МНС, т.е. в присутствии или отсутствии данных аллелей МНС-I или МНС-II.

Лечение.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" относится к вмешательству, которое ослабляет признак или симптом заболевания или патологического состояния. Используемые здесь термины "лечение", "лечить" и "лечения" применительно к заболеванию, патологическому состоянию или симптому также относятся к любому наблюдаемому полезному эффекту лечения. Полезный эффект этот может быть подтвержден, например, отсроченным появлением клинических симптомов заболевания у восприимчивого субъекта, снижением тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, более медленным прогрессированием заболевания, уменьшением числа рецидивов заболевания, улучшением общего состояния здоровья или самочувствия субъекта или другими параметрами, хорошо известными в данной области техники, которые специфичны для конкретного заболевания. Профилактическое лечение представляет собой лечение, назначаемое субъекту, который не проявляет признаков заболевания или проявляет только ранние признаки, с целью снижения риска развития патологии. Терапевтическое лечение представляет собой лечение, назначаемое субъекту после развития признаков и симптомов заболевания.

II. Рекомбинантные CMV векторы и способы их использования.

Заявленные в настоящем документе векторы цитомегаловируса человека или животного (CMV) способны многократно инфицировать организм. Векторы CMV содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует гетерологичный белковый антиген и не экспрессирует активные белки UL128, UL130, UL146 и UL147. Векторы содержат активные гены UL40, US27 и US28. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV представляет собой вектор CMV (HCMV) человека, вектор CMV (CyCMV) рода обезьян цинамоглус или вектор CMV (RhCMV) рода обезьян резус. Также в настоящем

документе заявлены векторы CMV, содержащие все вышеуказанные модификации и дополнительно содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, которая служит в качестве элемента ответа miRNA (MRE), который подавляет экспрессию в присутствии miRNA, экспрессируемой эндотелиальными клетками. Примеры таких miRNA, экспрессируемых эндотелиальными клетками, включают miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328 (Wu F., Yang Z, Li G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;386(4):549. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.075.); включены в настоящее описание посредством ссылки). MRE функционально связан с геном CMV, который необходим или усиливает рост CMV in vivo. Примеры таких генов включают IE2 и UL79 или их ортологи. Один, два, три или более генов CMV могут быть функционально связаны с одним, двумя, тремя или более MRE в векторе.

В некоторых вариантах осуществления MRE может представлять собой любой элемент распознавания miPHK, который подавляет экспрессию в присутствии miPHK, экспрессируемой эндотелиальными клетками. В некоторых вариантах осуществления MRE вектора подавляет экспрессию в присутствии одного или более из miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления MRE вектора подавляет экспрессию в присутствии miR-126-3p (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления MRE вектора содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления векторы CMV, заявленные в данном документе, содержат первый MRE, который подавляет экспрессию в присутствии микроPHK, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения, и второй MRE, который подавляет экспрессию в присутствии микроPHK, которая экспрессируется клеткой миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления первое MRE подавляет экспрессию в присутствии одного или более из miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378 и miR-296, и miR-328. В некоторых вариантах осуществления первое MRE подавляет экспрессию в присутствии miR-126-3p (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления первая MRE вектора содержит последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вторая MRE заглушает экспрессию в присутствии одного или более из miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR146a, miR-132, miR-21 и miR-125. В некоторых вариантах осуществления второй MRE подавляет экспрессию в присутствии miR-142-3p (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления второй MRE вектора содержит последовательность SEQ ID NO: 4. Векторы CMV, содержащие MRE, которые подавляют экспрессию в присутствии miR-142-3p, открыты, например, в WO 2017/087921, которая включена посредством ссылки в полном объеме.

Такие MRE могут быть полностью комплементарными miPHK. Альтернативно, другие последовательности могут быть использованы в качестве MRE для данной miPHK. Например, MRE могут быть перечислены из последовательностей. В одном из примеров miPHK можно искать на сайте microRNA.org (www.microRNA.org). В свою очередь, список мРНК-мишеней miPHK будет указан. Например, на следующей странице: <http://www.microRNA.org/microRNA/getTargets.do?matureName=hsa-miR-142-3p&organism=9606>, к которой последний раз обращались 06 окт. 2015, будут перечислены предполагаемые мРНК-мишени miR-142-3p. Для каждой из перечисленных мишеней на странице могут быть доступны "детали выравнивания" и предполагаемые MRE. В некоторых вариантах осуществления MRE вектора подавляет экспрессию в присутствии одного или более из miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления MRE вектора подавляет экспрессию в присутствии miR-126-3p (SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления MRE вектора может подавлять экспрессию в присутствии miR-142-3p (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления MRE вектора имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2. В дополнительных вариантах осуществления MRE вектора имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

Специалист в данной области техники может выбрать подтвержденную, предполагаемую или мутированную последовательность MRE из литературных источников, которые, как можно предположить, индуцируют подавление в присутствии miRNA, экспрессируемой в эндотелиальной клетке или миелоидной клетке, такой как макрофаг. Один из примеров связан с вышеуказанным веб-сайтом. Специалист в данной области техники может затем получить экспрессирующую конструкцию, посредством которой репортерный ген (такой как флуоресцентный белок, фермент или другой репортерный ген) обладает экспрессией, управляемой промотором, таким как конститутивно активный промотор или клеточно-специфический промотор. Затем последовательность MRE может быть введена в экспрессирующую конструкцию. Экспрессирующая конструкция может быть трансфектирована в соответствующую клетку, и клетка трансфектирована интересующей miPHK. Отсутствие экспрессии репортерного гена указывает на то, что MRE подавляет экспрессию гена в присутствии miRNA.

Патоген-специфические антигены могут быть получены из любого патогена человека или животного. Патоген может представлять собой вирусный патоген, а антиген может представлять собой белок, полученный из вирусного патогена. Вирусы включают, но не ограничиваются ими, аденовирус, вирус Коксаки, вирус гепатита А, полиовирус, риновирус, простой герпес типа 1, простой герпес типа 2, вирус ветряной оспы, вирус Эпштейна-Барра, герпесвирус саркомы Капоши, цитомегаловирус человека, герпесвирус человека, тип 8, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки, вирус денге, вирус Западного Нила, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гриппа, вирус кори, вирус паротита,

вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус папилломы человека, вирус бешенства, вирус краснухи, бокавирус человека и парвовирус B19.

Патоген может представлять собой бактериальный патоген, а антиген может представлять собой белок, полученный из бактериального патогена. Патогенные бактерии включают в себя, но не ограничиваются ими, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae* and *Yersinia pestis*. Патоген может быть паразитом, а антиген может представлять собой белок, полученный из паразита. Паразит может представлять собой простейший организм или простейший организм, вызывающий такие заболевания, как, но не ограничиваясь этим, акантамебиаз, бабезиоз, балантидиаз, бластоцистоз, кокцидий, диентамебиаз, амебиаз, лямблиоз, изоспориаз, лейшманиоз, первичный амебный менингоэнцефалит (ПАМ), малярия, риноспориоз, токсоплазмоз-паразитарная пневмония, трихомониаз, сонная болезнь и болезнь Шагаса. Паразит может представлять собой организм гельминта или червя, или заболевание, вызываемое организмом гельминта, такое как, но не ограничиваясь этим, анкилостомидоз/нематода, анисакиоз, аскариды--паразитарная пневмония, аскариды--байлисаскаридоз, солитер-инфекция вызванная ленточными червями, клонорхоз, *Diostophyme renalis* инфекция, дифиллоботриоз-цепень, Гвинейский червь-дракункулез, Эхинококкоз-цепень, острица-энтеробиоз, печеночная трематоза-фасциоз, фасциолопсоз-кишечная двуустка, гнатостомоз, гименолепаз, лоаоз, калабарская опухоль, мансонеллез, филяриоз, метагонимоз-кишечный трематодоз, речная слепота, китайская двуустка-клонорхоз, парагонимоз, лёгочный сосальщик, шистосома кровяная, билгарциоз или шистосомоз (все виды), кишечный шистосомоз, мочеполовой шистосомоз, шистосомоз *Schistosoma japonicum*, азиатский кишечный шистосомоз, спарганоз, стронгилоидоз-паразитарная пневмония, бычий цепень, свиной цепень, токсокароз, трихинеллез, церкариоз, власоглав, слоновость - лимфатический филяриатоз. Паразит может представлять собой организм или заболевание, вызываемое организмом, такое как, но не ограничиваясь этим, паразитический червь, синдром Хальзуна, миаз, песчаная тропическая блоха, человеческий овод и кандиду. Паразит может быть эктопаразитом или заболеванием, вызванным эктопаразитом, таким как, но не ограничиваясь этим, клоп, головная вошь--педикулез, платяная вошь--педикулез, крабовая вошь--педикулез, демодекс--демодекоз, чесотка, мясная муха и кохлиомия. Антиген может представлять собой белок, полученный из раковой опухоли. Как описано в настоящем документе, раковые заболевания включают лейкоз, лимфому, саркому и те, которые возникают из солидных опухолей. Рак включает, но не ограничивается ими, острый лимфобластный лейкоз; острый миелоидный лейкоз; аденокарциному; рак, связанный со СПИДом; связанную со СПИДом лимфому; анальный рак; рак аппендикса; астроцитому детского мозжечка или мозговую; базально-клеточную карциному; рак желчных протоков, внепеченочный; рак мочевого пузыря; рак костей, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиому ствола мозга; опухоль головного мозга; опухоль головного мозга, мозжечковую астроцитому; опухоль головного мозга, церебральную астроцитому/злокачественную глиому; опухоль головного мозга, эпендимому; опухоль головного мозга, медуллобластома; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли; опухоль головного мозга, зрительных нервов и глиому гипоталамуса; рак молочной железы; бронхиальные аденомы/карциномы; лимфому Беркитта; карциноидную опухоль, детский возраст; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; карциному неизвестного первичного происхождения; лимфому центральной нервной системы, первичную; мозжечковую астроцитому, детский возраст; церебральную астроцитому/злокачественную глиому, детский возраст; рак шейки матки; детские раковые заболевания; хронический лимфолейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелопролиферативные нарушения; рак толстой кишки; кожную Т-клеточную лимфому; десмопластическую мелко-клеточную опухоль; рак эндометрия; эпендимому; рак пищевода; саркому Юинга в семье опухолей Юинга; внекраниальную опухоль зародышевых клеток, детский возраст; внегонадную опухоль зародышевых клеток; рак внепеченочных желчных протоков; рак глаз, внутриглазную меланому; рак глаз, ретинобластома; рак желчного пузыря; желудочный рак (желудка); желудочно-кишечные карциноидные опухоли; желудочно-кишечные стромальные опухоли (GIST); опухоль зародышевых клеток: экстракраниальную, внегонадную или яичников; гестационную трофобластическая опухоль; глиому ствола мозга; глиому, церебральную астроцитому у детей; глиому, зрительного нерва у детей и гипоталамическую; карциноид желудка; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; рак сердца; гепатоцеллюлярный (печеночный) рак; лимфому Ходжкина; рак носоглотки; гипоталамическую и зрительного нерва глиомы, детский возраст; внутриглазную меланому; островковую клеточную карциному (эндокринная поджелудочная железа); саркому Капоши; рак почки (почечно-клеточный рак); рак гортани; лейкозы: лейкоз,

острый лимфобластный (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом); лейкоз, острый миелолейкоз (также называемый острым миелогенным лейкозом); лейкоз, хронический лимфоцитарный (также называемый хроническим лимфолейкозом); лейкоз, хронический миелогенный (также называемый хроническим миелолейкозом); лейкоз, волосатоклеточный; рак губ и полости рта; рак печени (первичный); рак легких, немелкоклеточный; рак легких, мелкоклеточный; лимфомы; лимфому, связанную со СПИДом; лимфому, лимфому Беркитта; лимфому, кожные Т-клетки; лимфому Ходжкина; лимфомы, неходжкинские (старая классификация всех лимфом, кроме лимфомы Ходжкина); первичную лимфому центральной нервной системы; Marcus Whittle, Смертельная болезнь; макроглобулинемию Вальденстрема; злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому; медуллобластому, детский возраст; меланому; меланому, внутриглазную (глаз); клеточную карциному Меркеля; мезотелиому, злокачественную опухоль у взрослых; мезотелиому, детский возраст; метастатический плоскоклеточный рак шеи с оккультным первичным; рак рта; синдром множественной эндокринной неоплазии, детский возраст; множественное миеломное/плазматическое клеточное новообразование; микоз грибовидный; миелодиспластические синдромы; миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания; миелогенный лейкоз, хронический; миелоидный лейкоз, острый, взрослые; миелоидный лейкоз, острый, детский возраст; миелому множественную (рак костного мозга); миелопролиферативные расстройства, хронические; рак полости носа и околоносовых пазух; рак носоглотки; нейробластому; неходжкинскую лимфому; немелкоклеточный рак легкого; рак полости рта; рак ротоглотки; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; рак яичников; эпителиальный рак яичников (поверхностно-эпителиально-стромальную опухоль); опухоль зародышевых клеток яичника; опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом; панкреатический рак; рак поджелудочной железы, островковые клетки; рак околоносовых пазух и полости носа; рак парашитовидной железы; рак полового члена; рак гортани; феохромоцитому; шишковидная астроцитому; герминому шишковидной железы; пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, детский возраст; аденому гипофиза; неоплазию плазмоцитов/множественную миелому; плевропульмональную бластому; первичную лимфому центральной нервной системы; рак простаты; рак прямой кишки; почечно-клеточный рак (рак почки); переходноклеточный рак почечных лоханок и мочеточника; ретинобластому; рабдомиосаркому, детский возраст; рак слюнных желез; саркому, семейство опухолей Юинга; саркому Капоши; саркому, мягкие ткани; саркому, матка; синдром Сезари; рак кожи (немеланомы); рак кожи (меланомы); карциному кожи, клетки Меркеля; мелкоклеточный рак легкого; рак тонкой кишки; саркому мягких тканей; плоскоклеточный рак - см. рак кожи (немеланомы); плоскоклеточный рак шеи с оккультным первичным, метастатический; рак желудка; супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, детский возраст; Т-клеточную лимфому кожную (микоз грибовидный и синдром Сезари); рак яичек; рак горла; тимому, детский возраст; тимому и карциному тимуса; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы, детский возраст; переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника; трофобластическую опухоль, гестационную; рак с неизвестной первичной локализацией, взрослые; рак с неизвестной первичной локализацией, детский возраст; переходноклеточный рак мочеточника и почечных лоханок; рак уретры; рак матки, эндометрия; саркому матки; рак влагалища; глиома гипоталамуса и Зрительного нерва, детский возраст; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса (рак почки.) Вектор не экспрессирует активный белок UL128, UL130, UL146, UL147 из-за наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL128, UL130, UL146 или UL147, или их гомологи, или их ортологи (гомологичные гены CMV которые заражают другие виды). Мутация может представлять собой любую мутацию, которая приводит к недостаточной экспрессии активных белков. Такие мутации могут включать точечные мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции менее чем всей последовательности, кодирующей белок (укороченные мутации), или делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, или любые другие мутации.

В дополнительных примерах вектор не экспрессирует активный белок UL128, UL130, UL146 или UL147 из-за наличия в векторе последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит антисмысловую или RNAi-последовательность (siRNA или miRNA), которая ингибирует экспрессию белка UL128, UL130 или UL146, или UL147. Мутации и/или антисмысловые и/или РНКi могут быть использованы в любой комбинации для генерации вектора CMV, в котором отсутствуют активные UL128, UL130, UL146 или UL147.

Вектор CMV может содержать дополнительные инактивирующие мутации, известные в данной области техники, для обеспечения различных иммунных ответов, такие как инактивирующая мутация US11 или инактивирующая мутация UL82 (pp71), или любая другая инактивирующая мутация. Вектор CMV также может содержать по меньшей мере одну инактивирующую мутацию в одном или более вирусных генах, кодирующих вирусные белки, которые, как известно в данной области техники, являются существенными или усиливающими для вирусной диссеминации (т.е. распространения от клетки к клетке) *in vivo*. Такие инактивирующие мутации могут быть результатом точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки, мутаций с усечением или делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. Инактивирующие мутации включают любую мутацию в вирусном гене, которая в конечном итоге приводит к снижению функции или к полной потере функции вирусного белка. В некото-

рых вариантах осуществления вектор CMV не экспрессирует активный белок UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV не экспрессирует активный белок US11 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV не экспрессирует активный белок UL82 (pp71) или активный белок US11 или их ортологи.

Также в этом документе описаны способы генерирования ограниченных по МНС-Е ответов CD8+ Т-клеток на гетерологичные антигены у субъекта. Способы включают введение субъекту эффективного количества вектора CMV. В одном варианте осуществления вектор CMV характеризуется наличием последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген, и последовательности нуклеиновой кислоты, которая не экспрессирует активные белки UL128, UL130, UL146 или UL147. Ответ CD8+ Т-клеток, вызванный этим вектором, характеризуется наличием по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, направленных против эпитопов, презентованных МНС-Е. В дополнительных примерах по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или при по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток ограничены по МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки, ограниченные по МНС-Е, распознают пептиды, общие по меньшей мере для 90% других субъектов, иммунизированных вектором. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки направлены против супертопа, представленного МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления способ также может генерировать CD8+ Т-клетки, ограниченные по МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% Т-клеток CD8+, вызванных вектором, ограничены по МНС класса II или его ортологом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 75% CD8+ Т-клеток, вызванных вектором, ограничены по классу II МНС или его ортологу. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки, ограниченные по МНС класса II, распознают пептиды, общие по меньшей мере для 90% других субъектов, иммунизированных вектором. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки направлены против супертопа, представленного МНС класса II. Во втором варианте осуществления вектор CMV характеризуется наличием последовательности нуклеиновой кислоты, которая служит в качестве элемента ответа miPHK (MRE), который функционально связан с необходимыми генами CMV IE2 и UL79 или их ортологами. В некоторых вариантах осуществления MRE подавляет экспрессию в присутствии микроPHK, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения. В некоторых вариантах осуществления MRE подавляет экспрессию в присутствии одного или более из miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления MRE подавляет экспрессию в присутствии miR-126-3p. Вектор также содержит по меньшей мере один гетерологичный антиген и не экспрессирует активные белки UL128, UL130, UL146 или UL147. Вектор также содержит активные UL40, US28 и US27. Ответ CD8+ Т-клеток, вызванный этим вектором, характеризуется наличием по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, направленных против эпитопов, презентованных МНС-Е. В дополнительных примерах по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 75% CD8+ Т-клеток ограничены по МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления некоторые из CD8+ Т-клеток, ограниченных по МНС-Е, распознающих пептиды, являются общими по меньшей мере для 90% других субъектов, иммунизированных вектором.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию рецептора CD8+ Т-клеток в CD8+ Т-клетках, вызванных вектором CMV, где рецептор CD8+ Т-клеток распознает, МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления рецептор CD8+ Т-клеток идентифицируют с помощью секвенирования РНК или ДНК.

В третьем варианте осуществления вектор CMV характеризуется наличием двух последовательностей нуклеиновых кислот, которые служат в качестве MRE, которые функционально связаны с необходимыми генами CMV IE2 и UL79 или их ортологами. В некоторых вариантах осуществления первый MRE подавляет экспрессию в присутствии микроPHK, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения, а второй MRE подавляет экспрессию в присутствии микроPHK, которая экспрессируется клеткой миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления первый MRE подавляет экспрессию в присутствии одного или более из miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления первый MRE подавляет экспрессию в присутствии miR-126-3p. В некоторых вариантах осуществления второй MRE подавляет экспрессию в присутствии одного или более из miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR146a, miR-132, miR-21 и miR-125. В некоторых вариантах осуществления второй MRE подавляет экспрессию в присутствии miR-142-3p. Вектор также содержит по меньшей мере один гетерологичный антиген и не экспрессирует активные белки UL128, UL130, UL146 или UL147. Вектор также содержит активные UL40, US28 и US27. Ответ CD8+ Т-клеток, вызванный этим вектором, характеризуется тем, что по меньшей мере 50% CD8+ Т-клеток направлены против эпитопов, презентованных МНС класса Ia.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию рецептора CD8+ Т-клеток из CD8+ Т-клеток, вызванных вектором CMV, где рецептор CD8+ Т-клеток распознает

МНС класса I/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления рецептор CD8+ Т-клеток идентифицируют с помощью секвенирования РНК или ДНК. Также в данном документе описан способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е-пептид. Этот метод включает введение первому субъекту (или животному) вектора CMV в количестве, эффективном для генерирования набора CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е/пептид. Вектор CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог; или активный белок UL147 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую MRE, который подавляет экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения. Гетерологичный антиген может быть любым антигеном, включая патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или собственный антиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из вариабельной области рецептора Т-клеток или рецептора В-клеток. Этот способ дополнительно включает в себя: идентификацию первого рецептора CD8+ Т-клеток из набора CD8+ Т-клеток, где первый рецептор CD8+ Т-клеток распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления первый рецептор CD8+ Т-клеток идентифицируют секвенированием ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или более CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, где вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй рецептор CD8+ Т-клетки, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор, где второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого рецептора CD8+ Т-клетки, тем самым генерируя одну или более трансфектированных CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс. Одна или более CD8+ Т-клеток для трансфекции экспрессирующим вектором могут быть выделены из первого субъекта или второго субъекта. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать введение одной трансфектированных Т-клеток первому или второму субъекту для лечения заболевания, такого как рак, патогенная инфекция или аутоиммунное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать введение одного или более трансфектированных Т-клеток первому или второму субъекту, чтобы вызвать аутоиммунный ответ на тканеспецифический антиген или аутоантиген хозяина. Также раскрывается трансфектированная CD8+ Т-клетка, которая распознает комплексы МНС-Е-пептид, полученные способом, включающим следующие стадии: (1) введение первому субъекту вектора CMV в количестве, эффективном для генерирования набора CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е/пептид, (2) идентификацию первого рецептора CD8+ Т-клеток из набора CD8+ Т-клеток, где первый CD8+ Т-клеточный рецептор распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс; (3) выделение одной или более CD8+ Т-клеток от первого субъекта или второго субъекта; и (4) трансфекция одной или более CD8+ Т-клеток, выделенных из первого или второго субъекта, с помощью экспрессирующего вектора, тем самым создавая трансфектированную Т-клетку, которая распознает комплексы МНС-Е-пептид. Вектор CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует активный белок UL128 или его ортолог; активный белок UL130 или его ортолог; активный белок UL146 или его ортолог; или активный белок UL147 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления вектор CMV дополнительно содержит вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую MRE, который подавляет экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения. Экспрессирующий вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй рецептор CD8+ Т-клетки, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй рецептор CD8+ Т-клетки, где второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора. Гетерологичный антиген может быть любым антигеном, включая патоген-специфический антиген, тканеспецифический антиген, аутоантиген хозяина или опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления первый рецептор CD8+ Т-клеток идентифицируют с помощью секвенирования РНК или ДНК. Здесь также описаны способы лечения заболевания, такого как рак, патогенная инфекция или аутоиммунное заболевание или расстройство, причем способ включает введение трансфектированной Т-клетки, которая распознает комплексы МНС-Е-пептид, первому или второму субъекту. В настоящем документе также описаны способы индукции аутоиммунного ответа на аутоантиген хозяина или тканеспецифический антиген, причем способ включает введение трансфектированной Т-клетки, которая распознает комплексы МНС-Е-пептид, первому или второму субъекту. В дополнительных примерах способы включают введение эффективного количества второго вектора CMV, причем второй вектор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует второй гетерологичный антиген для субъекта. Этот второй вектор может быть любым вектором CMV, включая вектор CMV с активными белками UL128

или UL130 и/или активными белками UL146 или 147. Второй вектор CMV может содержать второй гетерологичный антиген. Вторым гетерологичным антигеном может быть любой гетерологичный антиген, включая гетерологичный антиген, идентичный гетерологичному антигену в первом векторе CMV. Второй вектор CMV может быть введен в любое время относительно введения первого вектора CMV, включая до, одновременно или после введения первого вектора CMV. Это включает введение второго вектора любое количество месяцев, дней, часов, минут или секунд до или после первого вектора.

CMV векторы человека или животных при использовании в качестве экспрессирующих векторов, врожденно непатогенные у выбранных субъектов, таких как люди. В некоторых вариантах осуществления векторы CMV были модифицированы, чтобы сделать их непатогенными (неспособными к распространению от хозяина к хозяину) у выбранных субъектов.

Гетерологичным антигеном может быть любой белок или его фрагмент, который не является производным от CMV, включая раковые антигены, патоген-специфические антигены, модельные антигены (такие как лизоцим KLN или овальбумин), тканеспецифические антигены, аутоантигены хозяина, или любой другой антиген. Патоген-специфические антигены могут быть получены из любого патогена человека или животного. Патоген может быть вирусным патогеном, бактериальным патогеном или паразитом, а антиген может представлять собой белок, полученный из вирусного патогена, бактериального патогена или паразита. Паразит может быть организмом или заболеванием, вызванным организмом. Например, паразит может представлять собой организм простейших, организм простейших, вызывающий заболевание, организм гельминтов или червя, заболевание, вызываемое организмом гельминтов, эктопаразит или заболевание, вызываемое эктопаразитом. Антиген может представлять собой белок, полученный из рака. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз или лимфому. В определенных вариантах осуществления рак происходит от твердой опухоли. В некоторых вариантах осуществления злокачественные новообразования включают острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, злокачественную меланому, рак молочной железы, рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, почечно-клеточный рак и опухоли половых клеток.

Антиген может быть аутоантигеном хозяина. Аутоантигены хозяина включают, но не ограничиваются ими, антигены, полученные из варибельной области рецептора Т-клеток или из варибельной области рецептора В-клеток. Антиген может быть тканеспецифическим антигеном. Тканеспецифические антигены включают, но не ограничиваются ими, антигены сперматозоидов или антигены яйцеклетки. Векторы CMV, описанные в данном документе, могут использоваться в качестве иммуногенной, иммунологической или вакцинной композиции, содержащей рекомбинантный вирус или вектор CMV и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель. Иммунологическая композиция, содержащая рекомбинантный вирус или вектор CMV (или продукт его экспрессии), вызывает иммунный ответ - местный или системный. Ответ может быть, но не обязательно, защитным. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный вирус или вектор CMV (или продукт его экспрессии), также вызывает локальный или системный иммунный ответ, который может, но не обязательно, быть защитным. Композиция вакцины вызывает местный или системный защитный ответ. Соответственно, термины "иммунологическая композиция" и "иммуногенная композиция" включают "вакцинную композицию" (так как два предыдущих термина могут быть защитными композициями).

Векторы CMV, описанные в данном документе, могут быть использованы в способах индукции иммунного ответа у субъекта, включающих введение субъекту иммуногенной, иммунологической или вакцинной композиции, содержащей рекомбинантный вирус или вектор CMV и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель. Для целей настоящего описания, термин "субъект" включает в себя всех животных, в том числе приматов не человеческого рода, и человека, в то время как "животное" включает в себя всех позвоночных животных, за исключением человека; и "позвоночные" включают в себя всех позвоночных, включая животных (как здесь используется "животное") и людей. И, конечно, подмножество "животных" - это "млекопитающие", которые для целей данного описания включают всех млекопитающих, за исключением людей.

Векторы CMV, описанные в данном документе, могут использоваться в терапевтических композициях, содержащих рекомбинантный вирус или вектор CMV и фармацевтически приемлемый носитель или растворитель. Векторы CMV, описанные в данном документе, могут быть получены путем введения ДНК, содержащую последовательность, которая кодирует гетерологичный антиген в существенном или несущественном участке генома CMV. Способ может дополнительно включать удаление одного или более участков из генома CMV. Способ может включать рекомбинацию *in vivo*. Таким образом, способ может включать трансфектирование клетки ДНК CMV в совместимой с клетками среде в присутствии донорской ДНК, включая гетерологичную ДНК, фланкированную последовательностями ДНК, гомологичными частям генома CMV, посредством чего гетерологичная ДНК вводится в геном CMV и, возможно, затем восстанавливает CMV, модифицированный рекомбинацией *in vivo*. Способ также может включать расщепление ДНК CMV для получения расщепленной ДНК CMV, лигирование гетерологичной ДНК с расщепленной ДНК CMV для получения гибридной CMV-гетерологичной ДНК, трансфекцию клетки

гибридной CMV-гетерологичной ДНК и, возможно, затем восстановление CMV, модифицированного наличием гетерологичной ДНК. Поскольку рекомбинация *in vivo* подразумевается, способ, соответственно, также предоставляет плазмиду, содержащую донорную ДНК, не встречающуюся в природе в CMV, кодирующую полипептид, чуждый CMV, донорская ДНК находится внутри сегмента ДНК CMV, который в противном случае был бы коллинеарен с существенным или несущественным участком генома CMV, так что ДНК из существенного или несущественного участка CMV фланкирует донорскую ДНК. Гетерологичная ДНК может быть вставлена в CMV для генерирования рекомбинантного CMV в любой ориентации, которая обеспечивает стабильную интеграцию этой ДНК и ее экспрессию, когда это желательно.

ДНК, кодирующая гетерологичный антиген в рекомбинантном векторе CMV, также может включать промотор. Промотор может быть из любого источника, такого как вирус герпеса, включая промотор эндогенного цитомегаловируса (CMV), такой как человеческий CMV (HCMV), CMV-резус-макак (RhCMV), мышинный или другой промотор CMV. Промотор может также быть невирусным промотором, таким как промотор EF1 α . Промотор может быть усеченным транскрипционно активным промотором, который содержит область, транскрипционно активную белком, обеспечиваемым вирусом, и минимальную область промотора полноразмерного промотора, из которой происходит усеченный транскрипционно активный промотор. Промотор может состоять из ассоциации последовательностей ДНК, соответствующих минимальному промотору и вышестоящим регуляторным последовательностям. Минимальный промотор состоит из сайта CAP плюс ТАТА-бокс (минимальные последовательности для базового уровня транскрипции; нерегулируемый уровень транскрипции); "восходящие регуляторные последовательности" состоят из вышерасположенного элемента(ов) и энхансерной последовательности(ей). Кроме того, термин "усеченный" указывает на то, что полноразмерный промотор присутствует не полностью, то есть что некоторая часть полноразмерного промотора была удалена. И усеченный промотор может быть получен из герпесвируса, такого как MCMV или HCMV, например HCMV-IE или MCMV-IE. Размер промотора полной длины на основе пар оснований может уменьшаться до 40% и даже до 90%. Промотор также может быть модифицированным невирусным промотором. Что касается промоторов HCMV, ссылка делается на патенты США 5.168.062 и 5.385.839. Что касается трансфекции клеток плазмидной ДНК для экспрессии из нее, ссылка делается на Feigner et al. (1994), J. Biol. Chem. 269, 2550-2561. А что касается прямой инъекции плазмидной ДНК в качестве простого и эффективного метода вакцинации против различных инфекционных заболеваний, делается ссылка на Science, 259: 1745-49, 1993. Следовательно, в рамках данного описания изобретения вектор может быть использован путем прямой инъекции векторной ДНК.

Также описана экспрессионная кассета, которая может быть вставлена в рекомбинантный вирус или плазмиду, содержащую усеченный транскрипционно активный промотор. Экспрессионная кассета может дополнительно включать в себя функциональный усеченный сигнал полиаденилирования; например сигнал полиаденилирования SV40, который является усеченным, но все же функциональным. Учитывая, что природа обеспечивает больший сигнал, действительно удивительно, что усеченный сигнал полиаденилирования является функциональным. Усеченный сигнал полиаденилирования решает проблему ограничения размера вставки рекомбинантных вирусов, таких как CMV. Экспрессионная кассета может также включать гетерологичную ДНК по отношению к вирусу или системе, в которую она встроена; и эта ДНК может быть гетерологичной ДНК, как описано в данном документе.

Что касается антигенов для использования в вакцинах или иммунологических композициях, см. также Медицинский словарь Стедмана (24-е издание, 1982 г., например, определение вакцины (для списка антигенов, используемых в составах вакцин); такие антигены или эпитопы, представляющие интерес, могут быть использованы из этих антигенов. Что касается гетерологичных антигенов, специалист в данной области техники может выбрать гетерологичный антиген и кодирующую ДНК для него из данных об аминокислотах пептида или полипептида и соответствующих последовательностях ДНК, а также из природы конкретной аминокислоты (например, размер, заряд и т.д.) и словаря кодонов без лишних экспериментов.

Один из способов определения Т эпитопов антигена включает картирование эпитопов. Перекрывающиеся пептиды гетерологичного антигена генерируются путем синтеза олигопептидов. Затем отдельные пептиды тестируются на их способность связываться с антителом, вызванным нативным белком, или индуцировать активацию Т-клеток или В-клеток. Этот подход был особенно успешен при картировании Т-клеточных эпитопов, поскольку Т-клетка распознает короткие линейные пептиды в комплексе с молекулами МНС.

Иммунный ответ на гетерологичный антиген генерируется, как правило, следующим образом: Т-клетки распознают белки только тогда, когда белок расщеплен на более мелкие пептиды и презентованы в комплексе, называемом "главный комплекс гистосовместимости (МНС)", расположенном на поверхности другой клетки. Существует два класса комплексов МНС - класс I и класс II, и каждый класс состоит из множества различных аллелей. Различные виды и отдельные субъекты имеют различные типы аллелей комплексов МНС; они, по некоторым оценкам, имеют разные типы МНС. Один тип молекулы МНС класса I называется МНС-E (HLA-E у людей, Mamu-E у RM (макак резус), Qa-1b у мышей).

Следует отметить, что ДНК, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный антиген, сама может включать в себя промотор для управления экспрессией в векторе CMV, или ДНК может быть ограничена кодирующей ДНК гетерологичного антигена. Эта конструкция может быть расположена в такой ориентации относительно эндогенного промотора CMV, что она функционально связана с промотором и таким образом экспрессируется. Кроме того, множественные копии ДНК, кодирующие гетерологичный антиген или использование сильного или раннего промотора или раннего и позднего промотора, или любой их комбинации, могут быть устроены так, чтобы усилить или увеличить экспрессию. Таким образом, ДНК, кодирующая гетерологичный антиген, может быть подходящим образом расположена относительно CMV-эндогенного промотора, или эти промоторы могут быть транслоцированы для инсерции в другом месте вместе с ДНК, кодирующей гетерологичный антиген. Нуклеиновые кислоты, кодирующие более одного гетерологичного антигена, могут быть упакованы в вектор CMV. Далее описаны фармацевтические и другие композиции, содержащие описанные векторы CMV. Такие фармацевтические и другие композиции могут быть составлены так, чтобы их можно было использовать в любой процедуре введения, известной в данной области техники. Такие фармацевтические композиции могут быть введены парентеральным путем (внутрикожно, внутримышечно, подкожно, внутривенно или другими способами). Введение также может осуществляться через слизистую оболочку, например орально, через нос, через половые органы и т.д.

Описанные фармацевтические композиции могут быть получены в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Такие композиции могут вводиться в дозировках и по методикам, хорошо известным специалистам в области медицины, принимая во внимание такие факторы, как порода или вид, возраст, пол, вес и состояние конкретного пациента, а также путь введения. Композиции могут вводиться отдельно или могут вводиться совместно или последовательно с другими векторами CMV или с другими иммунологическими, антигенными или вакцинными, или терапевтическими композициями. Такие другие композиции могут включать в себя очищенные нативные антигены или эпитопы, или антигены, или эпитопы от экспрессии рекомбинантного CMV или другой векторной системы; и вводятся с учетом вышеупомянутых факторов.

Примеры композиций включают жидкие препараты для отверстий, например, для перорального, назального, анального, генитального, например вагинального, и т.д. введения, такие как суспензии, сиропы или эликсиры; и препараты для парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), такие как стерильные суспензии или эмульсии. В таких композициях рекомбинант может находиться в смешении с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза или тому подобное.

Антигенные, иммунологические или вакцинные композиции обычно могут содержать адъювант и количество вектора CMV или продукта экспрессии, чтобы вызвать желаемый ответ. Применительно к людям квасцы (фосфат алюминия или гидроксид алюминия) являются типичным адъювантом. Сапонин и его очищенный компонент Quil A, полный адъювант Фрейнда и другие адъюванты, используемые в исследованиях и ветеринарии, обладают токсичностью, что ограничивает их потенциальное использование в вакцинах, предназначенных для людей. Также можно использовать препараты с определенным химическим составом, такие как мурамил-дипептид, монофосфорил-липид A, фосфолипидные конъюгаты, такие как те, которые описаны у Goodman-Snitkoff et al., J. Immunol. 147: 410-415 (1991), инкапсуляцию белка в протеолипосоме, как описано у Miller et al., J. Exp. Med. 176: 1739-1744 (1992), инкапсуляцию белка в липидных везикулах, таких как липидные везикулы Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, N.H.). Композиция может упаковываться в разовую лекарственную форму для иммунизации путем парентерального (например, внутримышечного, внутрикожного или подкожного) введения или введения через отверстие, например перлингвального (например, орального), внутрижелудочно, через слизистые оболочки, включая интраоральное, интраанальное, интравагинальное и тому подобное введение. И снова эффективная дозировка и способ введения определяются природой композиции, природой продукта экспрессии, уровнем экспрессии, если непосредственно используется рекомбинантный CMV, и известными факторами, такими как порода или вид, возраст, пол, вес, состояние и характер хозяина, а также LD₅₀ и другими процедурами скрининга, которые известны и не требуют лишних экспериментов. Дозировки продукта экспрессии могут составлять от нескольких до нескольких сотен микрограммов, например от 5 до 500 мкг. Вектор CMV можно вводить в любом подходящем количестве для достижения экспрессии при этих уровнях дозировки. В неограничивающих примерах: векторы CMV можно вводить в количестве по меньшей мере 10² БОЕ (бляшкообразующих единиц); таким образом, векторы CMV могут вводиться по меньшей мере в этом количестве; или в диапазоне от, приблизительно, 10² БОЕ до приблизительно 10⁷ БОЕ. Другими подходящими носителями или разбавителями могут быть вода или забуференный солевой раствор с консервантом или без него. Вектор CMV может быть лиофилизирован для ресуспендирования во время введения или может находиться в растворе. "Приблизительно" может означать в пределах 1, 5, 10 или 20% от определенного значения.

Следует понимать, что белки и нуклеиновые кислоты, кодирующие их, по настоящему изобретению, могут отличаться от определенных последовательностей, проиллюстрированных и описанных в

данном документе. Таким образом, изобретение предусматривает удаление, добавление, усечение и замены в показанных последовательностях, при условии, что последовательности функционируют в соответствии со способами изобретения. В этом отношении замены, как правило, носят консервативный характер, то есть те замены, которые имеют место в пределах семейства аминокислот. Так, например, аминокислоты, как правило, разделены на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин и тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируются как ароматические аминокислоты. Вполне предсказуемо, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин или наоборот; аспартата на глутамат или наоборот; треонина на серин или наоборот; или подобная консервативная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не окажет существенного влияния на биологическую активность. Следовательно, белки, имеющие, по существу, ту же аминокислотную последовательность, что и описанные белки, но имеющие незначительные аминокислотные замены, которые не оказывают существенного влияния на иммуногенность белка, находятся в пределах объема изобретения.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть оптимизированы по кодам, например, кодоны могут быть оптимизированы для использования в человеческих клетках. Например, таким образом может быть изменена любая вирусная или бактериальная последовательность. Многие вирусы, включая ВИЧ и другие лентивирусы, используют большое количество редких кодонов, и, изменяя эти кодоны в соответствии с кодами, обычно используемыми в желаемом субъекте, можно добиться повышенной экспрессии гетерологичного антигена, как описано у Andre et al., J. Virol. 72: 1497-1503, 1998.

Рассматриваются нуклеотидные последовательности, кодирующие функционально и/или антигенно эквивалентные варианты и производные векторов CMV и включенные в них гликопротеины. Эти функционально эквивалентные варианты, производные и фрагменты демонстрируют способность сохранять антигенную активность. Например, изменения в последовательности ДНК, которые не изменяют кодируемую аминокислотную последовательность, так же, как и изменения, которые приводят к консервативным заменам аминокислотных остатков, одному или более удалением или добавлениям аминокислот, и замене аминокислотных остатков аминокислотами аналогами кислот являются таковыми, которые не будут существенно влиять на свойства кодируемого полипептида. Консервативными аминокислотными заменами являются глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; серин/треонин/метионин; лизин/аргинин; и фенилаланин/тирозин/триптофан. В одном варианте воплощения изобретения варианты имеют по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии или идентичности с интересующим антигеном, эпитопом, иммуногеном, пептидом или полипептидом.

Идентичность или гомология последовательностей определяется путем сравнения последовательностей, когда они выровнены, чтобы максимизировать перекрывание и идентичность при минимизации разрывов последовательностей. В частности, идентичность последовательности может быть определена с использованием любого из ряда математических алгоритмов. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268, модифицированный как у Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 5873-5877.

Другим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers & Miller, CABIOS 1988; 4: 11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью GCG пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM120, штраф за длину делеции 12 и штраф за делецию 4. Еще одним полезным алгоритмом для идентификации участков локального сходства и выравнивания последовательностей является алгоритм FASTA, как описано у Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 2444-2448.

Подходящими для использования в соответствии с настоящим изобретением является программное обеспечение WU-BLAST (Washington University BLAST) версии 2.0. Версию 2.0 подходящих программ WU-BLAST для нескольких платформ UNIX можно загрузить с <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>. Эта программа основана на версии 1.4 WU-BLAST, которая, в свою очередь, основана на общедоступной версии 1.4 NCBI-BLAST (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul et al., Journal of Molecular Biology 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; Nature Genetics 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877; которые все включены в данный документ посредством ссылки). Различные рекомбинантные нуклеотидные последовательности и антитела и/или антигены по настоящему изобретению получают с использованием стан-

дартных методов рекомбинации и клонирования ДНК. Такие методы хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, "Молекулярное клонирование: лабораторное руководство", второе издание (Sambrook et al. 1989).

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть встроены в "векторы". Термин "вектор" широко используется и понятен специалистам в данной области техники, и при использовании в данном документе термин "вектор" используется в соответствии с его значением для специалистов в данной области техники. Например, термин "вектор" обычно используется специалистами в данной области техники для обозначения носителя, который позволяет или облегчает перенос молекул нуклеиновой кислоты из одной среды в другую или который позволяет или облегчает манипулирование молекулой нуклеиновой кислоты.

Любой вектор, который обеспечивает экспрессию вирусов по настоящему изобретению, может использоваться в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах воплощения описанные вирусы могут быть использованы *in vitro* (например, используя бесклеточные системы экспрессии) и/или в культивируемых клетках, выращенных *in vitro* для получения кодируемого гетерологичного антигена (например, патоген-специфических антигенов, антигенов ВИЧ, опухолевых антигенов и антител), которые затем могут быть использованы для различных применений, таких как производство белковых вакцин. Для таких применений может использоваться любой вектор, который позволяет экспрессию вируса *in vitro* и/или в культивируемых клетках. Для того чтобы описанные гетерологичные антигены экспрессировались, кодирующая белок последовательность гетерологичного антигена должна быть "функционально связана" с регуляторными или контролирующими последовательностями нуклеиновой кислоты, которые управляют транскрипцией и трансляцией белка. Как используются в данном документе, кодирующая последовательность и контролирующая последовательность или промотор нуклеиновой кислоты считаются "функционально связанными", когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы подвергать воздействию экспрессию или транскрипцию и/или трансляцию кодирующей последовательности под влиянием или контролем контролирующей последовательности нуклеиновой кислоты. "Контролирующая последовательность нуклеиновой кислоты" может быть любым элементом нуклеиновой кислоты, таким как, но не ограничиваясь этим, описанные в данном документе промоторы, энхансеры, IRES (участок внутренней посадки рибосомы), интронами и другими элементами, которые направляют экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты или кодирующей последовательности, которая функционально связана с ней. Термин "промотор" будет использоваться в данном документе для обозначения группы модулей контроля транскрипции, которые сгруппированы вокруг сайта инициации для РНК-полимеразы II и которые при функциональном связывании с кодирующими белок последовательностями по настоящему изобретению приводят к экспрессии кодируемого белка. Экспрессия трансгенов по настоящему изобретению может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцибельного промотора, который иницирует транскрипцию только при воздействии какого-либо конкретного внешнего стимула, такого как, без ограничения, антибиотика, такие как тетрациклин, гормоны, такие как экдизон, или тяжелые металлы. Промотор также может быть специфическим для определенного типа клеток, ткани или органа. В данной области техники известно много подходящих промоторов и энхансеров, и любой такой подходящий промотор или энхансер может быть использован для экспрессии трансгенов по изобретению. Например, подходящие промоторы и/или энхансеры могут быть выбраны из базы данных эукариотических промоторов (EPDB).

Настоящее изобретение касается рекомбинантного вирусного вектора, экспрессирующего гетерологичный белковый антиген. В некоторых примерах антиген является антигеном ВИЧ. Преимущественно, антигены ВИЧ включают, но не ограничиваются ими, антигены ВИЧ, рассматриваемые в U.S. Pub. №№ 2008/0199493 A1 и 2013/0136768 A1, которые оба включены в настоящее описание посредством ссылки. ВИЧ, нуклеиновая кислота или ее иммуногенные фрагменты могут быть использованы в качестве белкового антигена ВИЧ. Например, могут быть использованы нуклеотиды ВИЧ, которые рассматривались в US Pub. №№ 2008/0199493 A1 и 2013/0136768 A1. Любой антиген, распознаваемый антителом к ВИЧ, может использоваться в качестве белкового антигена ВИЧ. Белковый антиген также может быть антигеном SIV (вирус обезьяньего иммунодефицита). Например, могут быть использованы антигены SIV, которые обсуждаются в US Pub. №№ 2008/0199493 A1 и 2013/0136768 A1.

Векторы, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут содержать подходящую регуляторную область гена, такую как промотор или энхансер, такую, чтобы антигены по изобретению могли быть экспрессированы. Векторы экспрессии, экспрессирующие антигены по изобретению *in vivo* у субъекта, например, для того чтобы генерировать иммунный ответ против антигена ВИЧ-1 и/или защитный иммунитет против ВИЧ-1, должны быть выбраны такими, чтобы подходить для экспрессии и быть безопасными при использовании *in vivo* для данного субъекта. В некоторых примерах, таких как доклинические испытания ВИЧ-1-иммуногенных композиций и вакцин по изобретению, может быть желательно экспрессирование антител и/или антигенов у лабораторных животных. В других примерах можно экспрессировать антигены у людей, например, в клинических испытаниях и для фактического клинического применения иммуногенных композиций и вакцин по изобретению.

Описанные здесь векторы CMV могут содержать мутации, которые могут препятствовать распро-

странению от хозяина к хозяину, что делает вирус неспособным инфицировать людей с ослабленным иммунитетом или других субъектов, которые могут столкнуться с осложнениями в результате CMV инфекции. Описанные здесь векторы CMV могут также содержать мутации, которые приводят к презентации иммунодоминантных и неиммунодоминантных эпитопов, а также неканонической MHC-рестрикции. Однако описанные здесь мутации в векторах CMV не влияют на способность вектора реинфицировать субъекта, который был ранее инфицирован CMV. Такие мутации CMV описаны, например, в патентных публикациях США 2013-0136768; 2010-0142823; 2014-0141038 и публикации заявки PCT WO 2014/138209, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Описанные векторы CMV можно вводить *in vivo*, например, когда целью является создание иммунного ответа, включая CD8+ иммунный ответ, включая иммунный ответ, характеризующийся высоким процентом ответа CD8+ Т-клеток, ограниченных по MHC-E (или его гомологу или ортологу). Например, в некоторых примерах может быть желательным использовать, описанные векторы CMV у лабораторных животных, таких как макаки-резус для доклинических испытаний иммуногенных композиций и вакцин с использованием RhCMV. В других примерах будет желательно использовать описанные векторы CMV у людей, например, в клинических испытаниях и для практического применения иммуногенных композиций с использованием HCMV. Для таких применений *in vivo* описанные векторы CMV вводят в качестве компонента иммуногенной композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению являются полезными для стимуляции иммунного ответа против гетерологичного антигена, включая патоген-специфический антиген, и могут быть использованы в качестве одного или более компонентов профилактической или терапевтической вакцины против ВИЧ-1 для предотвращения, уменьшения интенсивности или лечения СПИДа. Нуклеиновые кислоты и векторы по настоящему изобретению особенно полезны для разработки генетических вакцин, т.е. вакцин для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих антигены по изобретению, субъекту, такому как человек, таким образом, что антигены затем экспрессируются у субъекта, чтобы вызвать иммунный ответ.

Графики иммунизации (или схемы) хорошо известны для животных (включая людей) и могут быть легко определены для конкретного субъекта и иммуногенной композиции. Следовательно, иммуногены могут вводиться субъекту один или более раз. Предпочтительно существует установленный интервал времени между отдельными введениями иммуногенной композиции. Хотя этот интервал варьируется для каждого субъекта, обычно он составляет от 10 дней до нескольких недель и часто составляет 2, 4, 6 или 8 недель. Для человека интервал обычно составляет от 2 до 6 недель. В особенно предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения интервал является более продолжительным, предпочтительно около 10 недель, 12 недель, 14 недель, 16 недель, 18 недель, 20 недель, 22 недель, 24 недели, 26 недель, 28 недель, 30 недель, 32 недели, 34 недели, 36 недель, 38 недель, 40 недель, 42 недели, 44 недели, 46 недель, 48 недель, 50 недель, 52 недели, 54 недели, 56 недель, 58 недель, 60 недель, 62 недели, 64 недели, 66 недель, 68 недель или 70 недель. Режимы иммунизации обычно включают от 1 до 6 введений иммуногенной композиции, но могут иметь только одно, два или четыре. Способы индукции иммунного ответа могут также включать введение адьюванта с иммуногенами. В некоторых случаях повторная иммунизация с годовым, двухгодовым или другим длинным интервалом (5-10 лет) может дополнить первоначальный протокол иммунизации. Настоящие способы также включают в себя различные схемы прайм-буст. В этих способах одна или более праймерных иммунизаций сопровождаются одной или более бустерными иммунизациями. Фактическая иммуногенная композиция может быть одинаковой или разной для каждой иммунизации и типа иммуногенной композиции (например, содержащей белок или вектор экспрессии), направление и состав иммуногенов также могут варьироваться. Например, если вектор экспрессии используется для стадий праймирования и бустинга, он может быть одного или другого типа (например, ДНК или бактериальный или вирусный вектор экспрессии). Одна успешная схема прайм-буст иммунизации предусматривает две праймирующие иммунизации с интервалом в четыре недели, за которыми следуют две бустерные иммунизации через 4 и 8 недель после последней праймирующей иммунизации. Специалисту в данной области техники также должно быть очевидно, что имеется несколько перестановок и комбинаций, которые охватываются с использованием ДНК, бактериальных и вирусных экспрессирующих векторов по изобретению для обеспечения схем праймирования и бустинга. Векторы CMV могут использоваться повторно при экспрессии разных антигенов, полученных из разных патогенов.

Примеры

Следующие примеры приведены только для иллюстрации. В свете этого изобретения специалисты в данной области техники поймут без лишних экспериментов, что вариации этих примеров и других примеров по изобретению возможны.

Пример 1.

MHC-E-ответы важны для защиты от SIV.

Векторы штамма 68-1 RhCMV/SIV обеспечивают лучшую защиту, когда-либо наблюдаемую против высоковирулентного SIV (Hansen, S.G. et al. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473, 523-7, (2011); Hansen, S.G. et al. Immune clearance of highly pathogenic

SIV infection. *Nature* 502, 100-4, (2013); Hansen, S.G. et al. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature medicine* 15, 293-9, (2009) (далее "Hansen 2009"). В частности, штамм 68.1 вызывает ограниченные по МНС-Е и МНС-II CD8+ Т-клетки (Hansen S.G. et al. Cytomegalovirus vectors violate CD8+ T cell epitope recognition paradigms. *Science* 340, 1237874 (2013) (hereafter "Hansen Science 2013"); Hansen S.G. et al. Broadly targeted CD8(+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science* 351, 714-20 (2016) (hereafter "Hansen 2016")); однако важность таких "нетрадиционных" Т-клеточных ответов в обеспечении защиты ранее не была определена.

RhCMV 68-1 не имеет гомологов HCMV UL128 и UL130, а реинсерция UL128 и UL130 в RhCMV 68-1 (Штамм 68-1.2 RhCMV/gag (UL128/UL130 репарированный)) приводит к полному переходу от МНС-Е и МНС-II к МНС-Ia (фиг. 1) (см. также Hansen Science 2013). Кроме того, делецирование UL128 или UL130 из Штамма 68-1.2 (Штамм 68-1.2 RhCMV/gag (UL130 репарированный) и Штамма 68-1.2 RhCMV/gag (UL128 репарированный)) приводит к смешанному фенотипу: МНС-I и МНС-II, но не к МНС-II супертоп-специфическим или ограниченным по МНС-Е CD8+ Т-клеткам (фиг. 1) (см. также WO/2014/138209).

Чтобы определить, способны ли векторы, лишенные способности вызывать ограниченные по МНС-Е CD8+ Т-клетки, защищать макак-резус (RM) от высоко вирулентного SIV, RM вакцинировали одним из трех векторов: RhCMV 68-1 (делецирован по UL128 и UL130); 68-1.2 (интактный по UL128 и UL130); и UL128-делецированный 68-1.2 (интактный по UL130). Каждый вектор экспрессировал антигены SIV SIVgag, SIVrev-tat-nef- и SIVpol. Используя способ, описанный у Hansen 2009, векторы RhCMV/SIV вводили подкожно (5×10^6 БОЕ на вектор) дважды при $t = 0$ и $t = 18$ недель, и повторное интаректальное заражение лимитирующей дозой SIVmac239 было начато на 91-й неделе. Все RM неоднократно подвергались заражению низкой дозой SIVmac239 до тех пор, пока SIV-инфекция не "была подтверждена" развитием *de novo* SIV Vif-специфических Т-клеточных ответов с результатом, определенным только для безусловно SIV-инфицированных животных. SIV Vif не содержался в вакцине, поэтому эти ответы определяются инфицированием SIV. В то время как 8 из 15 RM, вакцинированных 68-1 RhCMV/SIV, показали (типичный) убедительный контроль SIV, все вакцинированные 68-1.2 и UL128-делецированным 68-1.2 RhCMV/SIV показали явную прогрессирующую инфекцию после заражения, сходную с невакцинированным контролем (фиг. 2). Идентичные результаты наблюдались в независимом эксперименте, сравниваемом 68-1 против вакцинации 68-1.2 RhCMV/SIV у самок RM, зараженных SIVmac239 интравагинальным путем. Величина и функциональный фенотип SIV-специфических ответов CD4+ и CD8+ Т-клеток были сопоставимы во всех 3 вакцинных группах, при этом единственное заметное различие в векторной иммуногенности заключается в природе эпитопов, на которые нацелены SIV-специфичные CD8+ Т-клетки. Конкретно, 68-1 был ограничен по МНС-Е или МНС-II; (Δ UL128) 68-1.2 был ограничен по МНС-Ia или МНС-II (за исключением супертопов МНС-II); и 68-1.2 был ограничен только по МНС-Ia. Эти результаты убедительно указывают на то, что ограниченные по МНС-Е CD8+ Т-клетки и, возможно, МНС-II супертоп-специфичные CD8+ Т-клетки важны для защиты от SIV.

Пример 2.

Делецирование гомологичных генов UL146 и UL147, в дополнение к гомологам UL128 и UL130, необходимо для индукции МНС-Е-ответов у макак циномогус.

RhCMV 68-1 является адаптированным к фибробластам вирусом, который содержит множественные делеции генов, инверсии генов и единичные точечные мутации (Malouli D. et al., Reevaluation of the Coding Potential and Proteomic Analysis of the BAC-Derived Rhesus Cytomegalovirus Strain 68-1. *J Virol* 86, 8959-73 (2012)). Кроме того, RhCMV дикого типа не вызывает МНС-II и МНС-Е-ответов (Hansen Science 2013 и Hansen 2016). Подобно RhCMV, HCMV дикого типа вызывает HLA-E-рестриктивные CD8+ Т-клетки только в исключительных обстоятельствах (Pietra G. et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10896-10901 (2003)). Считается, что RhCMV дикого типа у RM, и предположительно HCMV дикого типа у людей, не вызывает ответов МНС-Е из-за присутствия UL128 и UL130. Однако это не исключает возможности того, что для ответов МНС-Е необходимы другие мутации в 68-1. Чтобы рассмотреть эту возможность, генетические изменения, необходимые для выявления ответов МНС-Е, были определены для других видов, макак цинамогус (*M. fascicularis*).

Чтобы определить, можно ли выявлять нетрадиционные CD8+ Т-клетки у макак *Cynomolgus*, *Cynomolgus* CMV (CyCMV) клонировали в виде бактериальной искусственной хромосомы (BAC). Ген Cy13.1, гомолог RhCMV Rh13.1 и HCMV RL13, был заменен на SIVgag. Полученная CyCMV BAC была полностью секвенирована секвенированием следующего поколения, которое продемонстрировало наличие всех ожидаемых открытых рамок считывания (фиг. 3). Чтобы исследовать, будет ли делеция UL128-130 достаточной для того, чтобы вызывать CD8+ Т-клетки, ограниченные по МНС-Е, гены CyCMV, гомологичные HCMV UL128 и UL130, были делецированы из конструкции-предшественника для генерирования CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130 (фиг. 4).

Иммуногенность CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130 оценивали *in vivo* путем инокуляции макак

циномолгус и мониторинга ответа CD8⁺ Т-клеток памяти периферической крови на пептиды SIVgag. PBMC из CyCMV ΔRL13/SIVgag ΔUL128-130-вектор-вакцинированных макак цинолгус, стимулировали 15-мерными пептидами SIVgag, перекрывающимися четырьмя аминокислотами (GAG ORF) или указанными пептидами SIVgag, соответствующими супертопам MHC-II или MHC-E, и выполнялось внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) с помощью проточной цитометрии. Супертопные пептиды являются пептидами, которые распознаются у 90% или более животных независимо от гаплотипа MHC, то есть в присутствии или отсутствии данных аллелей MHC-I или MHC-II. CD8⁺ Т-клетки, отвечающие на MHC-E или MHC-II-связанные пептиды SIVgag, были идентифицированы через экспрессию IFN-γ и TNF-α (фиг. 5A). Животные выявляли надежные ответы CD8 Т-клеток на SIVgag, когда Т-клетки стимулировались перекрывающимися пептидами, покрывающими весь белок (GAG ORF). Однако CyCMV ARL13/SIVgag AUL128-130 не вызывал ответов CD8⁺ Т-клеток, распознающих ответы супертопа MHC-E (пептиды Gag69 и Gag120, описанные у Hansen Science 2013 и Hansen 2016) или ответы супертопа MHC-II (Gag53 и Gag73, описанные у Hansen Science 2013 и Hansen 2016), которые ранее были обнаружены у всех макак, иммунизированных RhCMV 68-1 (фиг. 5B). Взамен CyCMV ΔRL13/SIVgag ΔUL128-130 индуцировал смесь ограниченных по MHC-I и MHC-II ответов CD8⁺ Т-клеток (фиг. 5C). Тем не менее, MHC-II-супертопа-ответы не наблюдались. Эти результаты указывают на то, что делецирование UL128 и UL130 из CMV дикого типа цинамолгусов недостаточно для выявления ограниченных по MHC-E и специфических по отношению к супертопу MHC-II CD8⁺ Т-клеток.

По меньшей мере две разные возможности могли бы объяснить эти результаты: а) макаки Cynomolgus неспособны вызывать ограниченные по MHC-E и MHC-II супертоп-специфические CD8⁺ Т-клетки, или б) дополнительные мутации в RhCMV 68-1 дают возможность этому вирусу вызывать ограниченные по MHC-E CD8⁺ Т-клетки у макак резус. В дополнение к гомологам UL128 и UL130, в RhCMV 68-1 также отсутствуют гены с гомологией к HCMV UL146 и UL147 (Oxford K. L., M. K. Eberhardt K. W. Yang L. Strelow S. Kelly, S. S. Zhou and P. A. Barry. 2008. Protein coding content of the ULb' region of wild-type rhesus cytomegalovirus. *Virology* 373:181-8; включено в настоящее описание посредством ссылки). RhCMV дикого типа кодирует шесть копий этих CXC-хемокиноподобных белков, три из которых делецированы у RhCMV 68-1, а экспрессия оставшихся 3 генов не известна. Чтобы охарактеризовать эту особенность RhCMV 68-1, был создан CyCMV, у которого отсутствуют не только гомологи UL128 и UL130, но также все шесть гомологов UL146 и UL147 (фиг. 4). PBMC из CyCMVΔRL13/gagΔUL128-130ΔUL146-147 вектор-вакцинированных макак цинамолгусов, стимулировали 15-мерными пептидами SIVgag, перекрывающимися четырьмя аминокислотами (GAG ORF) или указанными пептидами SIVgag, соответствующими супертопам MHC-II или MHC-E, и выполнялось внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS) с помощью проточной цитометрии. CD8⁺ Т-клетки, отвечающие на MHC-E или MHC-II-связанные пептиды SIVgag, идентифицировали с помощью экспрессии IFN-γ и TNF-α. Инокулирование макак цинамолгусов с помощью CyCMV ΔRL13/SIVgagΔUL128/130ΔUL146 выявляет CD8⁺ Т-клетки, которые распознают как MHC-E, так и MHC-II супертопы (фиг. 6A). В частности, Gag69 блокировался пептидом анти-MHC-I и VL9, но не пептидом CLIP, согласующимся с MHC-E-рестрикцией (MHC-E является неполиморфной молекулой MHC-I), тогда как Gag73 блокируется пептидом CLIP, но не пептидом анти-MHC-I или VL9, согласующимся с MHC-II-рестрикцией (фиг. 6B). Эти результаты показывают, что CyCMV ΔRL13/SIVgag ΔUL128-130ΔUL146-147 вызывает CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по MHC-E и MHC-II, но не ограниченные по полиморфному MHC-Ia CD8⁺ Т-клетки (фиг. 6C). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что CXC-хемокино-подобные белки семейства UL146/147 предотвращают индуцирование ограниченных по MHC-E CD8⁺ Т-клеток, а также супертоп-ограниченных по MHC-II CD8⁺ Т-клеток. Соответственно, эти данные подтверждают идею о том, что ограниченные по MHC-E и MHC-II супертоп-специфические CD8⁺ Т-клетки могут индуцироваться только с помощью векторов CMV, в которых отсутствуют как UL128, так и UL130, так же как и всеми или некоторыми или всеми гомологами UL146 и UL147. Ранее было показано, что индуцирование RhCMV ответов CD8⁺ Т-клеток, ограниченных по MHC-E, требует присутствия гомологов UL40 и US28. Поскольку CyCMV также содержал эти гены, эти результаты предполагают, что векторы CMV будут вызывать только MHC-E ответы, если они имеют следующую генетическую структуру: делеция UL128 и UL130 или гомологов; делеция некоторых или всех из UL146 и UL147 или гомологов; наличие UL40 или гомологов и наличие US28 или гомологов.

Пример 3.

UL146 гомологи резус-CMV и человеческого CMV предотвращают индукцию ответов MHC-E у макак резус.

Для демонстрации того, что UL146/147-гомологичные гены RhCMV аналогичным образом предотвращали бы индуцирование ответов MHC-E у RM, даже когда UL128 и UL130 были делецированы, была создана версия RhCMV дикого типа путем восстановления исходной последовательности RhCMV изолята, который дал начало высокомутированному RhCMV 68-1. ULb'-участок вируса-предшественника RhCMV 68-1 был секвенирован из исходного изолята, описанного Gill и др. (Gill R. B. et al., Coding potential of UL/b' from the initial source of rhesus cytomegalovirus Strain 68-1. *Virology* 447, 208-212). Используя генную инженерию бактериальной искусственной хромосомы RhCMV 68-1 (BAC), в серии этапов

мутагенеза был воссоздан полноразмерный геном дикого типа (FL-RhCMV) (фиг. 7). Используя FL-RhCMV-BAC в качестве отправной точки, SIVgag был вставлен в гомолог RhCMV HCMV RL13 для генерации FL-RhCMV Δ RL13gag. При инокулировании RM наблюдались ответы CD8⁺ Т-клеток на SIVgag, но не было ответов на супертопы МНС-II или МНС-E (фиг. 8А). Затем гомологи RhCMV UL128 и UL130 были делецированы для получения FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130. При инокуляции RM SIVgag-специфические CD8⁺ Т-клеточные ответы наблюдались аналогичным образом, но никаких ответов на супертопы МНС-E или МНС-II (фиг. 8В). Эти наблюдения убедительно свидетельствуют о том, что RhCMV гомологи HCMV UL146/147 гена семейства хемокинов ингибируют индукцию ограниченных по МНС-E и МНС-II-супертоп-специфичных CD8⁺ Т-клеток. Поскольку 68-1 RhCMV лишен только 3 из 6 гомологов HCMV UL146 и UL147, центральные 3 гомолога HCMV UL146 и UL147 были делецированы, чтобы определить, позволит ли это RhCMV с делецией UL128-130 вызывать ограничение по МНС-E и МНС-II супертоп-специфические CD8⁺ Т-клетки. Удивительно, однако FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130AUL146(3) был неспособен вызвать к супертопным пептидам МНС-II или МНС-E-рестриктированные CD8⁺ Т-клетки (фиг. 8С). Эти результаты позволяют предположить, что более 3 из 6 гомологов необходимо делецировать или инактивировать, чтобы вызвать ограниченные по МНС-E CD8⁺ Т-клетки. Следовательно, все 6 гомологов UL146 и UL147 были делецированы для получения FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130AUL146(6). RM, инокулированные этим вектором, способны вызывать CD8⁺ Т-клетки, распознающие супертопы МНС-II и МНС-E (фиг. 8D). Эти результаты демонстрируют, что делецирование всех 6 гомологов UL146 и UL147 позволяет RhCMV без UL128+130 вызывать ограниченные по МНС-E- и МНС-II-супертоп-специфические CD8⁺ Т-клетки.

Как CyCMV, так и RhCMV содержат 6 генов, гомологичных двум генам HCMV UL146 и UL147. Взятые вместе, эти вышеупомянутые данные свидетельствуют о том, что эти хемокино-подобные гены как CMV цинамолгусов, так и CMV резусов предотвращают индукцию ответов CD8⁺ Т-клеток, ограниченных по МНС-E. Чтобы определить, был ли этот ингибирующий эффект сохранен в HCMV, UL146 и UL147 HCMV, по отдельности или в комбинации, были инсертированы в FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130AUL146(6) с помощью рекомбинантной BAC. Были созданы три разных химерных вектора: FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130hcmvUL146-UL147 (который содержит оба гена HCMV вместо соответствующих гомологов RhCMV); FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130hcmvUL146 (который содержит HCMV UL146 вместо соответствующих гомологов RhCMV); и FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130hcmvUL147 (который содержит HCMV UL147 вместо соответствующих гомологов RhCMV). Когда RM инокулировали этими тремя конструкциями, ни один из трех рекомбинантных векторов не вызвал CD8⁺ Т-клеток, распознающих супертопы МНС-II или МНС-E (фиг. 9А-9С). Эти результаты указывают на то, что способность предотвращать ограниченные по МНС-E и МНС-II супертоп-специфические CD8⁺ Т-клетки является сохраняемой особенностью HCMV. На основании этих и предыдущих результатов также очевидно, что вектор HCMV, должен обладать следующими характеристиками чтобы вызывать ограниченные по МНС-E и МНС-II супертоп-специфические CD8⁺ Т-клетки: а) отсутствие как UL128, так и UL130; б) отсутствие как UL147, так и UL147; в) наличие UL40; г) наличие либо US28, либо US27.

Пример 4.

Векторы CMV, содержащие специфичные для эндотелиальных клеток элементы распознавания микроРНК (MRE), вызывают ответы CD8⁺ Т-клеток, которые в основном ограничены по МНС-E.

Для ограничения способности векторов на основе RhCMV реплицироваться в клетках эндотелиальной линии RhCMV 68-1 был сконструирован так, чтобы он содержал эндотелий-специфические последовательности-мишени miR-126-3p в 3'-UTR важных вирусных генов. Подобно клеткам миелоидной линии, которые проявляют тканеспецифическую экспрессию miR-142-3p, эндотелиальные клетки экспрессируют miR-126-3p, которая специфична к клеточной линии. Было выдвинуто предположение, что инсерция сайтов-мишеней miR-126-3p в 3'-UTR двух необходимых генов RhCMV (Rh156, необходимого немедленного раннего гена, гомологичного UL122 HCMV (IE2), и Rh108, необходимого немедленного раннего гена, гомологичного UL79 HCMV) будет блокировать репликацию вируса в эндотелиальных клетках, высоко экспрессирующих miR-126-3p, из-за ингибирования трансляции мРНК, кодирующих эти необходимые для вируса белки.

Используя galK-опосредованную BAC рекомбинацию, кассету отбора galK встраивали в 3'-UTR Rh156 и затем заменяли искусственной кассетой, содержащей 4 копии сайта связывания miR-126-3p, разделенных 8 случайными нуклеотидами. Затем выполняли вторую серию рекомбинаций, встраивая кассету galK в 3' UTR Rh108 и заменяя ее на искусственную кассету, как указано выше (фиг. 10). Эти векторы дополнительно экспрессировали гетерологичный антиген, полученный из SIVgag, путем встраивания этого антигена (под контролем промотора EF1 α) в ген Rh211. Успешные рекомбинации были подтверждены с использованием ПЦР (полимеразной цепной реакции) с праймерами, предназначенными для участков, фланкирующих сайт инсерции, и последующего секвенирования продуктов ПЦР. Затем интактную BAC ДНК электропорировали в первичные фибробласты резусов для извлечения вируса, и вирусную ДНК также секвенировали.

Фибробласты легких, эндотелиальные клетки пупочной вены и макрофаги были получены от мака

резус. РНК выделяли из каждого типа клеток и проводили qRT-ПЦР для miR-126-3p и miR-142-3p для всех образцов. Количество копий miR-126-3p и miR-142-3p определяли из 10 нг РНК с использованием стандартной кривой. miR-126-3p miRNA высоко экспрессируется в эндотелиальных клетках макаки резус, но экспрессируется на более низких уровнях в макрофагах, полученных из периферической крови или в первичных фибробластах. Напротив, miR-142-3p высоко экспрессируется в макрофагах, но не в эндотелиальных клетках или фибробластах (фиг. 11). Эти данные демонстрируют, что клетки эндотелиальной линии макаки резус экспрессируют намного более высокие уровни miR-126-3p по сравнению с фибробластами или макрофагами резусов и обеспечивают обоснование использования этой miRNA для нацеливания важных транскриптов RhCMV на эндотелиальные клетки.

В клетках, в которых уровни miR-126-3p высоки, вирусы, содержащие сайты связывания miR-126-3p в необходимых генах (таких как Rh156 и Rh108), строго ограничены в отношении роста, так как miR-126-3p-нагруженный заглушающий комплекс, индуцированный РНК (RISC), будет связываться с 3'UTR Rh156 и Rh108 и блокировать трансляцию. Чтобы продемонстрировать влияние экспрессии miR-126-3p на репликацию вируса, miR-126-3p или имитаторы отрицательного контроля трансфектировали в фибробласты резусов и контролировали рост вируса 68-1 RhCMV, содержащего сайты-мишени miR-126-3p или скремблированную последовательность эквивалентного размера (68-1 Rh156/Rh108 miR-126mut). В частности, теломеризованные фибробласты резусов трансфектировали miРНК отрицательного контроля или имитатором miR-126 РНК и через 24 ч после трансфекции клетки инфицировали RhCMV 68-1 Rh156/Rh108 miR-126 или RhCMV 68-1 Rh156/Rh108 miR-126mut при MOI (множественность инфекции) 0,01. Клетки и супернатант собирали в указанное время и титровали на фибробластах резуса. Как показано на фиг. 12, рост вируса в клетках и высвобождение вируса в супернатант были строго ингибированы для 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126, но не для 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126mut после трансфекции имитаторов miR-126-3p, но не при трансфекции контрольных miРНК. Для дополнительной демонстрации ингибции miR-126-3p вирусного роста в эндотелиальных клетках, сайты-мишени miR-126-3p были встроены в 3'-UTR гомологов IE2 и UL79 RhCMV 68-1.2, который инфицирует эндотелиальные клетки *in vitro* более эффективно, чем RhCMV 68-1, благодаря интактному пентамерному комплексу. Первичные эндотелиальные клетки резуса инфицировали 68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126 или 68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126mut при MOI 0,01. Зараженные клетки или супернатанты собирали через 7 дней, 14 дней, 21 день и 28 дней после заражения с последующим титрованием вируса на фибробластах резуса. Как показано на фиг. 13 68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126-3p, но не контрольный RhCMV 68-1.2, содержащий скремблированные последовательности-мишени miR-126-3p (68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126mut), был сильно ограничен в своей способности расти в эндотелиальных клетках резусов.

Иммуногенность miR-126-рестриктированных вирусов оценивали *in vivo*. Макака резус была привита с помощью вектора 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126/SIVgag (в котором отсутствуют гомологи UL128, UL130, UL146 и UL147, но имеются функциональные гомологи HCMV UL40 и US28, так же как и SIVgag трансген под контролем промотора EF1 α), и CD8⁺ Т-клетки памяти периферической крови выделяли и анализировали относительно ответов на перекрывающиеся пептиды SIVgag с помощью проточной цитометрии ICS (фиг. 15). Животное вызывало устойчивые ответы CD8 Т-клеток на полные пептиды, что было продемонстрировано положительной регуляцией CD69 и TNF α в присутствии перекрывающихся пептидов для SIVgag. Этот результат указывает на то, что общая иммуногенность вакцинного вектора не нарушается при встраивании сайтов-мишеней miR-126-3p. Однако, хотя вектор вызывал CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по МНС-Е, он не вызывал CD8⁺ Т-клетки к МНС-II-рестриктированным эпитопам. Чтобы дополнительно охарактеризовать этот фенотип Т-клеток, два RM были инокулированы 68-1 RhCMV miR-126/SIVgag, и была определена МНС-рестрикция каждого из 125 пептидов SIVgag путем измерения ответов Т-клеток с помощью ICS в присутствии или в отсутствие VL9 или CLIP пептида, которые предотвращают ограниченные по МНС-Е или МНС-II ответы CD8⁺ Т-клеток, соответственно. Как показано на фиг. 14 все пептиды, распознаваемые CD8⁺ Т-клетками, полученные из 68-1 RhCMV miR-126/SIVgag-иммунизированных RM, были презентованы МНС-Е. Эти результаты показывают, что RhCMV 68-1 вызывает CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по МНС-Е и МНС-II, потому что в нем отсутствуют гомологи UL128, UL130, UL146 и UL147 и экспрессируются гомологи UL40 и US28. Встраиванием miR-126-3p в этот остов, МНС-II-ответы были элиминированы.

Эти данные показывают, что инфицирование эндотелиальных клеток необходимо для индукции CD8⁺ Т-клеток, ограниченных по МНС-II. Таким образом, инсерция сайтов-мишеней miR-126-3p имеет результатом "только МНС-Е"-вектор, т.е. вектор, который исключительно вызывает CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по МНС-Е, но не Т-клетки, ограниченные по полиморфным молекулам МНС-I или МНС-II. Поскольку CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по МНС-Е, необходимы для защиты от SIV и, по-видимому, ВИЧ, эти данные также предполагают, что эффективность вектора может быть улучшена путем встраивания miR-126-3p, что сфокусирует ответ CD8⁺ Т-клеток на защитные эпитопы. Соответственно, МНС-Е-оптимизированный вектор HCMV должен иметь следующие характеристики: а) отсутствие как UL128, так и UL130; б) отсутствие как UL146, так и UL147; в) наличие UL40; г) наличие либо US28, либо US27;

и д) встраивание сайтов-мишеней miR-126-3p в 3' UTR необходимых генов, например IE2 или UL79 (или любого из генов, о которых известно, что они необходимы для роста HCMV).

Пример 5.

Векторы CMV, содержащие как специфические для эндотелиальных клеток, так и специфические для миелоидных клеток элементы распознавания микроРНК (MRE), вызывают ответы CD8⁺ Т-клеток, которые в основном ограничены по МНС-Ia.

Ранее нами было продемонстрировано, что RhCMV 68-1, сконструированный так, чтобы содержал специфические для миелоидных клеток последовательности-мишени miR-142-3p в 3'-UTR необходимых вирусных генов, имел полностью противоположный фенотип miR-126-3p-инсерции с полной потерей МНС-E ответов при сохранении МНС-II ответов, приводящих к векторной конструкции, содержащей только МНС-II (см. WO/2017/087921). Чтобы определить влияние комбинированного встраивания miR-142-3p и miR-126-3p, мы использовали рекомбинацию ВАС для встраивания двух копий каждого из miR-126-3p и miR-142-3p в 3' UTR Rh156 и Rh108 (фиг. 16). Эти векторы дополнительно экспрессировали гетерологичный антиген, полученный из SIVgag, путем инсерции этого антигена (под контролем промотора EF1 α) в ген Rh211. Успешные рекомбинации были подтверждены с использованием ПЦР с праймерами, предназначенными для участков, фланкирующих сайт инсерции, и последующего секвенирования продуктов ПЦР. Затем интактную ВАС-ДНК электропорировали в первичные фибробласты резуса для извлечения вируса, и вирусную ДНК также секвенировали.

Иммуногенность miR-126/miR-142-рестриктированных вирусов оценивали *in vivo*. Макака резус была инокулирована вектором 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126 miR-142/SIVgag (в котором отсутствуют гомологи UL128, UL130, UL146 и UL147, но имеются функциональные гомологи HCMV UL40 и US28, так же как и SIVgag трансген под контролем промотора EF1 α) и CD8⁺ Т-клетки памяти периферической крови выделяли и анализировали относительно ответов на пептиды SIVgag с помощью проточной цитометрии ICS (фиг. 17). Животное вызывало устойчивые ответы CD8 Т-клеток на полный белок SIVgag, измеренные в ICS с использованием перекрывающихся пептидов. Тем не менее, вектор действительно выявлял CD8⁺ Т-клетки, распознающие либо ограниченные по МНС-II, либо ограниченные по МНС-E супертопные пептиды. Чтобы дополнительно охарактеризовать этот фенотип Т-клеток, определяли МНС-рестрикцию каждого из 125 пептидов SIVgag путем измерения ответов Т-клеток с помощью ICS в присутствии или в отсутствие рап-МНС-1 (блокирует как МНС-Ia, так и МНС-E), пептида VL9 (блокирует МНС-E) или CLIP пептида (блокирует МНС-II). Как показано на фиг. 17 все пептиды, распознаваемые CD8⁺ Т-клетками, полученные из 68-1 RhCMV miR-126miR-142/SIVgag - иммунизированных RM, были представлены МНС-Ia. Эти результаты показывают, что вектор, в котором отсутствуют UL128, UL130, UL146 и UL147 или их гомологи и который экспрессирует гомологи UL40 и US28, может быть перепрограммирован для получения ограниченных по МНС-Ia CD8⁺ Т-клеток путем встраивания как miR-126-3p, так и miR-142-3p.

Таблица обобщает результаты из приведенных выше примеров. CMV дикого типа, который интактен по всем генам и не ограничен клеточный тип-специфическими miR, вызывает обычные CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по МНС-I. Удаление UL128 и UL130 (по отдельности или в комбинации) имеет результатом векторы, которые вызывают ответы CD8⁺ Т-клеток, ограниченных по смеси МНС-I и (не супертопных) МНС-II. Удаление UL128 и UL130 вместе с гомологами UL146 или UL147 вызывает ответы Т-клеток, ограниченных по МНС-II и МНС-E, включая ответы на супертопы МНС-II и МНС-E. Только векторы, в которых были делецированы все эти гены, вызывают CD8⁺ Т-клетки, ограниченные по МНС-E и МНС-II. Векторы, в которых отсутствуют гомологи UL146 и UL147, но которые имеют гомологи UL128 и UL130, не вызывают ограниченные по МНС-E или МНС-II CD8⁺ Т-клетки, но вместо этого вызывают обычные ограниченные по МНС-I CD8⁺ Т-клетки. Ограничивая экспрессию вирусных генов в эндотелиальных клетках с помощью нацеливания miR-126-3p можно предотвратить индукцию ограниченных по МНС-II CD8⁺ Т-клеток, что приводит к появлению векторов, которые индуцируют исключительно ограниченные по МНС-E CD8⁺ Т-клетки. Ограничивая экспрессию вирусных генов в клетках как эндотелиальной, так и миелоидной линии посредством нацеливания на miR-126-3p и miR-142-3p, можно предотвратить индуцирование ограниченных по МНС-II и МНС-E CD8⁺ Т-клеток, что приводит к появлению векторов которые индуцируют исключительно ограниченные по МНС-Ia-CD8⁺ Т-клетки.

Таблица
Краткое изложение генетических модификаций вектора CMV, которые приводят к конкретной МНС-рестрикции

Генетические модификации вектора CMV				Ограничение по МНС вектор-индуцированные CD8+ Т-клетки				
Rh157.5 (UL128)	Rh157.4 (UL130)	Rh158/161 (UL146/147)	МикроРНК-рестрикция*	МНС-Ia	МНС-II	МНС-II супертопы	МНС-E	МНС-E супертопы
интактный	Интактный	интактный	Ничего	да	нет	нет	нет	нет
делецирован	Интактный	интактный или делецирован	Ничего	да	да	нет	нет	нет
интактный	Делецирован	интактный или делецирован	Ничего	да	да	нет	нет	нет
делецирован	Делецирован	интактный	Ничего	да	да	нет	нет	нет
интактный	Интактный	делецирован	Ничего	да	нет	нет	нет	нет
делецирован	Делецирован	делецирован	Ничего	нет	да	да	да**	да**
делецирован	Делецирован	делецирован	miR-126-3p	нет	нет	нет	да**	да**
делецирован	делецирован	делецирован	miR-142-3p	нет	да	да	нет	Нет
делецирован	делецирован	делецирован	miR-126-3p; miR-142-3p	да	нет	нет	нет	Нет

* Встраивание четырех копий последовательностей-мишеней mi в 3' UTR необходимых вирусных генов IE2 (Rh156) и UL79 (Rh108).

** Праймирование ограниченного по МНС-E ответа также зависит от интактной функции Rh67 и Rh214/220 или их HCMV ортологов (UL40 и US27/28).

Пример 6. Генерация CD8+ Т-клеток, специфичных для пептидов, представляющих интерес в контексте МНС-E

Т-клеточные рецепторы, которые распознают антигенные пептиды, представляющие интерес в контексте классических полиморфных молекул МНС-Ia, могут быть использованы для трансфекции аутологичных Т-клеток для иммунотерапии заболевания, такого как рак или инфекционное заболевание. Основным препятствием для этого подхода является разнообразие МНС-Ia в человеческой популяции, которое ограничивает использование данного TCR (Т-клеточного рецептора) для МНС-Ia-совместимых пациентов. Генерируя TCR-узнающие представляющие интерес антигенные пептиды (например, опухолевые антигенные пептиды и патогенные пептиды) в контексте неклассических, непалиморфных молекул МНС-E, МНС-совместимость утрачивает смысл, и в результате TCR может быть использован у всех пациентов. CD8+ Т-клетки, распознающие комплексы МНС-E/пептид, редки по природе, и в настоящее время нет надежного способа получения таких Т-клеток, направленных против представляющих интерес антигенов, таких как опухолевые антигены, антигены патогенов, тканеспецифичные антигены, или ауто-антигены хозяина. Описанный в данном документе способ основан на обнаружении того факта, что векторы цитомегаловируса резуса (RhCMV) и цитомегаловируса циномоглуса (CyCMV), лишённые генов, гомологичных HCMV UL128, UL130, UL146 и UL147, вызывают ограниченные по МНС-E CD8+ Т-клетки с повышенной частотой. Встраивая интересующий антиген в RhCMV или CyCMV, делецированный по UL128, UL130, UL146 и UL147, можно генерировать CD8+ Т-клетки, направленные против индивидуальных пептидов, презентованных МНС-E. Вектор CMV может быть дополнительно модифицирован путем включения MRE, подавляющего экспрессию генов в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиальной линии, такой как miR-126-3p. МНС-E/пептид-распознающие TCR могут быть идентифицированы любым из ряда способов, но как правило полагаются на секвенирование альфа- и бета-цепей либо непосредственно с помощью ПНР кДНК одиночных клеток, размноженных клонов одиночных клеток или глубокое секвенирование пула пептид-специфических CD8+ Т-клеток. Как вариант, последовательность может быть получена непрямо путем экспансии матрицы РНК, сначала создав целую транскриптомную библиотеку для единичной клетки, размноженного клона одиночной клетки или пула пептид-специфических CD8+ Т-клеток. Пептид-специфические вариабельные последовательности могут быть получены с помощью быстрой амплификации концов кДНК (RACE) или механизма переключения матрицы на 5'-конце РНК (SMART) протоколов, выполняемых на мРНК. ПЦР, закорен-

ная во фланкирующих константных областях или подобным образом из полных библиотек транскриптомов одиночных пептид-реактивных CD8⁺ клеток, может быть секвенирована непосредственно или глобально секвенирована для их соответствующих переменных областей TCR. Подтвержденные комбинации альфа- и бета-цепей, полученные из последовательности TCR отдельных или пулов пептид-реактивных CD8⁺ Т-клеток, могут быть дополнительно синтезированы или клонированы. Полученные конструкции TCR затем могут быть трансфектированы в Т-клетки, которые, в свою очередь, могут вводиться пациентам в качестве терапии (например, лечение рака или лечение инфекционных заболеваний). Методы клонирования и трансфекции переменных участков TCR также обсуждаются в Barsov EV et al., PLoS One 6, e23703 (2011), включенной в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор цитомегаловируса (CMV) для доставки гетерологичного антигена, содержащий:
 - (а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует по меньшей мере один гетерологичный антиген; а также
 - (б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую первый элемент распознавания микроРНК (MRE), функционально связанный с геном CMV, который необходим или усиливает рост CMV, где MRE подавляет экспрессию в присутствии микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения, где микроРНК, которая экспрессируется клеткой эндотелиального происхождения, представляет собой miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 или miR-328;
 при этом вектор не экспрессирует активный белок UL128 или его гомолог, не экспрессирует активный белок UL130 или его гомолог, не экспрессирует активный UL146 или его гомолог и не экспрессирует активный белок UL147 или его гомолог.
2. Вектор CMV по п.1, отличающийся тем, что MRE подавляет экспрессию в присутствии miR-126-3p.
3. Вектор CMV по п.2, отличающийся тем, что MRE подавляет экспрессию UL122 (IE2) и UL79 в присутствии miR-126-3p.
4. Вектор CMV по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере один гетерологичный антиген содержит патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или аутоантиген хозяина.
5. Вектор CMV по п.4, отличающийся тем, что аутоантиген хозяина является антигеном, полученным из переменного участка Т-клеточного рецептора (TCR), или антигеном, полученным из переменного участка В-клеточного рецептора.
6. Вектор CMV по п.4, отличающийся тем, что патоген-специфический антиген получен из патогена, отобранного из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека, вируса иммунодефицита обезьян, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов *Plasmodium* и *Mycobacterium tuberculosis*.
7. Вектор CMV по п.4, отличающийся тем, что опухолевый антиген связан с раком, отобранным из группы, состоящей из острого миелогенного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, миелодиспластического синдрома, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфобластного лейкоза, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, злокачественной меланомы, рака молочной железы, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака (ПКР) и опухолей зародышевых клеток.
8. Вектор CMV по пп.1-7, отличающийся тем, что вектор CMV не экспрессирует активный белок UL82 (pp71) или его гомолог.
9. Вектор CMV по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что вектор CMV не экспрессирует активный белок US11 или его гомолог.
10. Вектор CMV по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что вектор CMV не экспрессирует активный белок UL82 (pp71) или активный белок US11 или их гомологи.
11. Вектор CMV по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что вектор CMV является вектором CMV человека (HCMV), вектором CMV (CyCMV) цинамолгуса или вектором CMV (RhCMV) резусов.
12. Способ генерирования иммунного ответа у субъекта по меньшей мере на один гетерологичный антиген, включающий введение субъекту вектора CMV или HCMV по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для индукции ответа CD8⁺ Т-клеток по меньшей мере на один гетерологичный антиген.
13. Способ генерирования CD8⁺ Т-клеток, которые распознают МНС-Е-пептидные комплексы, включающий:
 - (1) введение субъекту вектора CMV или HCMV по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для генерирования набора CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е/пептид;
 - (2) идентификацию первого CD8⁺ ТCR из набора CD8⁺ Т-клеток, при этом первый CD8⁺ ТCR распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс;
 - (3) выделение одной или более CD8⁺ Т-клеток от указанного субъекта; а также

(4) трансфектирование одной или более CD8+ клеток вектором экспрессии, при котором вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ TCR, при этом второй CD8+ TCR включает CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, тем самым генерируя одну или более трансфектированных CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс.

14. Способ генерирования CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е-пептид, причем способ включает:

(1) введение первому субъекту вектора CMV по любому из пп.1-11 в количестве, эффективном для генерирования набора CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы МНС-Е/пептид;

(2) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, отличающуюся тем, что первый CD8+ TCR распознает МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс;

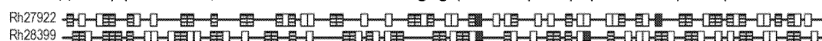
(3) выделение одной или более CD8+ Т-клеток от второго субъекта; а также

(4) трансфектирование одной или более CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при котором вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ TCR, при этом второй CD8+ TCR включает CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, тем самым генерируя одну или более трансфектированных CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е/гетерологичный антиген-производный пептидный комплекс.

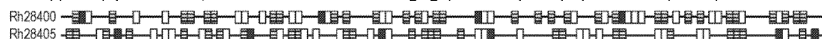
68-1 RhCMV/gag (RhI57.5/4-делецированный) вектор:



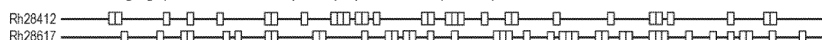
UL128 делецированный; штамм 68-1.2 RhCMV/gag (UL 130 репарированный) вакцинный:



UL130 делецированный; штамм 68-1.2 RhCMV/gag (UL 128 репарированный) вакцинный:



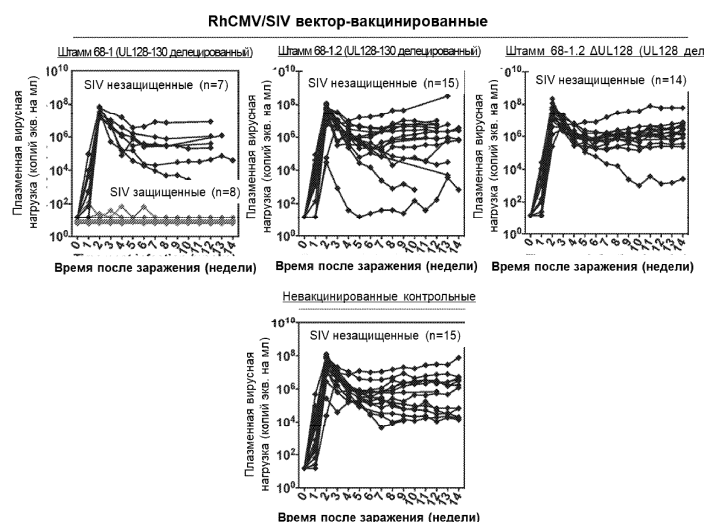
68-1.2 RhCMV/gag (UL128/UL130 репарированный) вакцинный:



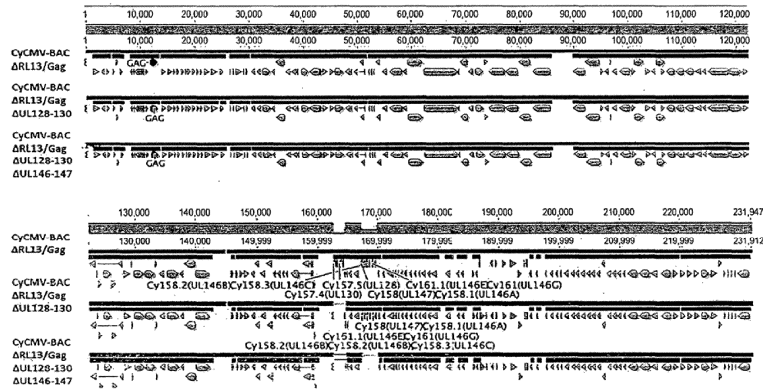
□ МНС- Ia - рестриктированные
 ■ МНС- E - рестриктированные
 ▨ МНС- II - рестриктированные
 ■ Неопределенные

Последовательные SIVmac₂₃₉gag 15-мерные (11 а.к.)

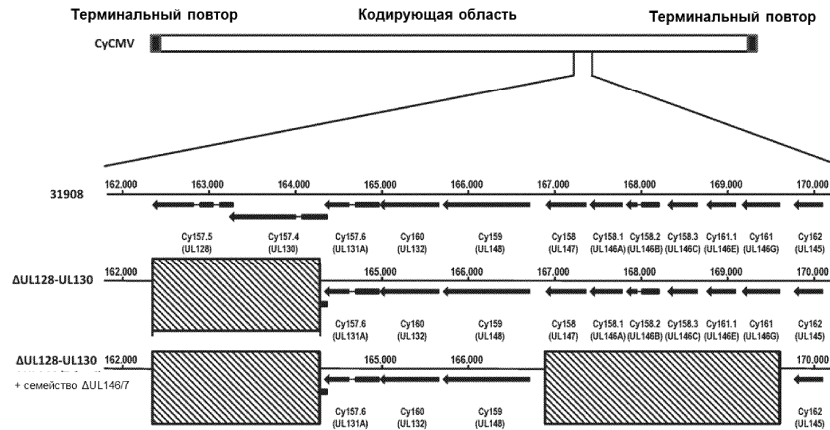
Фиг. 1



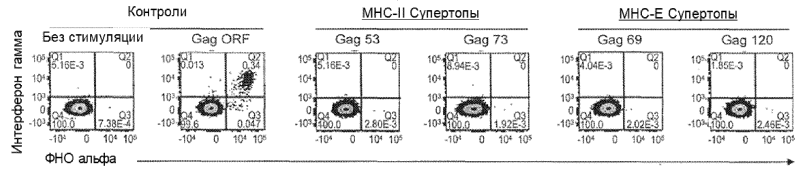
Фиг. 2



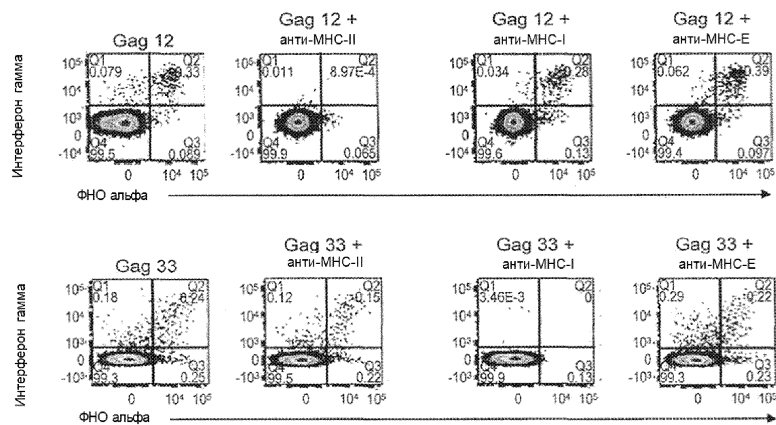
Фиг. 3



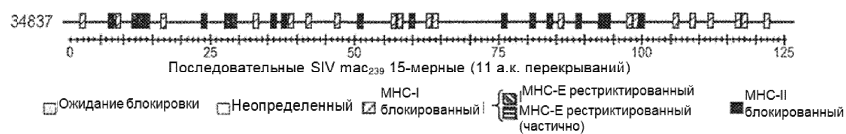
Фиг. 4



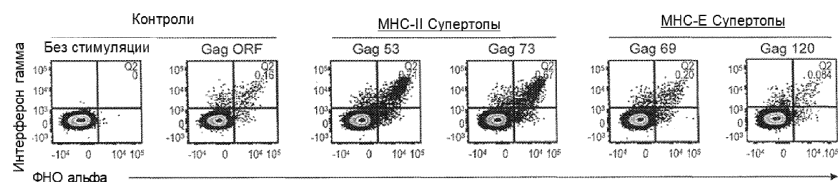
Фиг. 5A



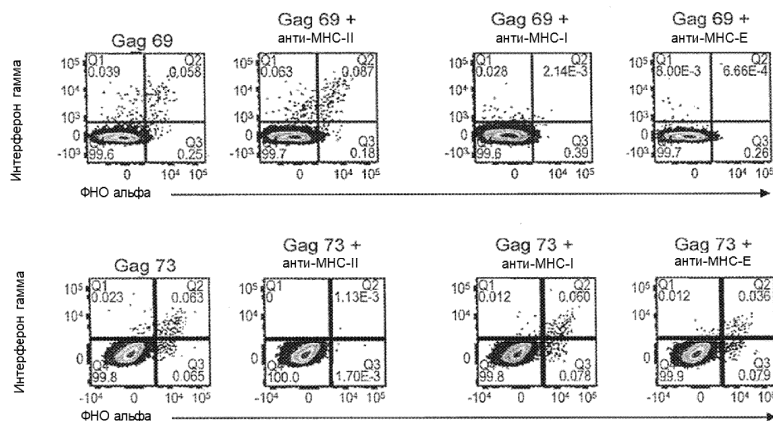
Фиг. 5B



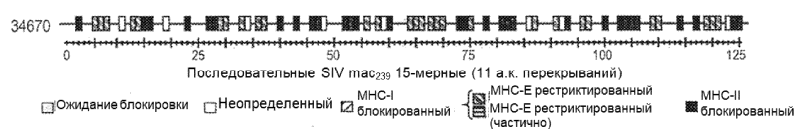
Фиг. 5C



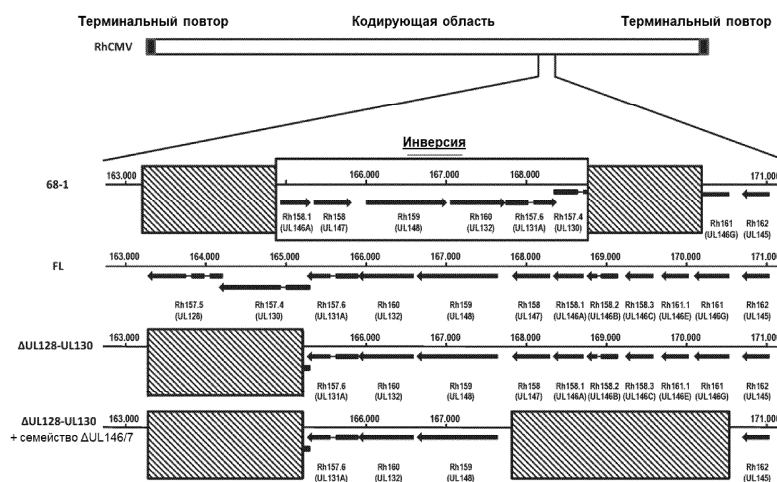
Фиг. 6А



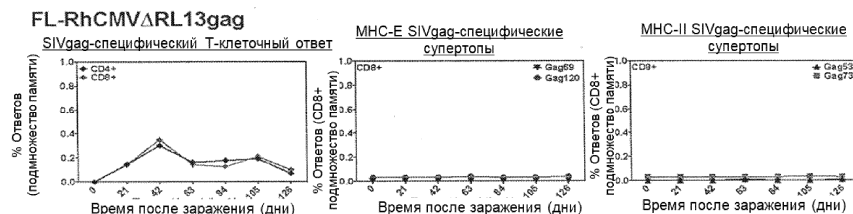
Фиг. 6В



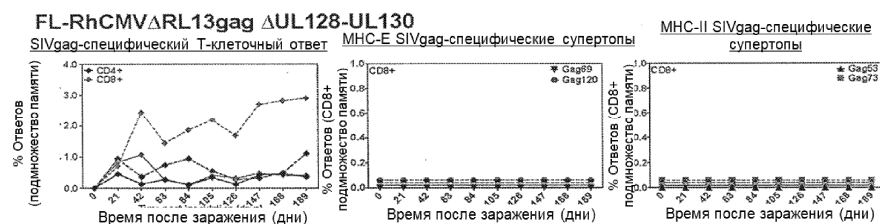
Фиг. 6С



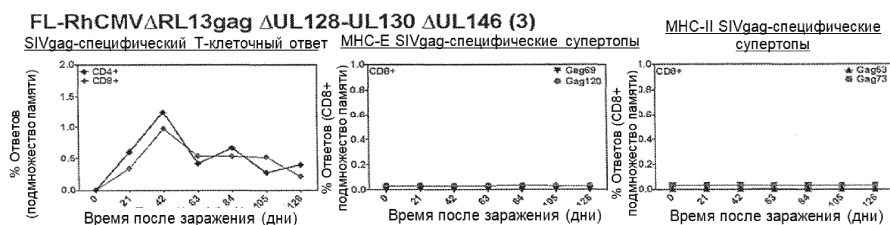
Фиг. 7



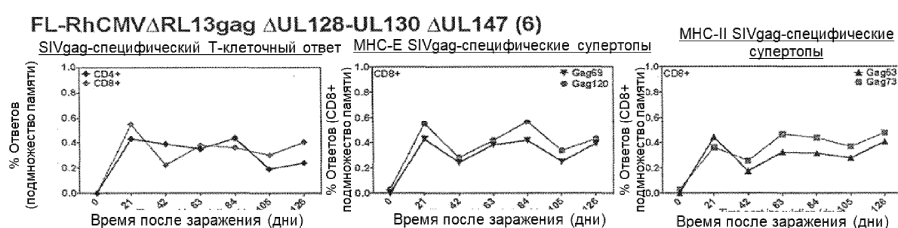
Фиг. 8А



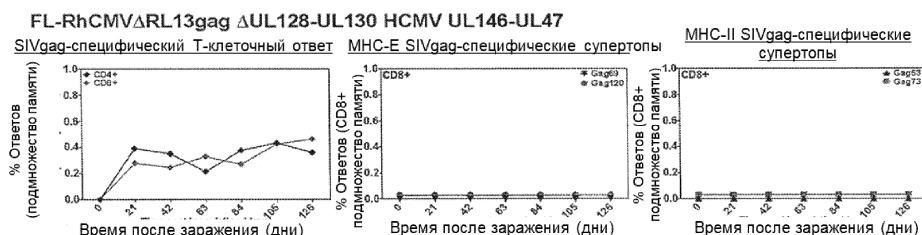
Фиг. 8В



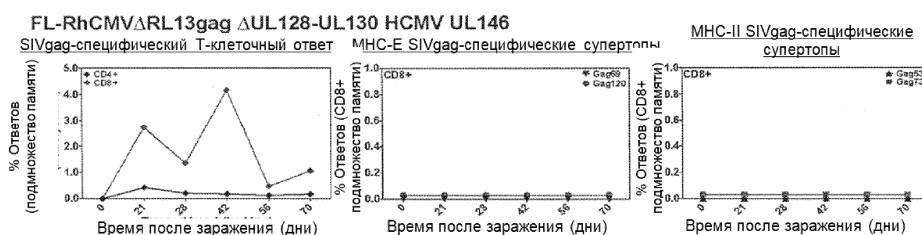
Фиг. 8С



Фиг. 8D



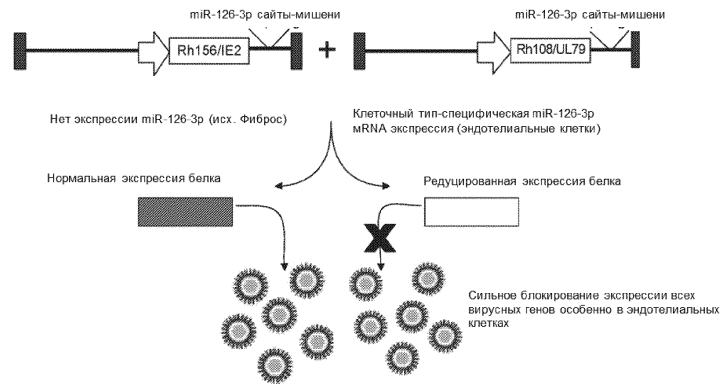
Фиг. 9А



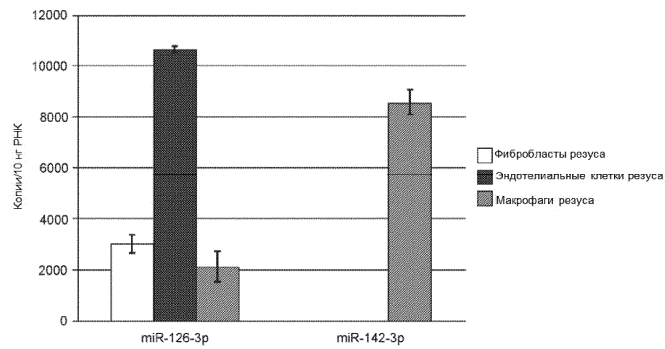
Фиг. 9В



Фиг. 9С

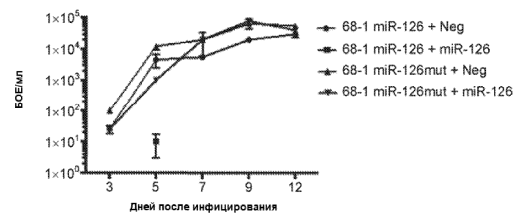


Фиг. 10

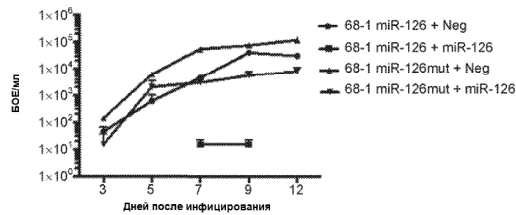


Фиг. 11

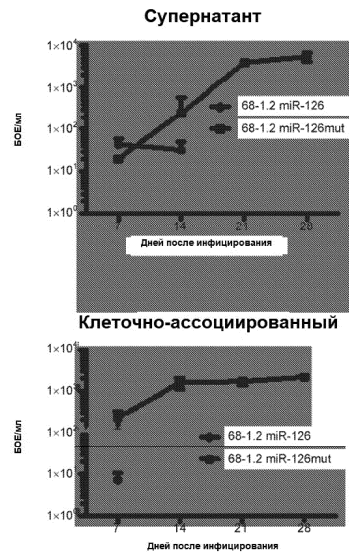
Супернатант



Клеточно-ассоциированный

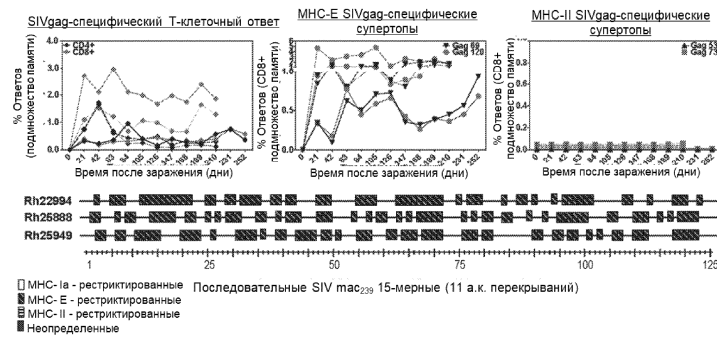


Фиг. 12



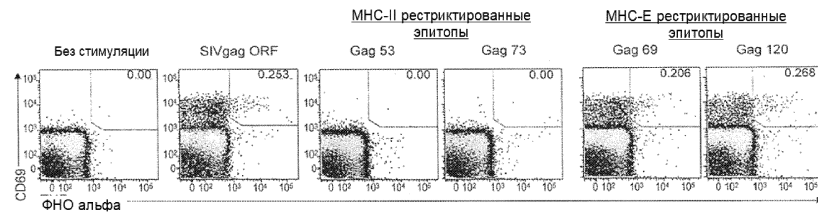
Фиг. 13

Штамм 68-1 RhCMV-Rh156, 108 miR126/gag вектор-вакцинированные макаки:

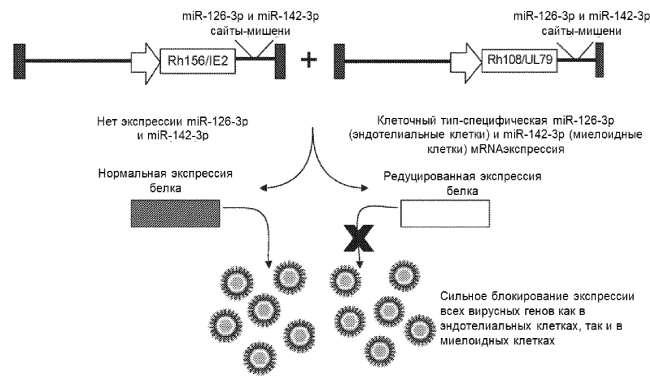


Фиг. 14

Штамм 68-1 RhCMV-Rh156, 108 miR 126/SIVgag вектор-вакцинированные макаки:

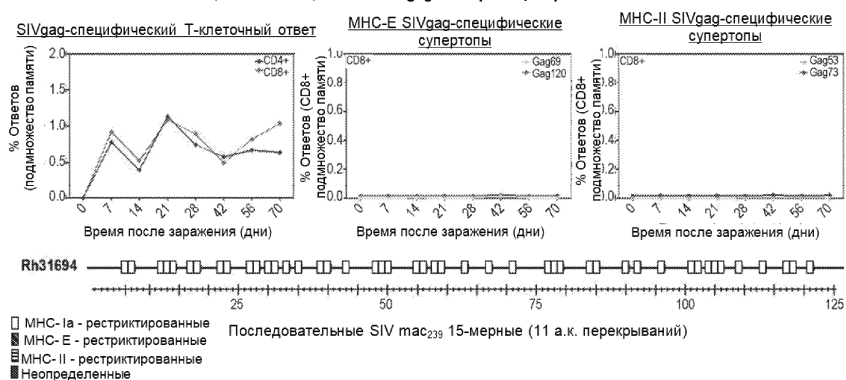


Фиг. 15



Фиг. 16

Штамм 68-1 RhCMV-Rh156, 108 miR 142, miR 126/SIVgag вектор-вакцинированные макаки:



Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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