

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046730**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.17
- (21) Номер заявки
202290595
- (22) Дата подачи заявки
2020.08.19
- (51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(54) **МОДУЛЯЦИЯ Т-КЛЕТОЧНЫХ ОТВЕТОВ ПОСРЕДСТВОМ UL18
ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА**

- (31) **62/889,310**
- (32) **2019.08.20**
- (33) **US**
- (43) **2022.05.20**
- (86) **PCT/US2020/047050**
- (87) **WO 2021/034964 2021.02.25**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОРЕГОН ХЕЛС ЭНД САЙЕНС
ЮНИВЕРСИТИ (US)**
- (72) Изобретатель:
**Фрю Клаус Дж., Хансен Скотт Г.,
Мэлоули Дэниэл, Пикер Луис Дж. (US)**
- (74) Представитель:
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Алексеев В.В., Галухина Д.В. (RU)**
- (56) BROWNE et al., Construction and characterization of a human cytomegalovirus mutant with the UL18 (class I homolog) gene deleted. JOURNAL OF VIROLOGY, Nov. 1992, Vol. 66, No. 11, p 6784-6787. Abstract
US-A1-20170292127
US-A1-20180298404

-
- (57) Настоящее изобретение относится к способам модулирования Т-клеточных ответов посредством UL18 цитомегаловируса человека. Настоящее изобретение также относится к способам получения рестриктивных по МНС-Ia, МНС-II и/или МНС-E CD8+ Т-клеток.

B1

046730

**046730
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет перед предварительной заявкой на патент США №62/889310, поданной 20 августа 2019 года, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Заявление относительно финансируемых из федерального бюджета исследований и разработок

Настоящее изобретение было выполнено при государственной поддержке согласно грантам под номерами AI059457 и AI128741, присужденным Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний. Государство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

Содержание перечня последовательностей, поданных в электронном виде, в текстовом файле ASCII (имя 4153013PC01_Seqlisting_ST25; размер: 11029 байт; и дата создания: 19 августа 2020 года), который был подан вместе с настоящей заявкой, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Предпосылки изобретения

Ранее было продемонстрировано, что штамм 68-1 цитомегаловируса макака резус (RhCMV) стимулирует CD8+ Т-клетки, которые распознают пептиды, презентуемые МНС-II и МНС-E, вместо обычного МНС-I. Этот эффект был воспроизведен в CMV яванского макака (CyCMV), таким образом, демонстрируя, что делеция гомологов RhCMV и CyCMV HCMV UL128, UL130, UL146 и UL147 необходима для индукции рестриктированных по МНС-E CD8+ Т-клеток (WO 2016/130693, WO 2018/075591). Кроме того, эти векторы стимулируют рестриктированные по МНС-II CD8+ Т-клетки. Однако вставка целевого сайта для специфичной в отношении эндотелиальных клеток микроРНК (miR) 126 в основные вирусные гены этих векторов устраняет индукцию рестриктированных по МНС-II CD8+ Т-клеток, что приводит к получению векторов типа "только МНС-E", которые стимулируют исключительно рестриктированные по МНС-E CD8+ Т-клетки (WO 2018/075591). В отличие от этого, вставка miR142-3p, специфичной для миелоидных клеток, в RhCMV штамма 68-1 предупреждает индукцию рестриктированных по МНС-E CD8+ Т-клеток, что приводит к получению векторов, которые стимулируют CD8+ Т-клетки, исключительно рестриктированные по МНС-II (WO 2017/087921). Аналогичным образом, делеция гомолога UL40 Rh67 предупреждает индукцию рестриктированных по МНС-E CD8+ Т-клеток, что приводит к получению "векторов, содержащих только МНС-II" (WO 2016/130693).

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору на основе CMV человека (HCMV), содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген, при этом рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL130. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128 и UL130.

Настоящее изобретение также относится к вектору на основе HCMV, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген, при этом рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления MRE, экспрессируемый в эндотелиальных клетках, представляет собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в миелоид-

ных клетках. В некоторых вариантах осуществления MRE, экспрессируемый в миелоидных клетках, представляет собой miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 и miR-125.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген представляет собой патогенспецифический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или аутоантиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления патогенспецифический антиген выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

В некоторых вариантах осуществления патогенспецифический антиген представляет собой супертоп МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е представляет собой эпитоп HIV. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADDTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYS PVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRET KLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген относится к раку, выбранному из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, миелодиспластического синдрома, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфобластного лейкоза, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, злокачественной меланомы, рака молочной железы, рака легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака (RCC) и опухолей зародышевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из вариабельной области Т-клеточного рецептора (TCR), или антиген, полученный из вариабельной области В-клеточного рецептора.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный вектор на основе HCMV и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к иммуногенной композиции, содержащей рекомбинантный вектор на основе HCMV и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способу генерирования иммунного ответа у субъекта на по меньшей мере один гетерологичный антиген, включающему введение субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

Настоящее изобретение также относится к применению рекомбинантного вектора на основе HCMV в изготовлении лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору на основе HCMV для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предупреждения рака у субъекта, включающему введение рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для стимуляции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

Настоящее изобретение также относится к применению рекомбинантного вектора на основе HCMV в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения рака у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору на основе HCMV для применения в лечении или предупреждении рака у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предупреждения патогенной инфекции у субъекта, включающему введение субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

Настоящее изобретение также относится к применению рекомбинантного вектора на основе HCMV в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения патогенной инфекции у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору на основе HCMV для применения в лечении или предупреждении патогенной инфекции у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у субъекта, включающему введение субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

Настоящее изобретение также относится к применению рекомбинантного вектора на основе HCMV в изготовлении лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору на основе HCMV для применения в лечении аутоиммунного заболевания или нарушения у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС-Е или его ортологу. В некоторых вариантах осуществления 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 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС-Е или его ортологу.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС-П или его ортологу. В некоторых вариантах осуществления 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, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС-П или его ортологу.

В некоторых вариантах осуществления менее 10%, менее 20%, менее 30%, менее 40% или менее 50% CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС класса Ia или его ортологу. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС класса Ia или его ортологу. В некоторых вариантах осуществления 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 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, являются рестриктированными по МНС класса Ia или его ортологу.

В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR идентифицируют из CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным вектором на основе HCMV, при этом CD8+ TCR распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR идентифицируют из CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором на основе HCMV, при этом CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR идентифицируют из CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором на основе HCMV, при этом CD8+ TCR распознает полученный из МНС класса Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает супертопы МНС-II.

В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает супертопы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е представляет собой эпитоп вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен аминокислотной последовательности

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYS PVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRET KLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенных по TCR CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает: (а) введение первому субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е; (б) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (с) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (d) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18, UL128, UL130, UL146 и/или UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в эндотелиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в эндотелиальных клетках, представляет собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 или miR-328. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген представляет собой патогенспецифический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или аутоантиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления патогенспецифический антиген представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразиты Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенных по TCR CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV, при этом указанный первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (b) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько трансгенных по TCR CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18, UL128, UL130, UL146 и/или UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в эндотелиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в эндотелиальных клетках, представляет собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 или miR-328. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген представляет собой патогенспецифический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или аутоантиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления патогенспецифический антиген представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразиты Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

В некоторых вариантах осуществления первая CD8+ Т-клетка распознает супертопы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертопы МНС-Е представляют собой эпитопы вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен аминокислотной последовательности

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);

NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSVPSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDIYIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETCLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления вторая CD8+ Т-клетка распознает супертопы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертопы МНС-Е представляют собой эпитопы вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен аминокислотной последовательности

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSVPSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDIYIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETCLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления первую CD8+ TCR идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8+ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8+ TCR.

В некоторых вариантах осуществления первым субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления вторым субъектом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает: (а) введение отличному от человека примату рекомбинантного вектора на основе CMV макака резус (RhCMV) или CMV яванского макака (CyCMV), дефицитного по ортологам UL128, UL130, UL146 и UL147 и экспрессирующего антигены HIV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е в комплексе с пептидами супертопа HIV; (b) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает пептидный комплекс МНС-Е/супертоп; (c) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (d) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вторую CD8+ TCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ TCR, при этом второй CD8+ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления эпитоп HIV на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSVPSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDIYIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETCLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

Настоящее изобретение также относится к способу получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ TCR, который распознает пептидный комплекс МНС-Е/супертоп из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е в комплексе с пептидами супертопа HIV, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора макака резус (RhCMV) или CMV яванского макака (CyCCMV), дефицитного по ортологам UL128, UL130, UL146 и UL147, и экспрессию антигенов HIV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток; (b) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (c) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления эпитоп HIV на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSPVSI LDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSI L (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETKLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления первый субъект представляет собой отличного от человека примата, а второй субъект представляет собой человека, и при этом второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR отличного от человека примата и человека, содержащий CDR3 α и CDR3 β отличного от человека примата первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β отличного от человека примата первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR.

В некоторых вариантах осуществления введение рекомбинантного вектора на основе HCMV первому субъекту включает внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное или пероральное введение рекомбинантного вектора на основе HCMV первому субъекту.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для лечения или предупреждения рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран 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 легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака (RCC) и опухолей зародышевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для лечения или предупреждения патогенной инфекции. В некоторых вариантах осуществления патогенная инфекция вызвана патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для индуцирования аутоиммунного ответа на аутоантиген хозяина.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-II, при этом способ включает: (а) введение первому субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II; (б) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (с) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (д) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидный комплекс МНС-II. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128 и UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL146 и UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или не-

скольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MRE, при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в миелоидных клетках, представляет собой miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 или miR-125.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CD8⁺ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-II, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8⁺ ТCR, который распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс из набора CD8⁺ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом набор CD8⁺ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV; (b) выделение одной или нескольких CD8⁺ Т-клеток от второго субъекта; и (c) трансфекцию одной или нескольких CD8⁺ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8⁺ ТCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8⁺ ТCR, при этом второй CD8⁺ ТCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8⁺ ТCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8⁺ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128 и UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL146 и UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MRE, при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в миелоидных клетках, представляет собой miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 или miR-125.

В некоторых вариантах осуществления первая CD8⁺ Т-клетка распознает супертопы МНС-II. В некоторых вариантах осуществления вторая CD8⁺ Т-клетка распознает супертопы МНС-II.

В некоторых вариантах осуществления первую CD8⁺ ТCR идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8⁺ ТCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8⁺ ТCR.

В некоторых вариантах осуществления первым субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления вторым субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления введение вектора на основе HCMV первому субъекту включает внутривенное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное или пероральное введение вектора на основе

HCMV первому субъекту.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для лечения или предупреждения рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран 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 легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака (RCC) и опухолей зародышевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для лечения или предупреждения патогенной инфекции. В некоторых вариантах осуществления патогенная инфекция вызвана патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов *Plasmodium* и *Mycobacterium tuberculosis*.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для индуцирования аутоиммунного ответа на аутоантиген хозяина.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-I, при этом способ включает: (а) введение первому субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I; (б) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-I/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (с) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (д) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидный комплекс МНС-I. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128 и UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL146 и UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог.

Настоящее изобретение также относится к способу получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-I, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ TCR, который распознает полученный из МНС-I/гетерологичного антигена пептидный комплекс из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают полученные из МНС-I/гетерологичного антигена пептидные комплексы, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV; (б) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I.

В некоторых вариантах осуществления первую CD8+ TCR идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8+ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8+ TCR.

В некоторых вариантах осуществления первым субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления вторым субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для лечения или предупреждения рака. В некоторых вариантах осуществления рак выбран 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 легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака (RCC) и опухолей зародышевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для лечения или предупреждения патогенной инфекции. В некоторых вариантах осуществления патогенная инфекция вызвана патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

В некоторых вариантах осуществления трансфицированные CD8+ Т-клетки вводят второму субъекту для индуцирования аутоиммунного ответа на аутоантиген хозяина.

В некоторых вариантах осуществления патогенспецифический антиген выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека, вируса иммунодефицита обезьяны, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген относится к раку, выбранному 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 легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, почечно-клеточного рака (RCC) и опухолей зародышевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из вариабельной области Т-клеточного рецептора (TCR), или антиген, полученный из вариабельной области В-клеточного рецептора.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предупреждения патогенной инфекции у субъекта, включающему введение субъекту CD8+ Т-клетки.

Настоящее изобретение также относится к применению CD8+ Т-клеток в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики патогенной инфекции у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к CD8+ Т-клеткам для применения в лечении или предупреждении патогенной инфекции у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или предупреждения рака у субъекта, включающему введение субъекту CD8+ Т-клетки.

Настоящее изобретение также относится к применению CD8+ Т-клетки в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения рака у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к CD8+ Т-клетке для применения в лечении или предупреждении рака у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включающему введение субъекту CD8+ Т-клетки.

Настоящее изобретение также относится к применению CD8+ Т-клеток в изготовлении лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения.

Настоящее изобретение также относится к CD8+ Т-клеткам для применения в лечении аутоиммунного заболевания или нарушения.

Настоящее изобретение также относится к способу индукции аутоиммунного ответа на аутоантиген хозяина, при этом способ включает введение субъекту CD8+ Т-клетки.

Настоящее изобретение также относится к супертопу МНС-Е вируса иммунодефицита человека длиной от 9 до 15 аминокислот, который на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен аминокислотной последовательности

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEIQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEIQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSPVSI LDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSI L (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRET KLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EEHEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько антигенов вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128 и UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL146 и UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в эндотелиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в эндотелиальных клетках, представляет собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 или miR-328. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MRE, при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в миелоидных клетках, представляет собой miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 или miR-125.

Краткое описание графических материалов/фигур

На фиг. 1 изображены средние частоты CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток, отвечающих за полученные из антигена SIV пулы пептидов в указанных когортах. Частоты Т-клеток определяли в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) в указанные временные точки посредством окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) в отношении IFN γ или TNF α в присутствии пулов перекрывающихся (по 11А) 15-мерных пептидов, представляющих антигены SIV. Когорту 1 иммунизировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1 типа "только МНС-Е", несущими сайты распознавания для miR126 в 3'-нетранслируемой области основных генов Rh108 (UL79) и Rh156 (IE2) и экспрессирующими антигены SIV SIVgag, SIVretanef (слитый продукт *rev*, *tat* и *nef*) или 5'-сегмент SIVpol. Когорту 2 иммунизировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1 типа "только МНС-II" с делецией Rh67 (UL40) и экспрессирующими антигены SIV SIVgag, SIVretanef или 5'-сегмент SIVpol. Когорту 3 иммунизировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1 типа "только МНС-II", несущими сайты распознавания для miR142 в 3'-нетранслируемой области основных генов Rh108 (UL79) и Rh156 (IE2) и экспрессирующими антигены SIV SIVgag, SIVretanef или 5'-сегмент SIVpol. Когорту 4 (контрольную когорту) иммунизировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1, экспрессирующими антигены SIV SIVgag, SIVretanef или 5'-сегмент SIVpol.

На фиг. 2 изображены специфические в отношении SIVgag CD8⁺ Т-клеточные ответы в PBMC, полученных от трех макаков резус (RM) в каждой из указанных когорт, измеряемые в присутствии отдельных пептидов. Пептиды, приводящие к специфическим CD8⁺ Т-клеточным ответам, указаны прямоугольником, при этом цвет прямоугольника обозначает рестрикцию по МНС, определяемую посредством блокирования mAb ко всем МНС-I W6/32, блокирующим МНС-Е пептидом VL9 и блокирующим МНС-II пептидом CLIP.

На фиг. 3 изображена вирусная нагрузка в плазме крови после воздействия на RM повторной лимитирующей дозы SIVmac239 в когортах 1, 2 и 3 (левая панель) и специфические в отношении SIVvif CD8⁺ Т-клеточные ответы RM в когортах 1, 2 и 3 (правая панель). Животные, которые контролировали инфекцию SIV (RM-контроллеры) изображены в прямоугольниках белого цвета, а неконтроллеры изображены в прямоугольниках черного цвета. Одно животное в когорте 2 изначально контролировало инфекцию SIV, однако контроль был утрачен при деплеции CD8⁺ Т-клеток, что указывало на то, что этот RM представлял собой спонтанного элитного контроллера.

На фиг. 4 изображен иммуноблот слитой конструкции на основе супертопа SIV. Теломеризованные фибробласты макака резус (TRF) были инфицированными или неинфицированными, при этом указанные конструкции RhCMV и лизаты инфицированных клеток были электрофоретически отделены до иммуноблоттинга. Слитый белок, содержащий супертоп SIV, визуализировали антителом к HA, при этом ви-

русный белок IE1, Rh107 и Rh108 обнаруживали с применением специфических антител. Полоса белка, наблюдаемая в инфицированных имитационным контролем или неинфицированных лизатах TRF посредством антител к IE, является неспецифической.

На фиг. 5А изображены средние частоты CD8⁺ Т-клеток, отвечающих на пептиды, полученные из антигена SIV, в PBMC животных когорты 5 (n=8). Когорту 5 иммунизировали вектором на основе RhCMV штамма 68-1, несущим сайты распознавания для mir126 в 3'-нетранслируемой области основных генов Rh108 (UL79) и Rh156 (IE2) и экспрессирующим слитый белок на основе супертопа MHC-E. Частоты Т-клеток определяли в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) в указанные временные точки посредством окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) в отношении IFN γ или TNF α в присутствии пулов отдельных 15-мерных пептидов, представляющих супертопы SIV. На фиг. 5В изображены частоты CD8⁺ Т-клеток, отвечающих на специфические рестриктированные по MHC-E супертопы у отдельного RM. Изображены рестриктированные по MHC-E супертопы (Gag69 и Gag120) и другие рестриктированные по MHC-E эпитопы Gag.

На фиг. 6 изображена вирусная нагрузка SIV в плазме крови после воздействия на RM повторной лимитирующей дозы SIVmac239 в когорте 5 (левая панель) и специфические в отношении SIVvif Т-клеточные ответы (правая панель). RM-контроллеры изображены в прямоугольниках белого цвета, а неконтроллеры изображены в прямоугольниках черного цвета. Специфические в отношении SIVvif ответы демонстрируют "захват" инфекции SIV у животных-контроллеров.

На фиг. 7А изображены частоты CD8⁺ Т-клеток, отвечающих на пептидные пулы антигена SIV у RM, инокулированного RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим SIVgag (n=2), RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим UL18 и SIVretanef (n=2), или 68-1 RhCMV, экспрессирующим UL18 и SIVpol (n=2). На фиг. 7В изображены частоты CD8⁺ Т-клеток, отвечающих на рестриктированные по MHC-E супертопы у каждого RM. На фиг. 7С изображены частоты CD8⁺ Т-клеток, отвечающих на рестриктированные по MHC-II супертопы у каждого RM.

На фиг. 8 изображены специфические в отношении SIVpol CD8⁺ Т-клеточные ответы в PBMC, полученных от трех RM, инокулированных RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим UL18 и SIVpol. CD8⁺ Т-клеточные ответы измеряли в присутствии отдельных пептидов. Пептиды, приводящие к специфическим CD8⁺ Т-клеточным ответам, указаны прямоугольником, при этом цвет прямоугольника обозначает рестрикцию по MHC, определяемую посредством блокирования mAb ко всем MHC-I W6/32, блокирующим MHC-E пептидом VL9 и блокирующим MHC-II пептидом CLIP. Все ответы пептидов блокировали W6/32, но не пептидом VL9 или пептидом CLIP. Таким образом, CD8⁺ Т-клетки являются исключительно рестриктированными по MHC-I.

На фиг. 9А изображена точечная диаграмма, изображающая частоты CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ или TNF α в ответ на пептиды SIVpol от RM, инокулированного RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим UL18 и SIVpol. На фиг. 9В изображена точечная диаграмма, изображающая частоты CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ или TNF α в ответ на пептиды SIVpol от RM, инокулированного RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим мутант UL18 D196S и SIVpol. Изображены частоты CD8⁺ Т-клеток, отвечающих на пулы перекрывающихся 15-мерных пептидов, содержащих SIVpol или рестриктированный по MHC-E пептид супертопа SIVpol41 или рестриктированный по MHC-II пептид супертопа SIVpol90. В то время как интактный UL18 предупреждает индукцию ответов супертопа, это не наблюдается для мутанта D196S UL18.

На фиг. 10 изображен иммуноблот фибробластов MRC5 человека, неинфицированных и инфицированных HCMV-TR3 (Carpasio P. et al. 2019. Characterization of a live-attenuated HCMV-based vaccine platform. *Sci Rep* 9:19236), или векторами на основе HCMV-TR3, в которых UL18 замещали слитым белком на основе HIVgag, HIVnef и HIVpol. Кроме того, вектор с делецией UL18, не содержал UL128, UL130, UL146 и UL147, поскольку предшествующее исследование продемонстрировало, что эти гены ингибируют ответы рестриктированных по MHC-E CD8⁺ Т-клеток (патент США № 10532099). Кроме того, фрагмент p24 HIVgag добавляли для контроля. Верхний блот зондировали антителами к белку HIVgag. Нижний блот зондировали антителами к белку HCMV pp65.

На фиг. 11 изображены специфические в отношении HIV gag, nef и pol CD8⁺ Т-клеточные ответы в PBMC, полученных от RM, инокулированного вектором с делецией UL18 (Фиг. 11, n=2). CD8⁺ Т-клеточные ответы измеряли в день 56 после вакцинации с применением перекрывающихся пептидных пулов, соответствующих каждой части антигена.

Подробное описание сущности изобретения

I. Термины.

Если не указано иное, технические термины используются в соответствии со стандартным применением.

Все публикации, патенты, заявки на выдачу патента, интернет-сайты и номера доступа/последовательности в базах данных, включающие в себя как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности, цитируемые или приведенные в спецификации к заявке, в том числе предварительной заявке на патент США № 62/889310, поданной 20 августа 2019 года, включены в данный документ в

полном объеме для всех целей в той же самой степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на выдачу патента, интернет-сайт и номер доступа/последовательность в базах данных были особо и отдельно указаны с целью такого включения посредством ссылки.

Несмотря на то, что способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам или материалам, описанным в данном документе, могут быть применимы при практическом осуществлении или исследовании настоящего раскрытия, подходящие способы и материалы описаны ниже. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие. Для облегчения описания различных вариантов осуществления настоящего изобретения предусмотрены следующие объяснения конкретных терминов.

Если контекст не требует иного, в настоящем описании и формуле изобретения слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", подразумевают открытый, инклюзивный смысл, то есть, "в том числе без ограничения". Термин "состоящий из" будет означать исключение более чем следовых элементов других ингредиентов и значительных стадий способов, раскрываемых в данном документе. Термин "состоящий по сути из" ограничивает объем пункта формулы изобретения обозначенными материалами или стадиями, или таковыми, которые не оказывают значительного влияния на основные характеристики заявляемого изобретения. Например, композиция, состоящая по сути из элементов, как определено в данном документе, не исключает следовых примесей из способа выделения и очистки и фармацевтически приемлемых носителей, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, консерванты и т.п. Аналогичным образом, белок состоит по сути из определенной аминокислотной последовательности, когда белок содержит дополнительные аминокислоты, которые составляют по большей мере 20% длины белка и не оказывают значительного влияния на активность белка (например, изменяют активность белка на не более 50%). Варианты осуществления, определяемые каждым из этих переходных терминов, находятся в объеме настоящего изобретения.

Антиген: Как используется в данном документе, термины "антиген" или "иммуноген" используются взаимозаменяемо для обозначения вещества, в типичном случае 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 посредством введения субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, который кодирует белок) белок способен вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа, направленный против этого белка.

Антигенспецифическая Т-клетка: CD8 или CD4 лимфоцит, который распознает определенный антиген. Как правило, антигенспецифические Т-клетки специфически связываются с определенным антигеном, презентуемым молекулами МНС, но не с другими антигенами, презентуемыми тем же МНС.

Введение: Как используется в данном документе, термин "введение" означает предоставление или передачу субъекту средства, такого как композиция, содержащая эффективное количество вектора на основе CMV, содержащего экзогенный антиген, любым эффективным путем. Иллюстративные пути введения включают без ограничения инъекционные (такие как подкожные, внутримышечные, интрадермальные, интраперитонеальные и внутривенные), пероральные, сублингвальные, ректальные, трансдермальные, интраназальные, вагинальные и ингаляционные пути.

Эффективное количество: Как используется в данном документе, термин "эффективное количество" относится к количеству средства, такого как вектор на основе CMV, содержащий гетерологичный антиген, или трансфицированная CD8+ Т-клетка, которая распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс, полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс или полученный из МНС-I/гетерологичного антигена пептидный комплекс, которое является достаточным для генерации требуемого ответа, такого как ослабление или устранение признака или симптома состояния или заболевания, или индукции иммунного ответа на антиген. В некоторых примерах "эффективное количество" представляет собой количество, которое способствует лечению (в том числе профилактике) одного или нескольких симптомов и/или лежащих в их основе причин любого из нарушения или заболевания. Эффективное количество может представлять собой терапевтически эффективное количество, в том числе количество, которое предупреждает один или несколько признаков или симптомов определенного заболевания или состояния от развития, такого как один или несколько признаков или симптомов, ассоциированных с инфекционным заболеванием или раком.

Гетерологичный антиген: Как используется в данном документе, термин "гетерологичный антиген" относится к любому белку или его фрагменту, который не происходит из CMV. Гетерологичные антигены могут представлять собой патогенспецифические антигены, опухолевые вирусные антигены, опухолевые антигены, аутоантигены хозяина или любой другой антиген.

Гиперпролиферативное заболевание: Заболевание или нарушение, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией клеток. Гиперпролиферативные заболевания включают без ограничения злокачественные и незлокачественные опухоли.

Иммунологическая толерантность: Как используется в данном документе, термин "иммунологическая толерантность" относится к состоянию невосприимчивости иммунной системы к веществам, которые способны индуцировать иммунный ответ. Ауто толерантность к собственным антигенам индивидуума, например, опухолевым антигенам, достигается посредством механизмов как центральной толерант-

ности, так и периферической толерантности.

Иммуногенный пептид: Пептид, который содержит аллель-специфический мотив или другую последовательность, такую как N-концевой повтор, таким образом, что пептид будет связываться с молекулой МНС и индуцировать ответ цитотоксического Т-лимфоцита ("CTL"), или ответ В-клетки (например, продуцирование антител) против антигена, из которого иммуногенный пептид получен.

В некоторых вариантах осуществления иммуногенные пептиды идентифицируют с применением мотивов последовательности или других способов, таких как нейронная сеть или полиномиальные определения, известные из уровня техники. В типичном случае алгоритмы используются для определения "порога связывания" пептидов для выбора таковых из них, оценки которых дают им высокую вероятность связывания при определенной аффинности и будут иммуногенными. Алгоритмы основаны либо на эффектах в отношении связывания МНС определенной аминокислоты в определенном положении, на эффектах в отношении связывания антителом определенной аминокислоты в определенном положении, либо на эффектах в отношении связывания антителом определенной замены в содержащем мотив пептиде. В контексте иммуногенного пептида "консервативный остаток" представляет собой остаток, который появляется со значительно большей частотой, чем можно было бы ожидать при случайном распределении в определенном положении в пептиде. В некоторых вариантах осуществления консервативным остатком является остаток, в котором структура МНС может обеспечивать точку контакта с иммуногенным пептидом.

МикроРНК: Как используется в данном документе, термин "микроРНК" относится к основному классу биомолекул, участвующих в контроле экспрессии генов. Например, в сердце, печени или головном мозге человека miRNA играют роль в выборах касательно определения ткани или клеточной дифференцировки, кроме того, miRNA оказывают влияние на множество процессов, в том числе раннее развитие, пролиферацию клеток и клеточную смерть, а также апоптоз и метаболизм жиров. Большое количество генов miRNA, разнообразные паттерны экспрессии и множество потенциальных мишеней miRNA позволяют предположить, что miRNA могут представлять собой значительный источник генетического разнообразия.

Зрелая miRNA в типичном случае представляет собой некодирующую РНК из 8-25 нуклеотидов, которая регулирует экспрессию mRNA, в том числе последовательности, комплементарные mRNA. Известно, что эти малые молекулы РНК контролируют экспрессию генов посредством регуляции стабильности и/или трансляции mRNA. Например, miRNA связываются с 3'UTR целевых mRNA и подавляют трансляцию. MiRNA могут также связываться с целевыми mRNA и опосредовать сайленсинг генов посредством пути RNAi. MiRNA могут также регулировать экспрессию генов посредством конденсации хроматина.

MiRNA подавляет трансляцию одной или нескольких специфических молекул mRNA посредством связывания с элементом распознавания miRNA (MRE), который определяется как любая последовательность, которая непосредственно спаривается с miRNA и взаимодействует с ней примерно в транскрипте mRNA. Часто MRE присутствует в 3'-нетранслируемой области (UTR) mRNA, но также может присутствовать в кодирующей последовательности или в 5'-UTR. MRE необязательно идеально дополняют miRNA, обычно содержат только несколько оснований комплементарности miRNA и часто содержат одно или несколько ошибочных спариваний в пределах этих оснований комплементарности. MRE может представлять собой любую последовательность, способную связываться с miRNA в достаточной степени, чтобы трансляция гена, с которым функционально связана MRE (например, гена CMV, который является важным или усиливающим рост *in vivo*), подавлялась посредством механизма сайленсинга miRNA, такого как RISC.

Мутация: Как используется в данном документе, термин "мутация" относится к любому отличию в последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида от нормальной, консенсусной последовательности или последовательности "дикого типа". Мутант представляет собой любой белок или последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую мутацию. Кроме того, клетка или организм с мутацией также может обозначаться мутантом. Некоторые типы мутаций кодирующей последовательности включают точечные мутации (различия в отдельных нуклеотидах или аминокислотах); сайленсинговые мутации (различия в нуклеотидах, которые не приводят к изменению аминокислоты); делеции (различия, при которых отсутствует один или несколько нуклеотидов или аминокислот, вплоть до делеции всей кодирующей последовательности гена включительно); мутации со сдвигом рамки считывания (различия, при которых делеция ряда нуклеотидов, неделимых на 3, приводит к изменению аминокислотной последовательности). Мутация, которая приводит к изменению аминокислоты, также может быть названа мутацией по типу аминокислотной замены. Мутации по типу аминокислотной замены могут быть описаны посредством изменения аминокислоты относительно дикого типа в определенном положении в аминокислотной последовательности.

Нуклеотидные последовательности или последовательности нуклеиновых кислот: Термины "нуклеотидные последовательности" и "последовательности нуклеиновых кислот" относятся к последовательностям дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК), в том числе без ограничения информационной РНК (mRNA), гибридам ДНК/РНК или синтетическим нуклеиновым

кислотам. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или частично или полностью двухцепочечной (дуплексной). Дуплексные нуклеиновые кислоты могут быть гомодуплексными или гетеродуплексными.

Функционально связанный: Поскольку в данном документе используется термин "функционально связанный", первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты расположена таким образом, что она оказывает влияние на вторую последовательность нуклеиновой кислоты. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть смежными или могут функционировать на расстоянии.

Промотор: Как используется в данном документе, термин "промотор" может относиться к любой из ряда контрольных последовательностей нуклеиновой кислоты, которая управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты. В типичном случае, промотор эукариот содержит необходимые последовательности нуклеиновых кислот возле сайта инициации транскрипции, такие как, в случае промотора типа полимераза II, элемент ТАТА или любую другую специфическую последовательность ДНК, которая распознается одним или несколькими факторами транскрипции. Экспрессия промотором может быть дополнительно модулирована энхансерными или репрессорными элементами. Многочисленные примеры промоторов доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники. Нуклеиновая кислота, содержащая промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует определенный полипептид, может быть обозначена вектором экспрессии.

Рекомбинантный: Как используется в данном документе, термин "рекомбинантный" в отношении нуклеиновой кислоты или полипептида относится к нуклеиновой кислоте или полипептиду, который содержит последовательность, которая не встречается в природе, или содержит последовательность, которая создана посредством искусственной комбинации двух или более разделенных сегментов последовательности, например, вектор на основе CMV, содержащий гетерологичный антиген. Эта искусственная комбинация часто достигается посредством химического синтеза или, чаще, посредством искусственного манипулирования выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, посредством методик генной инженерии. Рекомбинантный полипептид может также относиться к полипептиду, который был создан с использованием рекомбинантных нуклеиновых кислот, в том числе рекомбинантных нуклеиновых кислот, перенесенных в организм-хозяин, который не является естественным источником полипептида (например, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, которые образуют вектор на основе CMV, содержащий гетерологичный антиген).

Фармацевтически приемлемые носители: Как используется в данном документе, применение термина "фармацевтически приемлемый носитель" является обычным. В Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition, 1995, описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки композиций, раскрытых в данном документе. Как правило, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (таких как порошки, пилюли, таблетки или капсулы) стандартные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты и pH-буферные средства и т.п., например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

Полинуклеотид: Как используется в данном документе, термин "полинуклеотид" относится к полимеру рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Полинуклеотид состоит из четырех оснований: аденина, цитозина, гуанина и тимина/урацила (урацил используется в РНК). Кодированная последовательность нуклеиновой кислоты указывает на последовательность белка, кодируемого нуклеиновой кислотой.

Полипептид: Термины "белок", "пептид", "полипептид" и "аминокислотная последовательность" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислотных остатков любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты или аналоги аминокислот и может быть прерван химическими фрагментами, отличными от аминокислот. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, в результате образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, таких как конъюгация с меченым или биоактивным компонентом.

Ортологи белков в типичном случае характеризуются наличием более чем 75% идентичности последовательности, подсчитанной при полном выравнивании с аминокислотной последовательностью конкретного белка с использованием параметров ALIGN, установленных по умолчанию. Белки с еще

большим сходством с референтной последовательностью будут демонстрировать возрастающий процент идентичности при оценке этим способом, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичность последовательности. Кроме того, идентичность последовательностей можно сравнивать по всей длине определенных доменов раскрытых пептидов.

Идентичность/сходство последовательностей: Как используется в данном документе, идентичность/сходство между двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот или двумя или более аминокислотными последовательностями выражается в терминах идентичности или сходства между последовательностями. Идентичность последовательности может быть измерена с точки зрения процента идентичности; чем выше процент, тем более идентичными являются последовательности. Сходство последовательностей может быть измерено с точки зрения процента идентичности или сходства (который учитывает консервативные аминокислотные замены); чем выше процент, тем более сходными являются последовательности. Полипептиды или их белковые домены, которые характеризуются значительной степенью идентичности последовательностей, 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) можно назвать "гомологами".

Способы выравнивания последовательностей для проведения сравнения хорошо известны из уровня 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, в Altschul et al, *J Mol Biol* 215, 403-410 (1990) представлено подробное рассмотрение способов выравнивания последовательностей и расчетов гомологии.

Инструмент NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al, (1990), выше) доступен из нескольких источников, в том числе Национального центра биологической информации (NCBI, Национальная медицинская библиотека, здание 38А, комната 8N805, Бетесда, Мэриленд, 20894) и в интернете для применения в связи с программами анализа последовательности blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx. Дополнительную информацию можно найти на веб-сайте NCBI.

BLASTN применяется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP применяется для сравнения последовательностей аминокислот. Если две сравниваемые последовательности характеризуются гомологией, то в указанном выходном файле эти области гомологии будут представлены в виде выровненных последовательностей. Если две сравниваемые последовательности не характеризуются гомологией, то в указанном выходном файле не будут представлены выровненные последовательности.

После выравнивания количество совпадений определяется путем подсчета количества положений, в которых в обеих последовательностях представлен идентичный нуклеотид или аминокислотный остаток. Процент идентичности последовательности определяется путем деления количества совпадений либо на длину последовательности, представленной в идентифицированной последовательности, либо на определенную длину (например, 100 последовательных нуклеотидов или аминокислотных остатков из последовательности, представленной в идентифицированной последовательности), с последующим умножением полученного значения на 100. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит 1166 совпадений при выравнивании с тестируемой последовательностью, содержащей 1554 нуклеотида, на 75,0% идентична тестируемой последовательности ($1166 \div 1554 * 100 = 75,0$). Процент значения идентичности последовательности округляется с точностью до одной десятой. 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 представлять собой целое число. В другом примере целевая последовательность, содержащая 20-нуклеотидный участок, который выравнивается с 20 последовательными нуклеотидами из идентифицированной последовательности, как указано ниже, содержит участок, который характеризуется 75-процентной идентичностью последовательности с этой идентифицированной последовательностью (т.е. $15 \div 20 * 100 = 75$).

Для сравнения аминокислотных последовательностей, содержащих более около 30 аминокислот, используется функция последовательностей Blast 2 с использованием матрицы BLOSUM62 по умолчанию, настроенной на параметры по умолчанию (штраф за открытие гэпа составляет 11 и штраф за остаток гэпа составляет 1).

Гомологи обычно характеризуются наличием по меньшей мере 70% идентичности последовательности, подсчитанной при полном выравнивании с аминокислотной последовательностью с использованием NCBI Basic Blast 2.0, gapped blastp с такими базами данных, как база данных nr, база данных swissprot и база данных запатентованных последовательностей. Запросы, найденные с помощью программы blastn, фильтруются с помощью DUST (Hancock & Armstrong, *Comput Appl Biosci* 10, 67-70 (1994.)) Другие программы используют SEG. Кроме того, можно выполнить ручное выравнивание. Белки с еще

большим сходством будут демонстрировать возрастающий процент идентичности при оценке этим способом, например, по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с белком.

При выравнивании коротких пептидов (менее приблизительно 30 аминокислот) выравнивание выполняется с использованием функции последовательностей Blast 2 с использованием матрицы PAM30, настроенной на параметры по умолчанию (штрафы за открытие гэпа 9, удлинение гэпа 1). Белки с еще большим сходством с референтной последовательностью будут демонстрировать возрастающий процент идентичности при оценке этим способом, например, по меньшей мере около 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с белком. Когда не вся последовательность сравнивается в отношении идентичности последовательности, гомологи, как правило, характеризуются по меньшей мере 75% идентичностью последовательности в коротких окнах из 10-20 аминокислот и могут характеризоваться идентичностью последовательности на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 98% в зависимости от их идентичности референтной последовательности. Способы определения идентичности последовательности в таких коротких окнах описаны на веб-сайте NCBI.

Одним из признаков того, что две молекулы нуклеиновых кислот являются близкородственными, является то, что эти две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях, как описано выше. Последовательности нуклеиновых кислот, которые не демонстрируют высокой степени идентичности, тем не менее могут кодировать идентичные или сходные (консервативные) аминокислотные последовательности в связи с вырожденностью генетического кода. Изменения в последовательности нуклеиновой кислоты могут быть выполнены с использованием этого вырождения для получения нескольких молекул нуклеиновой кислоты, которые все кодируют по сути один и тот же белок. Такие гомологичные последовательности нуклеиновых кислот могут, например, характеризоваться по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с нуклеиновой кислотой, которая кодирует белок.

Субъект: Как используется в данном документе, термин "субъект" относится к живым многоклеточным позвоночным организмам, категории, которая включает как человека, так и отличных от человека млекопитающих.

Супертоп: Как используется в данном документе, термин "супертоп" или "пептид супертопа" относится к эпитопу или пептиду, который распознается Т-клетками в более чем около 90% человеческой популяции, независимо от гаплотипа МНС, т.е. в присутствии или отсутствии данных аллелей МНС-I, МНС-II или МНС-E.

Лечение: Как используется в данном документе, термин "лечение" относится к вмешательству, которое нормализует признак или симптом заболевания или патологического состояния. Как используется в данном документе, термины "лечение", "лечить" и "осуществление лечения" в отношении заболевания, патологического состояния или симптома также относятся к любому наблюдаемому благоприятному эффекту лечения. Положительный эффект может проявляться, например, задержкой появления клинических симптомов заболевания у восприимчивого субъекта, снижением тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, более медленным прогрессированием заболевания, снижением числа рецидивов заболевания, улучшением общего состояния здоровья или самочувствия субъекта или другими параметрами, хорошо известными из уровня техники, которые специфичны для определенного заболевания. Профилактическое лечение представляет собой лечение, назначаемое субъекту, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, с целью снижения риска развития патологии. Терапевтическое лечение представляет собой лечение, проводимое субъекту после того, как развились признаки и симптомы заболевания.

Вакцина: Иммуногенная композиция, которую можно вводить млекопитающему, такому как человек, для придания иммунитета, такого как активный иммунитет, к заболеванию или другому патологическому состоянию. Вакцины могут использоваться профилактически или терапевтически. Таким образом, вакцины можно применять для снижения вероятности развития заболевания (например, опухоли или патологической инфекции) или для снижения тяжести симптомов заболевания или состояния, ограничения прогрессирования заболевания или состояния (например, опухоли или патологической инфекции) или ограничения рецидива заболевания или состояния (например, опухоли). В конкретных вариантах осуществления вакцина представляет собой CMV с дефицитом репликации, экспрессирующий гетерологичный антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, полученный из опухоли легкого, предстательной железы, яичника, молочной железы, толстой кишки, шейки матки, печени, почки, костной ткани или меланомы.

Вектор: Молекулы нуклеиновой кислоты определенной последовательности могут быть включены в вектор, который затем вводят в клетку-хозяина, за счет чего получают трансформированную клетку-хозяина. Вектор может включать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как точку начала репликации. Вектор может также содержать один или несколько селективных маркерных генов и другие генетические элементы, известные из уровня техники, в том числе промоторные элементы, которые направляют экспрессию нуклеиновой кислоты. Векторы могут представлять собой вирусные векторы, такие как векторы на основе CMV. Вирусные векторы

могут быть сконструированы из вируса дикого типа или аттенуированного вируса, в том числе вируса с дефицитом репликации.

II. Способы модуляции Т-клеточных ответов посредством UL18 HCMV.

В данном документе раскрыты способы модуляции Т-клеточных ответов посредством UL18 HCMV. Способы включают введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного рекомбинантного вектора на основе HCMV, содержащего по меньшей мере один гетерологичный антиген, при этом вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает создание иммунного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген, включающее введение субъекту вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лечение или предупреждение рака у субъекта, включающее введение вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лечение или предупреждение патогенной инфекции у субъекта, включающее введение вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лечение аутоиммунного заболевания или нарушения у субъекта, включающее введение субъекту вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

В некоторых вариантах осуществления дефицитный по UL18 вектор на основе HCMV также не экспрессирует белок UL128, UL130, UL146 или UL147 в связи с наличием мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL128, UL130, UL146 или UL147. Кроме того, любой из дефицитных по UL18 векторов на основе HCMV может характеризоваться дефицитным по белку US11 и/или UL82 в связи с наличием мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей US11 и/или UL82. Мутация может представлять собой любую мутацию, которая приводит к отсутствию экспрессии активных белков. Такие мутации могут включать точечные мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, делеции менее чем всей последовательности, кодирующей белок (мутаций по типу усечения), или делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, или любые другие мутации.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV не содержит UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147 и экспрессирует UL40 и US28.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE). В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV не содержит UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147 (и необязательно UL82) и экспрессирует UL40 и US28, а MRE содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках, представляют собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV не содержит UL18, а MRE содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках. Примерами таких микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках, являются miR-142-ep, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 и miR-125.

MRE может представлять собой любой элемент распознавания микроРНК, который подавляет экспрессию в присутствии miRNA, экспрессируемой эндотелиальными клетками. MRE может представлять собой любой элемент распознавания микроРНК, который подавляет экспрессию в присутствии miRNA, экспрессируемой миелоидными клетками. Такой MRE может представлять собой точный комплемент miRNA. В качестве альтернативы другие последовательности могут быть использованы в качестве MRE для определенной miRNA. Например, MRE можно прогнозировать по последовательностям. В одном примере miRNA можно найти на веб-сайте microRNA.org (www.microRNA.org). В свою очередь, будет указан список мишеней mRNA из miRNA. Для каждой мишени, указанной на странице, можно получить доступ к "деталям выравнивания" и получить доступ к предполагаемым MRE.

Специалист в данной области техники может выбрать из литературы подтвержденную, предполагаемую или мутированную последовательность MRE, которая, как предполагается, будет индуцировать сайленсинг в присутствии miRNA, экспрессируемой в миелоидной клетке, такой как макрофаг. Один из примеров включает упомянутый выше веб-сайт. Затем специалист в данной области техники может получить экспрессионную конструкцию, в которой экспрессия репортерного гена (такого как флуоресцентный белок, фермент или другой репортерный ген) управляется промотором, таким как конститутивно активный промотор или специфический для клетки промотор. Затем последовательность MRE может быть введена в экспрессионную конструкцию. Экспрессионная конструкция может быть трансфицирована в подходящую клетку, и клетка трансфицирована miRNA, представляющей интерес. Отсутствие экспрессии репортерного гена указывает на то, что MRE подавляет экспрессию гена в присутствии miRNA.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген может представлять собой патогенспецифический антиген, опухолевой антиген, опухолеспецифический антиген или аутоантиген хозяи-

на. В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина происходит из вариабельной области Т-клеточного рецептора (TCR) или антигена, происходящего из вариабельной области В-клеточного рецептора.

Патогенспецифический антиген может быть получен, например, из вируса иммунодефицита человека, вируса иммунодефицита обезьяны, вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов *Plasmodium*, *Clostridium tetani* и *Mycobacterium tuberculosis*.

Опухолевые антигены относительно ограничены опухолевыми клетками и могут представлять собой любой белок, который индуцирует иммунный ответ. Однако многие опухолевые антигены представляют собой белки хозяина (собственные) и, таким образом, обычно не воспринимаются иммунной системой хозяина в качестве антигенов. Опухолевые антигены также могут аномально экспрессироваться раковыми клетками. Опухолевые антигены также могут представлять собой антигены зародышевой линии/семенников, экспрессируемые в раковых клетках, антигены дифференцировки клеточной линии, не экспрессируемые в тканях взрослых, или антигенами, сверхэкспрессированными в раковых клетках. Опухолевые антигены включают без ограничения кислую фосфатазу предстательной железы (PAP); белок-супрессор опухоли Вильмса (WT1); мезотелин (MSLN); Her-2 (HER2); антиген Е6 папилломавируса человека штамма HPV16; антиген Е7 папилломавируса человека штамма HPV16; антиген Е6 папилломавируса человека штамма HPV18; антиген Е7 папилломавируса человека штамма HPV18; слитый белок папилломавируса человека Е6 и Е7 из HPV16 и HPV18; муцин 1 (MUC1); LMP2; рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); p53; белок пищевода 1 Нью-Йорк (NY-ESO-1); простат-специфический мембранный антиген (PSMA); GD2, карциноэмбриональный антиген (CEA); антиген меланомы А/антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками 1 (MelanA/MART1); Pac; gp100, протеиназу 3 (PR1), Vcr-abl; сурвивин; простат-специфический антиген (PSA); теломеразную обратную транскриптазу человека (hTERT); EphA2; ML-IAP; альфафетопротеин (AFP); EpCAM; ERG; NA17; PAX3; ALK; андрогеновый рецептор (AR); циклин B1; MYCN; RhoC; связанный с тирозином белок 2 (TRP-2); GD3; фукозил GM1; GM1; PSCA; sLe(a); CYP1B1; PLCA1; GM3; BORIS; Tn; GloboH; вариант гена Ets 6/ген острого миелоидного лейкоза 1 ETS (ETV6-AML); NY-BR-1; RGS5; антиген плоскоклеточного рака, отвергающий опухоль или белок 3 (SART3); STn; карбоангидразу IX; PAX5; OY-TES1; белок спермы 17; LCK; HMWMAA; AKAP-4; SSX2; B7H3; легумин; Tie 2; Page4; VEGFR2; MAD-CT-1; FAP; PDGFR; MAD-CT-2; связанный с Fos антиген 1; TAG-72; 9D7; EphA3; теломеразу; SAP-1; семейство BAGE; семейство CAGE; семейство GAGE; семейство MAGE; семейство SAGE; семейство XAGE; преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME); рецептор меланокортина 1 (MC1R); β -катенин; BRCA1/2; CDK4; белок хронического миелоидного лейкоза 66 (CML66); TGF- β . В определенных вариантах осуществления аутоантигены хозяина включают кислую фосфатазу предстательной железы, белок-супрессор опухоли Вильмса, мезотелин или Her-2.

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген происходит из злокачественной опухоли. Рак включает без ограничения острый лимфобластный лейкоз; острый миелоидный лейкоз; аденокарциномы; виды рака, связанные со СПИДом; лимфому, связанную со СПИДом; анальный рак; рак аппендикса; астроцитому, у детей, мозжечковую или головного мозга; базально-клеточную карциному; рак желчных протоков, внепеченочный; рак мочевого пузыря; рак кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому; глиому ствола головного мозга; опухоль головного мозга; опухоль головного мозга, мозжечковую астроцитому; опухоль головного мозга, церебральную астроцитому/злокачественную глиому; опухоль головного мозга, эпендимому; опухоль головного мозга, медуллобластому; опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли; опухоль головного мозга, зрительного пути и глиома гипоталамуса; рак молочной железы; бронхиальные аденомы/карциномы; лимфому Беркитта; карциноидную опухоль у детей; карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта; карциному неизвестного происхождения; лимфому центральной нервной системы, первичную; мозжечковую астроцитому у детей; церебральную астроцитому/злокачественную глиому у детей; рак шейки матки; онкологические заболевания у детей; хронический лимфолейкоз; хронический миелоидный лейкоз; хронические миелолиферативные нарушения; рак толстой кишки; кожную Т-клеточную лимфому; десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль; рак эндометрия; эпендимому; рак пищевода; саркому Юинга в семействе опухолей Юинга; экстракраниальную герминогенную опухоль у детей; внегонадную герминогенную опухоль; рак внепеченочных желчных протоков; рак глаза, внутриглазную меланому; рак глаза, ретинобластому; рак желчного пузыря; рак желудка; желудочно-кишечную карциноидную опухоль; желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST); опухоль зародышевых клеток: экстракраниальную, экстрагонадную или яичниковую; гестационную трофобластическую опухоль; глиому ствола головного мозга; глиому, церебральную астроцитому у детей; глиому, зрительного пути и гипоталамуса у детей; карциноид желудка; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; рак сердца; гепатоцеллюлярный рак (печени); лимфому Ходжкина; гипофарингеальный рак; глиому гипоталамуса и зрительного пути у детей; внутриглазную меланому; карциному островковых клеток (эндокринную, поджелудочной железы); саркому Капоши; рак почки

(почечно-клеточный рак); рак гортани; лейкозы; лейкоз, острый лимфобластный (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом); лейкоз, острый миелоидный (также называемый острым миелоидным лейкозом); лейкоз, хронический лимфоцитарный (также называемый хроническим лимфоцитарным лейкозом); лейкоз, хронический миелоидный (также называемый хроническим миелоидным лейкозом); лейкоз, волосатоклеточный; рак губы и полости рта; рак печени (первичный); рак легкого, немелкоклеточный; рак легкого, мелкоклеточный; лимфомы; лимфому, связанную со СПИДом; лимфому Беркитта; лимфому, кожную Т-клеточную; лимфому Ходжкина; неходжкинские лимфомы (старая классификация всех лимфом, кроме лимфомы Ходжкина); лимфому, первичную центральной нервной системы; опухоли Маркус Уиттл, смертельно опасного заболевания; макроглобулинемию Вальденстрема; злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому; медуллобластому у детей; меланому; меланому, внутриглазную (глаза); карциному клеток Меркеля; мезотелиому злокачественную у взрослых; мезотелиому у детей; метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным поражением; рак ротовой полости; синдром множественной эндокринной неоплазии у детей; множественную миелому/плазмноклеточное новообразование; грибковидный микоз; миелодиспластические синдромы; миелодиспластические/миелолиферативные нарушения; миелоидный лейкоз, хронический; миелоидный лейкоз, острый у взрослых; миелоидный лейкоз, острый у детей; миелому, множественную (рак костного мозга); миелолиферативные нарушения, хронические; рак полости носа и околоносовых пазух; назофарингеальную карциному; нейробластому; неходжкинскую лимфому; немелкоклеточный рак легкого; рак полости рта; рак ротоглотки; остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости; рак яичников; рак эпителия яичников (поверхностной эпителиально-стромальной опухоли); герминогенную опухоль яичников; опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы, островковых клеток; рак околоносовых пазух и полости носа; рак паразитовидной железы; рак полового члена; рак глотки; феохромоцитомы; пинеальной астроцитомы; пинеальную герминому; пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли у детей; аденому гипофиза; плазмноклеточную неоплазию/множественную миелому; плевропульмональную бластому; первичную лимфому центральной нервной системы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-клеточную карциному (рак почки); переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; ретинобластому; рабдомиосаркому у детей; рак слюнных желез; саркому, опухоли семейства Юинга; саркому Капоши; саркомы мягких тканей; саркому матки; синдром Сезари; рак кожи (отличный от меланомы); рак кожи (меланому); рак кожи из клеток Меркеля; мелкоклеточный рак легкого; рак тонкой кишки; саркому мягких тканей; плоскоклеточный рак - см. Рак кожи (отличный от меланомы); плоскоклеточный рак шеи с неизвестной первичной локализацией, метастатический; рак желудка; супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль у детей; Т-клеточную лимфому, кожную (грибковидный микоз и синдром Сезари); рак яичек; рак горла; тимому у детей; тимому и карциному тимуса; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы у детей; переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника; трофобластическую опухоль, гестационную; карциному неизвестной первичной локализации у взрослых; рак неизвестной первичной локализации у детей; переходно-клеточный рак мочеточника и почечной лоханки; рак уретры; рак матки, эндометрия; саркому матки; рак влагалища; глиому зрительного пути и гипоталамуса у детей; рак вульвы; макроглобулинемию Вальденстрема; и опухоль Вильмса (рак почки).

В некоторых вариантах осуществления патогенспецифический антиген представляет собой супертоп МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е представляет собой эпитоп HIV. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAISPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAISPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSPVILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDIYIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETCLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EEHEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления один или несколько супертопов МНС-Е используют для получения слитого белка. Слитый белок может содержать один или несколько супертопов МНС-Е в любом порядке.

В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV вводят в количестве, эффективном для индукции ответа CD8⁺ Т-клеток на по меньшей мере один гетерологичный антиген. В некоторых

вариантах осуществления CD8+ Т-клеточный ответ, индуцированный вектором, характеризуется наличием по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, направленных против эпитопов, презентруемых 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 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток являются рестриктированными по МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки, рестриктированные по МНС-Е, распознают пептиды, разделяемые по меньшей мере 90% других субъектов, иммунизированных вектором. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки направлены против супертопа, презентруемого МНС-Е.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию CD8+ Т-клеточного рецептора (TCR) из CD8+ Т-клеток, стимулированных вектором на основе HCMV.

TCR можно идентифицировать посредством секвенирования ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает супертопы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е представляет собой эпитоп вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYS PVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRET KLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение пептидов супертопов для идентификации рестриктированного по МНС-Е CD8+ Т-клеточного рецептора (TCR) из CD8+ Т-клеток, стимулированных CMV отличных от человека приматов, таких как CMV макака резус или яванского макака (RhCMV или СуCMV), который является дефектным по экспрессии ортологов UL128, UL130, UL146 и UL147 (и необязательно UL82) и экспрессирует ортологи UL40 и US28. Рестриктированные по МНС-Е CD8+ Т-клетки будут стимулироваться у макак резус посредством RhCMV или у яванских макак посредством СуCMV.

В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клеточный ответ, индуцированный вектором на основе HCMV, характеризуется наличием по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, направленных против эпитопов, презентруемых МНС-II. 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 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток являются рестриктированными по МНС-II. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки, рестриктированные по МНС-II, распознают пептиды, разделяемые по меньшей мере 90% других субъектов, иммунизированных вектором. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки направлены против супертопа, презентруемого МНС-II.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию CD8+ Т-клеточного рецептора (TCR) из CD8+ Т-клеток, стимулированных вектором на основе HCMV. TCR можно идентифицировать посредством секвенирования ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает супертопы МНС-II.

В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клеточный ответ, индуцированный дефицитным по UL18 вектором на основе HCMV, который также не содержит US11, характеризуется наличием по меньшей мере 10% CD8+ Т-клеток, направленных против эпитопов, презентруемых МНС-Ia. 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% или по меньшей мере 95% CD8+ Т-клеток являются рестриктированными по МНС-Ia.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию CD8+ Т-клеточного рецептора (TCR) из CD8+ Т-клеток, стимулированных дефицитным по UL18 и US11 вектором на основе HCMV. TCR можно идентифицировать посредством секвенирования ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Ia/гетерологичного

антигена пептидный комплекс.

Также в данном документе раскрыт способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е. Этот способ включает введение первому субъекту вектора на основе HCMV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е. Вектор на основе CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует: белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147. Вектор также может не содержать белок UL82. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV экспрессирует UL40 и US28. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, UL138, UL130, UL146 и UL147 и содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40, US28, и элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE). В некоторых вариантах осуществления MRE содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках. Примеры таких miRNA, экспрессируемых в эндотелиальных клетках, представляют собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328.

Антиген может представлять собой любой антиген, в том числе патогенспецифический антиген, опухолевый вирусный антиген, опухолевой антиген или аутоантиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из варибельной области Т-клеточного рецептора или В-клеточного рецептора.

Этот способ дополнительно включает: идентификацию первого CD8+Т-клеточного рецептора из набора CD8+Т-клеток, при этом первый CD8+Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления первый CD8+Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор, при этом второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. Одна или несколько CD8+ Т-клеток для трансфекции вектором экспрессии могут быть выделены у первого субъекта или второго субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию CD8+ Т-клеточного рецептора из CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором на основе HCMV, при этом CD8+ Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию рестриктированного по МНС-Е CD8+ Т-клеточного рецептора из CD8+ Т-клеток, стимулированных CMV отличных от человека приматов, таких как CMV макака резус или яванского макака (RhCMV или CyCMV), который является дефектным по экспрессии ортологов UL128, UL130, UL146 и UL147, и экспрессирует ортологи UL40 и US28. Рестриктированные по МНС-Е CD8+ Т-клетки будут стимулироваться у макака резус посредством RhCMV или у яванских макака посредством CyCMV. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает CD8+ Т-клеточный рецептор, который распознает супертопы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е представляет собой эпитоп вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAISRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYS PVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETKLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EEHEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

Также в данном документе раскрыт способ получения трансгенных по TCR CD8+ Т-клеток, кото-

рые распознают пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV, при этом указанный первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (b) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (c) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько трансгенных по TCR CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е.

Также раскрыта трансфицированная ТCR CD8+ Т-клетка, которая распознает пептидные комплексы МНС-Е, полученные посредством способа, включающего следующие стадии: (1) введение первому субъекту вектора на основе HCMV (с делецией по UL18, UL128, UL130, UL146, UL147 и, в некоторых вариантах осуществления, UL82; экспрессирующего UL40 и US28; и, в некоторых вариантах осуществления, экспрессирующего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК) в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е, при этом рекомбинантный вектор на основе HCMV содержит по меньшей мере один гетерологичный антиген; (2) идентификацию первого CD8+ Т-клеточного рецептора из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (3) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от первого субъекта или второго субъекта; и (4) трансфекцию одной или нескольких CD8+Т-клеток, выделенных от первого или второго субъекта, вектором экспрессии, за счет чего получают трансфицированную Т-клетку, которая распознает пептидные комплексы МНС-Е, при этом трансфицированные CD8+ Т-клетки генерируют иммунный ответ на полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующий Т-клеточный рецептор, при этом второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс. Одна или несколько CD8+ Т-клеток для трансфекции вектором экспрессии могут быть выделены у первого субъекта или второго субъекта.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй CD8+ Т-клеточный рецептор распознает супертопы МНС-Е. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е представляет собой эпитоп вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления супертоп МНС-Е на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSPVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDIYIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETKLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EEHEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8+ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления первым и/или вторым субъектом является человек или отличный от человека примат. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления первый субъект представляет собой

отличного от человека примата, а второй субъект представляет собой человека, и при этом второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR отличного от человека примата и человека, содержащий CDR3 α и CDR3 β отличного от человека примата первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β отличного от человека примата первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β первого CD8+ TCR.

Также в данном документе раскрыты способы лечения заболевания, такого как рак, патогенная инфекция или иммунное заболевание или нарушение, при этом способ включает введение трансфицированной Т-клетки, которая распознает пептидные комплексы МНС-Е, первому или второму субъекту. В данном документе также раскрыты способы индукции иммунного ответа на аутоантиген хозяина или тканеспецифический антиген, включающие введение трансфицированной Т-клетки, которая распознает пептидные комплексы МНС-Е, первому или второму субъекту.

Рак включает без ограничения острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, злокачественную меланому, мезотелиому, злокачественную мезотелиому, рак почки, рак шейки матки, рак ротоглотки, рак анального канала, рак полового члена, рак влагалища, рак вульвы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, почечно-клеточный рак и опухоли зародышевых клеток.

Патогенная инфекция включает без ограничения вирус иммунодефицита человека, вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразиты *Plasmodium* и *Mycobacterium tuberculosis*.

В данном документе также раскрыты способы получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ ТCR, который распознает пептидный комплекс МНС-Е/супертоп из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают МНС-Е в комплексе с пептидами супертопа HIV, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора макака резус (RhCMV) или CMV яванского макака (CyCCMV), дефицитного по ортологам UL128, UL130, UL146 и UL147, и экспрессию антигенов HIV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток; (b) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (c) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ ТCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ ТCR, при этом второй CD8+ ТCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ ТCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е.

Также в данном документе раскрыт способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II. Этот способ включает введение первому субъекту (или животному) вектора на основе CMV в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II. Вектор на основе CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует: белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146, или белок UL147, и в некоторых вариантах осуществления белок UL82.

В некоторых вариантах осуществления дефицитный по UL18 вектор на основе HCMV также содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE). В некоторых вариантах осуществления MRE содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках. Примерами таких микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках, являются miR-142-ep, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 и miR-125.

Антиген может представлять собой любой антиген, в том числе патогенспецифический антиген, опухолевый вирусный антиген, опухолевой антиген или аутоантиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из варибельной области Т-клеточного рецептора или В-клеточного рецептора.

Этот способ дополнительно включает: идентификацию первого CD8+Т-клеточного рецептора из набора CD8+Т-клеток, при этом первый CD8+Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления первый CD8+Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор, при этом второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс. Одна или несколько CD8+ Т-клеток для

трансфекции вектором экспрессии могут быть выделены у первого субъекта или второго субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию CD8+ Т-клеточного рецептора из CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором на основе HCMV, при этом CD8+ Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает CD8+ Т-клеточный рецептор, который распознает супертопы МНС-II.

Также раскрыты способы получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ TCR, который распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV; (б) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II.

Также раскрыта трансфицированная ТCR CD8+ Т-клетка, которая распознает пептидные комплексы МНС-II, полученные посредством способа, включающего следующие стадии: (1) введение первому субъекту дефицитного по UL18 вектора на основе HCMV (также с делецией по UL128, UL130, UL146, или UL147 (или их комбинациям), и в некоторых вариантах осуществления UL82); и/или экспрессирующей нуклеиновую кислоту, кодирующую элемент распознавания микроРНК) в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом рекомбинантный вектор на основе CMV содержит по меньшей мере один гетерологичный антиген; (2) идентификацию первого CD8+ Т-клеточного рецептора из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (3) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от первого субъекта или второго субъекта; и (4) трансфекцию одной или нескольких CD8+Т-клеток, выделенных от первого или второго субъекта, вектором экспрессии, за счет чего получают трансфицированную Т-клетку, которая распознает пептидные комплексы МНС-II, при этом трансфицированные CD8+ Т-клетки генерируют иммунный ответ на полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующий Т-клеточный рецептор, при этом второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс. Одна или несколько CD8+ Т-клеток для трансфекции вектором экспрессии могут быть выделены у первого субъекта или второго субъекта.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй CD8+ Т-клеточный рецептор распознает супертопы МНС-II.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8+ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления первым и/или вторым субъектом является человек или отличный от человека примат. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления первый субъект представляет собой отличного от человека примата, а второй субъект представляет собой человека, и при этом второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR отличного от человека примата и человека, содержащий CDR3 α и CDR3 β отличного от человека примата первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β отличного от человека примата первого CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β первого CD8+ TCR.

Также в данном документе раскрыты способы лечения заболевания, такого как рак, патогенная инфекция или иммунное заболевание или нарушение, при этом способ включает введение трансфицированной Т-клетки, которая распознает пептидные комплексы МНС-II, первому или второму субъекту. В данном документе также раскрыты способы индукции иммунного ответа на аутоантиген хозяина или тканеспецифический антиген, включающие введение трансфицированной Т-клетки, которая распознает пептидные комплексы МНС-II, первому или второму субъекту.

Рак включает без ограничения острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, ми-

елодиспластический синдром, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, злокачественную меланому, мезотелиому, злокачественную мезотелиому, рак почки, рак шейки матки, рак ротоглотки, рак анального канала, рак полового члена, рак влагалища, рак вульвы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, почечно-клеточный рак и опухоли зародышевых клеток.

Патогенная инфекция включает без ограничения вирус иммунодефицита человека, вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразиты *Plasmodium* и *Mycobacterium tuberculosis*.

Также в данном документе раскрыт способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Ia. Этот способ включает введение первому субъекту дефицитного по UL18 вектора на основе CMV, который также не содержит белок US11, в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Ia. Вектор на основе CMV содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один гетерологичный антиген, и не экспрессирует: белок US11 и белок UL18. Вектор также может не содержать белок UL128, белок UL130 или белок UL146, белок UL147 и/или белок UL82. Антиген может представлять собой любой антиген, в том числе патогенспецифический антиген, опухолевый вирусный антиген, опухолевой антиген или аутоантиген хозяина. В некоторых вариантах осуществления аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из варибельной области Т-клеточного рецептора или В-клеточного рецептора.

Этот способ дополнительно включает: идентификацию первого CD8+Т-клеточного рецептора из набора CD8+Т-клеток, при этом первый CD8+Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления первый CD8+Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор, при этом второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс. Одна или несколько CD8+ Т-клеток для трансфекции вектором экспрессии могут быть выделены у первого субъекта или второго субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию CD8+ Т-клеточного рецептора из CD8+ Т-клеток, индуцированных вектором на основе CMV, при этом CD8+ Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования РНК или ДНК.

Также раскрыты способы получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I, при этом способ включает: (а) идентификацию первого CD8+ TCR, который распознает полученный из МНС-I/гетерологичного антигена пептидный комплекс из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают полученные из МНС-I/гетерологичного антигена пептидные комплексы, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV; (b) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и (с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I.

Также раскрыта трансфицированная CD8+ Т-клетка, которая распознает пептидные комплексы МНС-Ia, полученные посредством способа, включающего следующие стадии: (1) введение первому субъекту дефицитного по US11 и UL18 вектора на основе CMV (дополнительно вектор может быть дефицитным по UL128, UL130, UL146, UL147 и/или UL82; экспрессирующего UL40 и/или US28) в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Ia, при этом рекомбинантный вектор на основе CMV содержит по меньшей мере один гетерологичный антиген; (2) идентификацию первого CD8+ Т-клеточного рецептора из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ Т-клеточный рецептор распознает полученный из МНС-Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс; (3) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от первого субъекта или второго субъекта; и (4) трансфекцию одной или нескольких CD8+Т-клеток, выделенных от первого или второго субъекта, вектором экспрессии, за счет чего получают трансфицированную Т-клетку, которая распознает пептидные комплексы МНС-Ia, при этом трансфицированные CD8+ Т-клетки генерируют иммунный ответ на полученный из МНС-Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления этот способ может дополнительно включать трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ Т-клеточный рецептор, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей Т-клеточный рецептор, при этом второй CD8+ Т-клеточный рецептор содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ Т-клеточного рецептора, за счет чего образуется одна или несколько трансфицированных CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-Ia/гетерологичного антигена пептидный комплекс. Одна или несколько CD8+ Т-клеток для трансфекции вектором экспрессии могут быть выделены у первого субъекта или второго субъекта.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй CD8+ Т-клеточный рецептор идентифицируют посредством секвенирования РНК или ДНК.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8+ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR представляет собой химерный CD8+ TCR. В некоторых вариантах осуществления второй CD8+ TCR содержит CDR1 α , CDR2 α , CDR3 α , CDR1 β , CDR2 β и CDR3 β первого CD8+ TCR.

Также в данном документе раскрыты способы лечения заболевания, такого как рак, патогенная инфекция или иммунное заболевание или нарушение, при этом способ включает введение трансфицированной Т-клетки, которая распознает пептидные комплексы МНС-Ia, первому или второму субъекту. В данном документе также раскрыты способы индукции иммунного ответа на аутоантиген хозяина или тканеспецифический антиген, включающие введение трансфицированной Т-клетки, которая распознает пептидные комплексы МНС-Ia, первому или второму субъекту.

Рак включает без ограничения острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, злокачественную меланому, мезотелиому, злокачественную мезотелиому, рак почки, рак шейки матки, рак ротоглотки, рак анального канала, рак полового члена, рак влагалища, рак вульвы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, почечно-клеточный рак и опухоли зародышевых клеток.

Патогенная инфекция включает без ограничения вирус иммунодефицита человека, вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразиты Plasmodium и Mycobacterium tuberculosis.

III. Конструкции супертопов HIV.

Также раскрыты антигены вируса иммунодефицита человека длиной от 9 до 15 аминокислот, которые на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичны аминокислотной последовательности

LDWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAISRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSPVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPFRKQNPDIYIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETKLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько антигенов вируса иммунодефицита человека. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL128 и UL130. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL146 и UL147. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует белок UL18, белок UL128, белок UL130, белок UL146 и белок UL147 или их ортологи в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147. В некоторых вариантах осуществления мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL128, UL130, UL146 или UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV допол-

нительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в эндотелиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в эндотелиальных клетках, представляет собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 или miR-328. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MRE, при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления miRNA, экспрессируемая в миелоидных клетках, представляет собой miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 или miR-125.

Векторы на основе CMV, раскрытые в данном документе, можно применять в качестве иммуногенной или вакцинной композиции, содержащей рекомбинантный вирус CMV или вектор на его основе и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Иммунологическая композиция, содержащая рекомбинантный вирус CMV или вектор на его основе (или продукт его экспрессии), индуцирует иммунологический ответ, локальный или системный. Ответ может, но не обязательно, быть защитным. Вакцинная композиция вызывает локальный или системный защитный или терапевтический ответ. Соответственно, термин "иммуногенная композиция" включает "вакцинную композицию" (поскольку первый термин может представлять собой защитную композицию).

Рекомбинантные векторы на основе CMV, раскрытые в данном документе, можно применять в способах индукции иммунологического ответа у субъекта, включающих введение субъекту иммуногенной, иммунологической или вакцинной композиции, содержащей рекомбинантный вирус CMV или вектор на его основе и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Рекомбинантные векторы на основе CMV можно применять в терапевтических композициях, содержащих рекомбинантный вирус CMV или вектор на его основе и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Векторы на основе CMV можно получить посредством вставки ДНК, содержащей последовательность, кодирующую опухолевый антиген, в незаменимую или заменимую область генома CMV. Способ может дополнительно включать делетирование одной или нескольких областей из генома CMV. Способ может включать рекомбинацию *in vivo*. Таким образом, способ может включать трансфекцию клетки ДНК CMV в совместимой с клетками среде в присутствии донорной ДНК, представляющей собой гетерологичную ДНК, фланкированную последовательностями ДНК, гомологичными частям генома CMV, посредством чего гетерологичную ДНК вводят в геном CMV и необязательно затем извлечение CMV, модифицированного рекомбинацией *in vivo*. Способ может также включать расщепление ДНК CMV для получения расщепленной ДНК CMV, лигирование гетерологичной ДНК с расщепленной ДНК CMV для получения гибридной гетерологичной ДНК CMV, трансфекцию клетки гибридной гетерологичной ДНК CMV, и затем необязательно последующее извлечение CMV, модифицированного присутствием гетерологичной ДНК. Поскольку рекомбинация *in vivo* является понятной, способ соответственно также приводит к получению плазмиды, содержащей донорную ДНК, не встречающуюся в природе в CMV, кодирующую полипептид, чужеродный CMV, при этом донорная ДНК находится в пределах сегмента ДНК CMV, который в противном случае был бы коллинеарным с основной или отличной от основной областью генома CMV, так что ДНК из основной или отличной от основной области CMV фланкирует ДНК донора. Гетерологичная ДНК может быть вставлена в CMV для получения рекомбинантного CMV в любой ориентации, которая обеспечивает стабильную интеграцию этой ДНК и ее экспрессию, при необходимости.

ДНК, кодирующая гетерологичный антиген в рекомбинантном векторе на основе CMV, может также включать промотор. Промотор может происходить из любого источника, такого как вирус герпеса, включая промотор эндогенного цитомегаловируса (CMV), такого как CMV человека (HCMV), CMV макака резус (RhCMV), промотор мышиноного или другого CMV. Промотор также может представлять собой отличный от вирусного промотор, такой как промотор EF1 α . Промотор может представлять собой усеченный транскрипционно активный промотор, который содержит область, трансактивированную трансактивирующим белком, обеспечиваемым вирусом, и минимальную промоторную область полноразмерного промотора, из которого получен укороченный транскрипционно активный промотор. Промотор может состоять из ассоциации последовательностей ДНК, соответствующих минимальному промотору и расположенным выше регуляторным последовательностям. Минимальный промотор состоит из сайта CAP вместе с АТА-боксом (минимальные последовательности для исходного уровня транскрипции; нерегулируемый уровень транскрипции); "расположенные выше регуляторные последовательности" состоят из расположенного (расположенных) выше элемента (элементов) и энхансерной (энхансерных) последовательности (последовательностей). Кроме того, термин "усеченный" указывает на то, что полнораз-

мерный промотор присутствует не полностью, т.е., что некоторая часть полноразмерного промотора была удалена. Поэтому усеченный промотор может быть получен из вируса герпеса, такого как HCMV или HCMV, например, HCMV-IE или HCMV-IE. Может иметь место до 40% и даже до 90% уменьшения размера по сравнению с полноразмерным промотором на основе пар оснований. Промотор также может представлять собой модифицированный отличный от вирусного промотор. В отношении промоторов HCMV делается отсылка на патент США №№ 5168062 и 5385839. В отношении трансфекции клеток плазмидной ДНК для экспрессии из них делается отсылка на Feigner et al. (1994), J Biol. Chem. 269, 2550-2561. Также в отношении прямой инъекции плазмидной ДНК в качестве простого и эффективного способа вакцинации против различных инфекционных заболеваний делается отсылка на Science, 259:1745-49, 1993. Таким образом, в объем настоящего изобретения входит то, что вектор можно использовать посредством прямой инъекции векторной ДНК.

Также раскрыта кассета экспрессии, которая может быть встроена в рекомбинантный вирус или плазмиду, содержащую усеченный транскрипционно активный промотор. Кассета экспрессии может дополнительно содержать функциональную усеченную сигнальную последовательность полиаденилирования; например, сигнальную последовательность полиаденилирования SV40, которая является усеченной, но функциональной. Учитывая, что природа обеспечила более крупную сигнальную последовательность, действительно удивительным является то, что усеченная сигнальная последовательность полиаденилирования является функциональной. Усеченная сигнальная последовательность полиаденилирования направлена на решение проблем ограничения размера вставки рекомбинантных вирусов, таких как CMV. Кассета экспрессии может также содержать гетерологичную ДНК по отношению к вирусу или системе, в которую она вставлена; и эта ДНК может быть представлять собой гетерологичную ДНК, как описано в данном документе.

В отношении антигенов для применения в вакцинах или иммунологических композициях, см. также Медицинский словарь Стедмана (24-е издание, 1982 г., например, определение вакцины (перечень антигенов, используемых в составах вакцин); могут быть использованы такие антигены или эпитопы, представляющие интерес, из этих антигенов. В отношении опухолевых антигенов, специалист в данной области техники может выбрать опухолевый антиген и кодирующую его ДНК, исходя из знаний аминокислот и соответствующих последовательностей ДНК пептида или полипептида, а также исходя из природы определенных аминокислот (например, размера, заряда и т.д.) и словаря кодонов, при этом избегая излишнего экспериментирования.

Один из способов определения Т-эпитопов антигена включает картирование эпитопов. Перекрывающиеся пептиды опухолевого антигена образуются посредством синтеза олигопептидов. Затем отдельные пептиды тестируют в отношении их способности индуцировать активацию Т-клеток. Этот подход был особенно применим при картировании Т-клеточных эпитопов, поскольку Т-клетка распознает короткие линейные пептиды в комплексе с молекулами МНС.

Иммунный ответ на опухолевой антиген генерируется, как правило, следующим образом: Т-клетки распознают белки только тогда, когда белок был расщеплен на более мелкие пептиды и презентируван в комплексе, называемом "главным комплексом 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. Разные виды и отдельные субъекты характеризуются различными типами аллелей комплекса МНС; считается, что они содержат другой тип МНС. Один тип молекулы МНС класса I называется МНС-Е (HLA-E у человека, Mamu-E у RM, Qa-1b у мышей). В отличие от других молекул МНС-I, МНС-Е является высоко консервативным внутри и между видами млекопитающих.

Следует отметить, что ДНК, содержащая последовательность, кодирующую опухолевый антиген, может сама содержать промотор для управления экспрессии в векторе CMV, или ДНК может быть ограничена кодирующей ДНК опухолевого антигена. Эта конструкция может быть помещена в такой ориентации в отношении эндогенного промотора CMV, что она функционально связана с промотором, и за счет этого экспрессируется. Кроме того, для амплификации или повышения экспрессии можно использовать несколько копий ДНК, кодирующих опухолевый антиген, или использовать сильный или ранний промотор, или ранний и поздний промотор, или любую их комбинацию. Таким образом, ДНК, кодирующая опухолевый антиген, может быть соответствующим образом расположена в отношении эндогенного промотора CMV, или эти промоторы могут быть перемещены для вставки в другое место вместе с ДНК, кодирующей опухолевый антиген. Нуклеиновые кислоты, кодирующие более одного опухолевого антигена, могут быть упакованы в вектор на основе CMV.

Далее раскрыты фармацевтические и другие композиции, содержащие раскрытые векторы на основе CMV. Такие фармацевтические и другие композиции могут быть составлены таким образом, чтобы их можно было применять в любой процедуре введения, известной из уровня техники. Такие фармацевтические композиции могут вводиться парентеральным путем (внутрикожным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, внутривенным или другими путями). Введение также может осуществляться через слизистые оболочки, например, через рот, нос, половые органы и т.д.

Раскрытые фармацевтические композиции могут быть приготовлены в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалистам в фармацевтической области. Такие композиции

можно вводить в дозах и посредством методик, хорошо известных специалистам в области медицины, с учетом таких факторов, как порода или вид, возраст, пол, вес и состояние конкретного пациента, а также способ введения. Композиции можно вводить отдельно или можно вводить совместно или последовательно с другими векторами на основе CMV или с другими иммунологическими, антигенными или вакцинными или терапевтическими композициями. Такие другие композиции могут содержать очищенные нативные антигены или эпитопы или антигены или эпитопы, экспрессируемые рекомбинантным CMV или другой векторной системой; и вводятся с учетом вышеперечисленных факторов.

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

Антигенные, иммунологические или вакцинные композиции обычно могут содержать адъювант и некоторое количество вектора или продукта экспрессии на основе CMV, чтобы индуцировать требуемый ответ. При применении у человека квасцы (фосфат алюминия или гидроксид алюминия) являются типичным адъювантом. Сапонин и его очищенный компонент Quil A, полный адъювант Фрейнда и другие адъюванты, применяемые в научных исследованиях и ветеринарных областях, характеризуются токсичностью, которая ограничивает их потенциальное применение в вакцинах для человека. Можно применять препараты определенного химического состава, такие как мурамилдипептид, монофосфориллипид A, конъюгаты фосфолипидов, такие как описанные Goodman-Snitkoff et al, J Immunol. 147:410-415 (1991), инкапсулирование белка в протеолипосому, как описано Miller et al., J Exp. Med. 176:1739-1744 (1992), а также инкапсулирование белка в липидные везикулы, такие как липидные везикулы Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Нашуа, Нью-Гэмпшир).

Композиция может быть упакована в разовую лекарственную форму для иммунизации путем парентерального (например, внутримышечного, внутрикожного или подкожного) введения или введения через отверстия, например, перлингвальным путем (например, пероральным), внутрижелудочным, через слизистую оболочку, в том числе интраоральным, интраанальным, интравагинальным и т.п. путем. Кроме того, эффективная доза 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 другие процедуры скрининга, которые известны и не требуют излишнего экспериментирования. Дозы экспрессируемого продукта могут варьироваться от нескольких до нескольких сотен микрограммов, например, от 5 до 500 мкг. Вектор на основе CMV можно вводить в любом подходящем количестве для достижения экспрессии при этих уровнях дозы. В неограничивающих примерах: Векторы на основе CMV можно вводить в количестве по меньшей мере 10^2 БОЕ; таким образом, векторы на основе CMV можно вводить по меньшей мере в таком количестве; или в диапазоне от около 10^2 БОЕ до около 10^7 БОЕ. Другими подходящими носителями или разбавителями могут быть вода или забуференный физиологический раствор с консервантом или без него. Вектор на основе CMV может быть лиофилизирован для ресуспендирования во время введения или может находиться в растворе. Термин "около" может означать в пределах 1%, 5%, 10% или 20% от определенного значения.

Следует понимать, что белки и кодирующие их нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут отличаться от точных последовательностей, проиллюстрированных и описанных в данном документе. Таким образом, в настоящем изобретении представлены делеции, добавления, усечения и замены представленных последовательностей при условии, что последовательности функционируют в соответствии со способами настоящего изобретения. В связи с этим замены, как правило, будут носить консервативный характер, т.е. те замены, которые имеют место в пределах семейства аминокислот. Например, аминокислоты обычно делятся на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин и гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин и тирозин. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Логично предположить, что отдельная замена лейцина изолейцином или валином или наоборот; аспартата глутаматом или наоборот; треонина серином или наоборот; или аналогичная консервативная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не окажет существенного влияния на биологическую активность. Таким образом, белки, содержащие по сути такую же аминокислотную последовательность, что и описанные белки, но содержащие минорные аминокислотные замены, которые не оказывают значительного влияния на иммуногенность белка, входят в объем настоящего изобретения.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть кодон-оптимизированными, например, кодоны могут быть оптимизированы для применения в клетках человека. Например, любая вирусная или бактериальная последовательность может быть изменена таким образом. Многие вирусы, включая HIV и другие лентивирусы, используют большое количество редких кодо-

нов, и посредством изменения этих кодонов, чтобы они соответствовали кодонам, обычно используемым у требуемого субъекта, может быть достигнута повышенная экспрессия опухолевого антигена, как описано в Andreetal, J Virol. 72:1497-1503,1998.

Рассматриваются нуклеотидные последовательности, кодирующие функционально и/или антигенно эквивалентные варианты и производные векторов на основе CMV, и гликопротеины, включенные в них. Эти функционально эквивалентные варианты, производные и фрагменты проявляют способность сохранять антигенную активность. Например, изменения в последовательности ДНК, которые не изменяют кодируемую аминокислотную последовательность, а также изменения, которые приводят к консервативным заменам аминокислотных остатков, делециям или добавлениям одной или нескольких аминокислот, и замене аминокислотных остатков аналогами аминокислот, представляют собой изменения, которые не будут оказывать существенного влияния на свойства кодируемого полипептида. Консервативные замены аминокислот: глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; серин/треонин/метионин; лизин/аргинин; и фенилаланин/тирозин/триптофан. В некоторых вариантах осуществления варианты характеризуются 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% гомологией или идентичностью антигену, эпитопу, иммуногену, пептиду или полипептиду, представляющим интерес.

Идентичность или гомологию последовательностей определяют посредством сравнения последовательностей, выровненных таким образом, чтобы свести к максимуму перекрытие и идентичность при этом сводя к минимуму гэпы в последовательностях. В частности, идентичность последовательности может быть определена с использованием любого из множества математических алгоритмов. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм, представленный Karlin & Altschul, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 2264-2268, модифицированный в Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993;90: 5873-5877.

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

Предпочтительным для использования в соответствии с настоящим изобретением является программное обеспечение WU-BLAST (Washington University BLAST) версии 2.0. Можно загрузить исполняемые программы WU-BLAST версии 2.0 для нескольких платформ UNIX. Эта программа основана на WU-BLAST версии 1.4, которая, в свою очередь, основана на публичном домене NCBI-BLAST версии 1.4 (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; все из которых включены в данный документ посредством ссылки).

Различные рекомбинантные нуклеотидные последовательности и антитела и/или антигены по настоящему изобретению получают с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК и клонирования. Такие методики хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al. 1989).

Любой вектор, который обеспечивает экспрессию вирусов по настоящему изобретению, может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. В определенных вариантах осуществления раскрытые вирусы можно применять *in vitro* (например, с использованием бесклеточных систем экспрессии) и/или в культивируемых клетках, выращенных *in vitro*, для получения кодируемого гетерологического антигена (например, антигенов опухолевых вирусов, антигенов HIV, опухолевых антигенов и антител), которые затем можно применять для различных вариантов применения, таких как производство белковых вакцин. Для таких вариантов применения можно использовать любой вектор, который обеспечивает экспрессию вируса *in vitro* и/или в культивируемых клетках.

Для экспрессии раскрытых опухолевых антигенов последовательность, кодирующая белок опухолевого антигена, должна быть "функционально связана" с регуляторными или контрольными последовательностями нуклеиновой кислоты, которые управляют транскрипцией и трансляцией белка. Как используется в данном документе, кодирующая последовательность и контрольная последовательность нуклеиновой кислоты или промотор называются "функционально связанными", когда они ковалентно связаны таким образом, что экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности

находятся под влиянием или контролем контрольной последовательности нуклеиновой кислоты. "Контрольная последовательность нуклеиновой кислоты" может представлять собой любой элемент нуклеиновой кислоты, такой как без ограничения промоторы, энхансеры, IRES, интроны и другие элементы, описанные в данном документе, которые управляют экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты или кодирующей последовательности, которая функционально связана с ними. Термин "промотор" будет использоваться в данном документе для обозначения группы модулей контроля транскрипции, которые сгруппированы вокруг сайта инициации РНК-полимеразы II и которые при функциональном соединении с последовательностями, кодирующими белок по настоящему изобретению, приводят к экспрессии кодируемого белка. Экспрессия трансгенов по настоящему изобретению может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцируемого промотора, который иницирует транскрипцию только при воздействии какого-либо определенного внешнего стимула, такого как без ограничений антибиотики, такие как тетрациклин, гормоны, такие как экдизон, или тяжелые металлы. Промотор также может быть специфичным в отношении определенного типа клеток, ткани или органа. Из уровня техники известны многие подходящие промоторы и энхансеры, и любой такой подходящий промотор или энхансер можно использовать для экспрессии трансгенов по настоящему изобретению. Например, подходящие промоторы и/или энхансеры могут быть выбраны из базы данных промоторов эукариот (EPDB).

Векторы, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут содержать подходящую область регуляции гена, такую как промотор или энхансер, так что могут экспрессироваться антигены по настоящему изобретению.

Векторы на основе CMV, описанные в данном документе, могут содержать мутации, которые могут препятствовать распространению вируса от хозяина к хозяину, что делает вирус неспособным инфицировать людей с ослабленным иммунитетом или других субъектов, которые могут столкнуться с осложнениями в результате инфицирования CMV. Векторы на основе CMV, описанные в данном документе, могут также содержать мутации, которые приводят к презентации иммунодоминантных и неиммунодоминантных эпитопов, а также к неканонической рестрикции МНС. Однако мутации в векторах на основе CMV, описанные в данном документе, не оказывают влияния на способность вектора реинфицировать субъекта, ранее инфицированного CMV. Такие мутации CMV описаны, например, в патентных публикациях США 2013-013676S; 2010-0142C23; 2014-014103C; и публикации заявки PCT WO 2014/13S209, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Раскрытые векторы на основе CMV можно вводить *in vivo*, например, когда целью является получение иммуногенного ответа, в том числе CD8+ иммунного ответа, в том числе иммунного ответа, характеризующегося высоким процентом CD8+ Т-клеточного ответа, рестриктируемого по МНС-Е, МНС-II или МНС-I (или их гомологу или ортологу). Например, в некоторых примерах может быть желательно использовать раскрытые векторы на основе CMV у лабораторного животного, такого как макаки резус, для доклинического испытания иммуногенных композиций и вакцин с использованием RhCMV. В других примерах будет желательно использовать раскрытые векторы на основе CMV у субъектов-людей, например, в клинических испытаниях и для фактического клинического применения иммуногенных композиций с использованием HCMV.

Для таких вариантов применения *in vivo* раскрытые векторы на основе CMV вводят в качестве компонента иммуногенной композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции по настоящему изобретению применимы для стимуляции иммунного ответа против гетерологичного антигена, в том числе опухолевого антигена, опухолевого вирусного антигена или аутоантигена хозяина, и могут применяться в качестве одного или нескольких компонентов профилактической или терапевтической вакцины против опухолевых антигенов, опухолевых вирусных антигенов или аутоантигенов хозяина для предупреждения, облегчения или лечения рака. Нуклеиновые кислоты и векторы по настоящему изобретению особенно применимы для получения генетических вакцин, т.е. вакцин для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих антигены по настоящему изобретению, субъекту, такому как человек, так что антигены затем экспрессируются у субъекта с целью индукции иммунного ответа.

Графики (или схемы) иммунизации хорошо известны для животных (в том числе человека) и могут быть легко определены для определенного субъекта и иммуногенной композиции. Следовательно, иммуногены можно вводить субъекту один или несколько раз. Предпочтительно существует установленный временной интервал между отдельными введениями иммуногенной композиции. Хотя этот интервал варьируется для каждого субъекта, обычно он колеблется 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 осуществления настоящего изобретения интервал составляет дольше, преимущественно около 10 недель, 12 недель, 14 недель, 16 недель, 18 недель, 20 недель, 22 недель, 24 недель, 26 недель, 28 недель, 30 недель, 32 недель, 34 недель, 36 недель, 38 недель, 40 недель, 42 недель, 44 недель, 46 недель, 48 недель, 50 недель, 52 недель, 54 недель, 56 недель, 58 недель, 60 недель, 62 недель, 64 недель, 66 недель, 68 недель или 70 недель. Схемы иммунизации в типичном случае включают от 1 до 6 введений иммуногенной композиции, но могут включать всего одно, два или четыре введения. спосо-

бы индукции иммунного ответа могут также включать введение адъюванта с иммуногенами. В некоторых случаях бустерная иммунизация ежегодно, раз в два года или с другим длительным интервалом (5-10 лет) может дополнять протокол первоначальной иммунизации. Настоящие способы также включают в себя различные схемы прайм-бустерной вакцинации. В этих способах за одной или несколькими примирующими иммунизациями следует одна или несколько бустерных иммунизаций. Фактическая иммуногенная композиция может быть одинаковой или разной для каждой иммунизации, а тип иммуногенной композиции (например, содержащая белок или вектор экспрессии), путь введения и состав иммуногенов также могут варьироваться. Например, если вектор экспрессии используется для стадий примирования и бустинга, он может принадлежать к одному или разным типам (например, ДНК, бактериальный или вирусный вектор экспрессии). Один применимый режим прайм-бустинга предусматривает две примирующие иммунизации с интервалом в четыре недели, за которыми следуют две бустерные иммунизации через 4 и 8 недель после последней примирующей иммунизации. Специалисту в данной области техники также должно быть очевидно, что существует несколько пермутаций и комбинаций, которые охватываются с использованием ДНК, бактериальных и вирусных векторов экспрессии по настоящему изобретению для обеспечения схем примирования и бустинга. Векторы на основе CMV можно использовать многократно, экспрессируя различные антигены, происходящие из различных патогенов.

Примеры

Пример 1: Защита от SIV посредством индукции рестриктированных по MHC-E CD8+ Т-клеток.

В нескольких исследованиях было продемонстрировано, что полученные из штамма 68-1 векторы на основе RhCMV, экспрессирующие антигены SIV, контролируют и в конечном итоге устраняют инфекцию высокопатогенным SIV_{mac239} (Hansen 2019. A live-attenuated RhCMV/SIV vaccine shows long-term efficacy against heterologous SIV challenge. *Science Translational Medicine* 11:eaaw2607; Hansen 2013. Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* 502:100-4). Эта защита коррелировала со способностью RhCMV штамма 68-1 индуцировать рестриктированные по MHC-II и MHC-E CD8+ Т-клетки (Hansen 2016. Broadly targeted CD8(+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science* 351:714-20; Hansen. Cytomegalovirus Vectors Violate CD8+ T Cell Epitope Recognition Paradigms. *Science* 340:1237874-1237874). Однако не было известно, необходимы ли для этой защиты рестриктированные по MHC-II и/или MHC-E CD8+ Т-клетки.

Таким образом, способность специфически программировать CD8+ Т-клетки, которые рестриктированы исключительно по MHC-E или MHC-II, позволила изучить, отвечают ли рестриктированные по MHC-E или MHC-II CD8+ Т-клетки за уникальную защиту от SIV_{mac239}. Четыре когорты макаков резус (RM) инокулировали различными RhCMV штамма 68-1, как описано ниже.

Когорта 1: Девять RM инокулировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1 по типу "только MHC-E", каждый из которых содержит три сайта узнавания для mir126 в 3'-нетранслируемой области основных генов Rh108 (UL79) и Rh156 (IE2) и экспрессирует (одна вставка на вектор) антигены SIV SIVgag, SIVretanef (слитый продукт *rev*, *tat* и *nef*) и 5'-сегмент SIVpol соответственно.

Когорта 2: 15 RM инокулировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1 по типу "только MHC-II" с делецией по Rh67 (UL40) и экспрессирующими (одна вставка на вектор) антигены SIV SIVgag, SIVretanef (слитый продукт *rev*, *tat* и *nef*) и 5'-сегмент SIVpol соответственно.

Когорта 3: 12 RM инокулировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1 по типу "только MHC-II", каждый из которых содержит три сайта узнавания для mir142 в 3'-нетранслируемой области основных генов Rh108 (UL79) и Rh156 (IE2) и экспрессирует (одна вставка на вектор) антигены SIV SIVgag, SIVretanef (слитый продукт *rev*, *tat* и *nef*) и 5'-сегмент SIVpol соответственно.

Когорта 4: (контрольная когорта) 15 RM инокулировали тремя векторами на основе RhCMV штамма 68-1, экспрессирующими (одна вставка на вектор) антигены SIV SIVgag, SIVretanef (слитый продукт *rev*, *tat* и *nef*) и 5'-сегмент SIVpol соответственно.

Количественно определяли среднюю частоту CD4+ или CD8+ Т-клеток, отвечающих на полученные из антигена SIV пептидные пулы. Частоты Т-клеток определяли в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) в указанные временные точки посредством окрашивания внутриклеточных цитокинов в отношении IFN γ или TNF α в присутствии пулов перекрывающихся (по 11A) 15-мерных пептидов, представляющих антигены SIV. Каждый из RM развивал устойчивые CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы на каждый из антигенов SIV (фиг. 1).

Затем анализировали рестрикцию по MHC специфических в отношении SIVgag CD8+ Т-клеточных ответов. Специфические в отношении SIVgag CD8+ Т-клеточные ответы в PBMC, полученных от трех RM в каждой из указанных когорт, измеряли в присутствии отдельных пептидов. Рестрикцию по MHC определяли посредством блокирования mAb ко всем MHC-I W6/32, блокирующего MHC-E пептида VL9 и блокирующего MHC-II пептида CLIP. В то время как все пептидные ответы у животных когорты 1 блокировали пептидом VL9, пептидные ответы в когортах 2 и 3 блокировали пептидом CLIP (фиг. 2). Таким образом, CD8+ Т-клетки в когорте 1 рестриктированы исключительно по MHC-E, в то время как CD8+ Т-клетки в когортах 2 и 3 рестриктированы исключительно по MHC-II. CD8+ Т-клеточные ответы у животных когорты 4 (не показано) рестриктированы как по MHC-II, так и по MHC-E, как сообщалось ранее (Hansen 2016. Broadly targeted CD8(+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex

E. Science 351:714-20; Hansen 2013. Cytomegalovirus Vectors Violate CD8+ T Cell Epitope Recognition Paradigms. Science 340:1237874-1237874).

Для определения того, отвечают ли рестриктированные по МНС-E или МНС-II CD8+ Т-клетки за защиту, когорты 1, 2 и 3 подвергали повторной интравенечной инокуляции лимитирующей дозой SIVmac239. RM подвергали воздействию еженедельно до тех пор, пока не была обнаружена первая вирусная нагрузка в плазме крови (pvl) или ответы SIVvif (с началом инфекции, обозначенным как предыдущее воздействие). Поскольку вакцинные векторы не экспрессируют SIVvif, развитие ответов de novo SIVvif является доказательством инфекции в отсутствие определяемой вирусной нагрузки SIV в плазме крови. RM считали контроллерами (прямоугольники белого цвета), если вирусемия в плазме крови никогда не наблюдалась или она становилась неопределяемой в течение 2 недель после первоначальной положительной pvl, а затем сохранялась ниже порогового значения в течение по меньшей мере 4 из последующих 5 недель, в отличие от неконтроллеров (прямоугольники черного цвета), которые после инфицирования проявляли непрерывную вирусемию с типичным паттерном пика и плато.

У всех животных в когортах 2 и 3 развилась системная прогрессирующая вирусемия SIV, что свидетельствует о том, что рестриктированные по МНС-II CD8+ Т-клетки были неспособны обеспечить защиту от инфекции SIVmac239 (фиг. 3). В отличие от этого, 6/9 (67%) животных когорты 1, вакцинированных векторами на основе RhCMV штамма 68-1/SIV/miR126, строго контролировали инфекцию SIVmac239. Эти данные демонстрируют, что рестриктированные по МНС-E CD8+ Т-клеточные ответы обеспечивали защиту от высоковирулентного SIV.

Ранее было продемонстрировано, что полученные из штамма 68-1 векторы на основе RhCMV, индуцируют CD8+ Т-клеточные ответы, которые демонстрируют необычно высокую плотность эпитопов (= количество пептидов, распознаваемых Т-клетками в пределах определенного антигена) (Hansen. 2013. Cytomegalovirus Vectors Violate CD8+ T Cell Epitope Recognition Paradigms. Science 340:1237874-1237874). Дополнительно было показано, что некоторые из этих эпитопов МНС-E и МНС-II, так называемые супертопы, распознаются у каждого животного (Hansen 2016. Broadly targeted CD8(+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. Science 351:714-20). Супертопы не были описаны для "классических" эпитопов, презентруемых молекулами МНС-I, и, таким образом, представляют собой уникальную особенность векторов на основе CMV. Для определения того, могут ли одни супертопы объяснять защиту, наблюдаемую при применении векторов на основе RhCMV по типу "только МНС-E", описанных выше, создавали искусственный слитый белок, состоящий из последовательностей супертопов из отдельных антигенов SIV (табл. 1, 15-мерные и минимальные пептидные последовательности супертопов подчеркнуты).

Таблица 1

Супертопы МНС-E в каждом антигене SIV

Антиген	Рестрикция по МНС	Пептидная последовательность	SEQ ID NO:
SIVrev	МНС-E	RRWRRRWQQLLALADRIYSFPDP	1
SIVtat	МНС-E	TSSASNKPISNRTRHCQPE	2
SIVnef	МНС-E	ISMRRSRPSGDLRQRLRA	3
SIVnef	МНС-E	EKLAYRKQNMDDIDEEDDD	4
SIVnef	МНС-E	AQTSQWDDPWGEVLAWKFD	5
SIVnef	МНС-E	YVRYPEEFGSKSGLSEEEV	6
SIVpol	МНС-E	GGIGGFINTKEYKNVEIEVLGKR	7
SIVpol	МНС-E	NTPTFAIKKKDKNKWRMLIDFRE	8
SIVpol	МНС-E	WMGYELWPTKWKLQKIELP	9
SIVgag	МНС-E	LGLQKCVRMYPNTNILDVK	10
SIVgag	МНС-E	YMLGKQREKQRESREKPYKEV	11

Последовательность искусственного слитого белка представлена ниже (метка эпитопа HA подчеркнута):

MRRWRRRWQQLLALADRIYSFPDPTSSASNKPISNRTRHCQPEISMRRSRPSGDLRQRLRAEKLAYRKQNMDDIDEEDDDAQTSQWDDPWGEVLAWKFDYVRYPEEFGSKSGLSEEEVGGIGGFINTKEYKNVEIEVLGKRNTPTFAIKKKDKNKWRMLIDFREWMGYELWPTKWKLQKIELPLGLQKCVRMYPNTNILDVKYMLGKQREKQRESREKPYKEVYPYDVPDYAD (SEQ ID NO: 12).

Иммуноблоттинг проводили для демонстрации экспрессии слитой конструкции супертопа SIV по-

средством зондирования антителом к НА (фиг. 4).

Слитый белок супертопа SIV МНС-Е встраивали в RhCMV штамма 68-1, содержащий сайты нацеливания miR126, с целью сфокусировать CD8+ Т-клеточные ответы в отношении небольшого набора рестриктированных по МНС-Е эпитопов. Полученную конструкцию инокулировали в 8 RM (когорта 5). Частоты Т-клеток определяли в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) в указанные временные точки посредством окрашивания внутриклеточных цитокинов в отношении IFN γ или TNF α в присутствии пулов отдельных 15-мерных пептидов, представляющих супертопы SIV (фиг. 5). CD8+ Т-клетки отвечали на полученные из антигена SIV пептиды (фиг. 5А). CD8+ Т-клетки отвечали на рестриктированные по МНС-Е супертопы Gag69 и Gag120, но не на другие рестриктированные по МНС-Е эпитопы Gag, которые обычно распознаются CD8+ Т-клетками от RM, иммунизированных векторами на основе RhCMV штамма 68-1/gag, экспрессирующими целые вставки SIVgag (фиг. 5В). Эти результаты демонстрируют, что все животные индуцировали специфические в отношении SIV CD8+ Т-клеточные ответы, которые были направлены исключительно на супертопы.

Для определения того, смогут ли рестриктированные по супертопу МНС-Е CD8+ Т-клетки воспроизводить защиту, наблюдаемую при применении векторов по типу "только МНС-Е", когорту 5 подвергли повторной интра ректальной инокуляции низкой дозы SIVmac239, как описано выше. RM подвергали воздействию еженедельно до тех пор, пока не была обнаружена первая вирусная нагрузка в плазме крови (rv1) или ответы SIVvif (с началом инфекции, обозначенным как предыдущее воздействие). RM считали контроллерами (прямоугольники белого цвета), если rv1 становилась неопределяемой в течение 2 недель после первоначальной положительной rv1, а затем сохранялась ниже порогового значения в течение по меньшей мере 4 из последующих 5 недель, в отличие от неконтроллеров (прямоугольники черного цвета), которые после инфицирования проявляли непрерывную вирусную нагрузку с типичным паттерном пика и плато.

Важно отметить, что 5/7 (71%) животных, вакцинированных одним вектором на основе RhCMV штамма 68-1/SIV/miR126, экспрессирующим слитый белок супертопа, контролировали инфекцию SIVmac239 (фиг. 6). Эти данные указывают на то, что CD8+ Т-клетки, специфические в отношении супертопов МНС-Е, отвечают за защиту от высокопатогенного SIV.

Для конструирования антигенов на основе супертопов HIV супертопы HIV картировали посредством вставки антигенов HIV в RhCMV штамма 68-1 и инокуляции RM. В Табл. 2 содержится перечень идентифицированных супертопов HIV. Оптимальная минимальная пептидная последовательность подчеркнута.

Таблица 2

Перечень супертопов HIV

Антиген	Пептид	Рестрикции по МНС	Пептидная последовательность (15-мерная) (оптимальная минимальная пептидная последовательность подчеркнута)	SEQ ID NO: (полная пептидная последовательность, оптимальная минимальная пептидная последовательность)
HIVgag	4	E	<u>LD</u> AWEKIRLRPGGKK	13, 14
	29	E	KK <u>AAQAAD</u> TGNSSQ	15, 16
	36	E	QMV <u>HQAIS</u> PRTLNAW	17, 18
	47	E	NTMLNT <u>VGGHQA</u> AMQ	19, 20
	61	E	<u>STLQEQIGW</u> MTNPP	21, 22
	69	E	IVRMYS <u>PVSIL</u> DIRQ	23, 24
	119	E	QKQEPID <u>KEL</u> YPLAS	25, 26
HIVpol	14	E	SFSFPQITLWQRPLV	27
	28	E	VRQYDQILIEICGKK	28
	81	E	EPFRKQNPDIIVYQL	29
	148	E	YVDGAANRETCLGKA	30
	180	E	EEHEKYSNWRAMAS	31
HIVnef	28	E	ILDWVYHTQGYFPD	32

Пример 2: Экспрессия UL18 предупреждает индукцию рестриктированных по МНС-Е и МНС-II CD8+ Т-клеток.

Для определения влияния UL18 на способность векторов на основе RhCMV штамма 68-1 индуцировать рестриктированные по МНС-II и МНС-Е CD8+ Т-клеточные ответы, создавали две конструкции RhCMV:

Конструкция 1: RhCMV штамма 68-1, содержащий каскету экспрессии для 5'-фрагмента SIVpol под контролем промотора EF1 α в гене Rh211 RhCMV в качестве остова вектора. UL18 вставляли посредством замены гена Rh13.1, таким образом, чтобы UL18 экспрессировался вместо Rh13.1. Вставленная последовательность UL18 соответствует UL18 изолята TR HCMV.

Конструкция 2: RhCMV штамма 68-1, в котором ген Rh107 (гомолог UL78 HCMV) заменяли слитым белком SIV rev, tat и nef (SIVrtm) в качестве остова вектора. UL18 вставляли посредством замены гена Rh13.1.

5×10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ) конструкции 1 инокулировали трем RhCMV-серопозитивным RM, и такое же количество конструкции 2 инокулировали двум RhCMV-серопозитивным RM в день 0. Для контроля RM инокулировали RhCMV на основе 68-1, экспрессирующим SIVgag под контролем промотора EF1 α .

В день 7, в день 14 и один раз в две недели после этого PBMC выделяли от двух RM и CD8+ Т-клеточные ответы на антигены SIV, индуцированные конструкцией 1, 2 или контролем, измеряли посредством внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) для IFN γ и TNF α с использованием перекрывающихся 15-мерных пептидных пулов, которые охватывали SIVpol, SIVrtm или SIVgag соответственно. Для специфического обнаружения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептиды в контексте МНС-Е или МНС-II, было предпочтительно, чтобы всех животных разделяли супертопы в каждом антигене SIV (Hansen Science 2013, Hansen Science 2016). Таким образом, каждый из пептидов супертопов тестировали отдельно посредством ICS в PBMC соответствующего RM.

Анализировали частоты CD8+ Т-клеток, отвечающих на пептидные пулы антигенов SIV, таким образом, представляя общие антигенспецифические ответы у двух животных из каждой группы (фиг. 7А). Частоты CD8+ Т-клеток, отвечающих на рестриктированные по МНС-Е супертопы и рестриктированные по МНС-II супертопы, также анализировали для тех же двух животных (фиг. 7В, 7С).

У всех животных развивался CD8+ Т-клеточный ответ на антиген SIV, экспрессируемый вектором на основе RhCMV, используемым для инокуляции. Однако ответы супертопов наблюдали только в отношении RhCMV штамма 68-1/SIVgag, тогда как оба вектора, экспрессирующие UL18, не индуцировали Т-клеток, распознающих супертопы. Таким образом, эти результаты показали, что UL18 предупреждает индукцию рестриктированных по МНС-Е и МНС-II CD8+ Т-клеток.

Затем выполняли картирование с рестрикцией по МНС для дальнейшего определения того, какие молекулы МНС отвечают за возникновение специфических в отношении SIVpol ответов у трех животных, которые получали экспрессирующий UL18 RhCMV штамма 68-1/SIVpol. Специфические в отношении SIVpol CD8+ Т-клеточные ответы в PBMC, полученных из трех RM, инокулированных конструкцией 1, измеряли в присутствии отдельных пептидов. CD8+ Т-клеточные ответы на отдельные пептиды в SIVpol измеряли в присутствии специфических реагентов, которые либо блокируют презентацию МНС-I, МНС-II либо МНС-Е (МНС-I и МНС-Е блокируются антителом W6/32, МНС-II блокируется специфическим в отношении HLA-DR антителом и пептидом CLIP, МНС-Е блокируется пептидом VL9).

Результаты, показанные на фиг. 8, демонстрируют, что стимуляция CD8+ Т-клеток каждым отдельным пептидом ингибировалась ингибирующим антителом ко всем МНС-I W6/32, но не специфическим в отношении МНС-Е пептидом VL9 или специфическими в отношении МНС-II антителами и пептидом CLIP. Таким образом, все CD8+ Т-клеточные эпитопы рестриктированы по МНС-I. В отличие от этого, CD8+ Т-клетки от животных, инокулированных RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим антигены SIV, распознают все пептиды в контексте МНС-II или МНС-Е (Hansen Science 2013, Hansen Science 2016).

Эти результаты демонстрируют, что UL18 перепрограммировал CD8+ Т-клеточный ответ, скорее всего, посредством предупреждения индукции рестриктированных по МНС-II и МНС-Е CD8+ Т-клеток. Известно, что UL18 взаимодействует с ингибирующим рецептором хозяина LIR-1 (Yang Z, Bjorkman PJ. 2008. Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 105:10095-100; Chapman TL, Heikeman AP, Bjorkman PJ. 1999. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. Immunity 11:603-13). Таким образом, возможный механизм этого перепрограммирования заключается в том, что посредством участия ингибирующих рецепторов, ингибирующих лейкоциты (LIR) на Т-клетках, UL18 предупреждает непосредственное примирование CD8+ Т-клеток посредством RhCMV штамма 68-1 (непосредственное примирование относится к Т-клеткам, которые примированы инфицированными клетками). В отсутствие непосредственного примирования CD8+ Т-клетки индуцируются перекрестным примированием, т.е. опосредованно неинфицированными клетками (например, дендритными клетками), презентующими антиген, полученный из инфицированных клеток. До сих пор UL18 не участвовал в предупреждении примирования Т-клеток. Таким образом, эти результаты являются неожиданными и

беспрецедентными.

Для определения того, отвечает ли взаимодействие с ингибирующим рецептором LIR1 за способность UL18 предупреждать индукцию рестриктированных по МНС-II и МНС-E CD8+ Т-клеток, кодирующую область UL18 в конструкции 1, описанную выше, мутировали таким образом, что аминокислота аспаргат в положении 196 в домене альфа-3 будет замещаться серином (D196S). Предыдущие структурные исследования продемонстрировали, что этот аспаргат участвует в связывании UL18 с LIR1 (Yang Z, Bjorkman PJ. 2008. Structure of UL18, a peptide-binding viral MHC mimic, bound to a host inhibitory receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10095-100). Более того, этот остаток является консервативным во всех LIR1-связывающих молекулах HLA, но отсутствует в HLA-подобных молекулах, которые не связывают LIR1. Мутант UL18 D196S вставляли в RhCMV штамма 68-1, экспрессирующий SIVpol, и полученную конструкцию инокулировали двум RM. В день 91 PBMC выделяли и CD8+ Т-клеточные ответы на SIVpol измеряли посредством ICS для IFN γ и TNF α с использованием перекрывающихся 15-мерных пептидных пулов, которые охватывали SIVpol или пептид pol41 супертопа МНС-E SIVpol (GFINTKEYKYNVEIEV; SEQ ID NO: 33) или супертоп pol90 МНС-II (LPQGWKGSPIAFQYT; SEQ ID NO: 34). В отличие от животных, инокулированных RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим интактный UL18 (фиг. 9A), Т-клеточные ответы на оба супертопа SIVpol наблюдали у животных, инокулированных RhCMV штамма 68-1, экспрессирующим мутант D196S UL18 (фиг. 9B). Таким образом, эти результаты показали, что UL18 должен привлечь рецептор LIR1 для предупреждения индукции рестриктированных по МНС-E и МНС-II CD8+ Т-клеток.

Считается, что UL18 играет роль в ускользании от NK-клеток (Prod'homme 2007. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol* 178:4473-81). Поскольку ускользание от NK-клеток может иметь решающее значение для функции вектора (Sturgill 2016. Natural Killer Cell Evasion Is Essential for Infection by Rhesus Cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 12:e1005868) можно было предположить, что делеция UL18 из векторов на основе HCMV предупредит их способность индуцировать иммунные ответы на гетерологичные антигены. Для определения того, способен ли HCMV с делецией UL18 индуцировать Т-клеточный ответ на вставленный антиген, UL18 заменяли антигеном HIV, за счет чего делетировали UL18 и использовали эндогенный промотор UL18 для управления экспрессией слитого белка HIVgag/nef/pol. Кроме того, гены UL128, UL130, UL146 и UL147 также делетировали из вектора с делецией UL18, поскольку ранее было показано, что продукты этих генов ингибируют рестриктированные по МНС-E и МНС-II CD8+ Т-клеточные ответы (патент США № 10532099). В качестве остова вектора использовали TR3 HCMV (Caposio. 2019.Characterization of a live-attenuated HCMV-based vaccine platform. *Scientific Reports* 9: 19236). Экспрессию слитого белка HIV в полученном вирусном векторе (HCMV TR3 Δ UL18/HIVfusion Δ UL128-130 Δ UL146-147) подтверждали посредством иммуноблота фибробластов человека (фиг. 10).

Вектор на основе HCMV с делецией UL18 также инокулировали в RM, и иммунный ответ на антигены HIV определяли в PBMC посредством ICS в день 56 после инокуляции. Как изображено на фиг. 11, вектор индуцировал CD8+ Т-клеточные ответы на HIVgag, HIVnef и HIVpol в RM, как продемонстрировано с использованием перекрывающихся пептидных пулов, содержащих каждый из этих антигенов. Таким образом, был сделан вывод, что векторы HCMV, не содержащие UL18, сохраняют свою способность индуцировать Т-клеточные ответы на гетерологичные антигены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор на основе HCMV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген, при этом рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147 в связи с наличием одной или нескольких мутаций в последовательностях нуклеиновой кислоты, кодирующих UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147.
2. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.1, отличающийся тем, что указанные мутации в последовательностях нуклеиновой кислоты, кодирующих UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147, выбраны из группы, состоящей из точечных мутаций, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутаций по типу усечения и делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок.
3. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL40 или его ортолог.
4. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую US28 или его ортолог.
5. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует UL82 (pp71) или его ортолог.
6. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор на основе HCMV не экспрессирует US11 или его ортолог.
7. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указан-

ный рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (miRNA) (MRE), при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в эндотелиальных клетках.

8. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.7, отличающийся тем, что указанная miRNA, экспрессируемая в эндотелиальных клетках, представляет собой miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 или miR-328.

9. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор на основе HCMV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую MRE, при этом MRE содержит целевой сайт для miRNA, экспрессируемой в миелоидных клетках.

10. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.9, отличающийся тем, что указанная miRNA, экспрессируемая в миелоидных клетках, представляет собой miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21 или miR-125.

11. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанный гетерологичный антиген представляет собой патогенспецифический антиген, опухолевой антиген, тканеспецифический антиген или аутоантиген хозяина.

12. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.11, отличающийся тем, что указанный патогенспецифический антиген получен из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов Plasmodium или Mycobacterium tuberculosis.

13. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-5 и 6-7, отличающийся тем, что указанный патогенспецифический антиген представляет собой супертоп МНС-Е.

14. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.13, отличающийся тем, что указанный патогенспецифический антиген содержит эпитоп HIV.

15. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.14, отличающийся тем, что указанный эпитоп HIV на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичен

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
 KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
 QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
 NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
 STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
 IVRMYSPV SILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPV SILE (SEQ ID NO: 24);
 QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
 SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
 EPRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRETKLGKA (SEQ ID NO: 30);
 EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

16. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.11, отличающийся тем, что указанный опухолевый антиген связан с острым миелоидным лейкозом, хроническим миелоидным лейкозом, миелодиспластическим синдромом, острым лимфобластным лейкозом, хроническим лимфобластным лейкозом, неходжкинской лимфомой, множественной миеломой, злокачественной меланомой, раком молочной железы, раком легкого, раком яичников, раком предстательной железы, раком поджелудочной железы, раком толстой кишки, почечно-клеточным раком (RCC) или опухолями зародышевых клеток.

17. Рекомбинантный вектор на основе HCMV по п.11, отличающийся тем, указанный аутоантиген хозяина представляет собой антиген, полученный из варибельной области Т-клеточного рецептора (TCR), или антиген, полученный из варибельной области В-клеточного рецептора.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный вектор на основе HCMV по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ генерирования иммунного ответа у субъекта на по меньшей мере один гетерологичный антиген, включающий введение субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.1-17 в количестве, эффективном для индукции CD8+ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

21. Способ лечения или предупреждения рака у субъекта, включающий введение рекомбинантного вектора на основе HCMV по п.11 или 16 в количестве, эффективном для индукции CD8+ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

22. Способ лечения или предупреждения патогенной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.11-15 в количестве, эффективном для индукции CD8+ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

23. Способ лечения аутоиммунного заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV по п.11 или 17 в количестве, эффективном для ин-

дукции CD8+ Т-клеточного ответа на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

24. Способ получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает:

а) введение первому субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.1-5, 7-8 или 11-12 в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е;

б) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс;

с) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

д) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е.

25. Способ получения CD8+ Т-клеток, распознающих пептидные комплексы МНС-Е, при этом способ включает:

а) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.1-5, 7-8 или 11-12, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-Е/гетерологичного антигена пептидный комплекс;

б) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько трансгенных по TCR CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-Е.

26. Способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом способ включает:

а) введение первому субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.1-6, 9 или 10 в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II;

б) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс;

с) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

д) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II.

27. Способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом способ включает:

а) идентификацию первого CD8+ TCR, который распознает полученный из МНС-II/гетерологичного антигена пептидный комплекс из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.1-6, 9 или 10;

б) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом 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 содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-II.

28. Способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I, при этом способ включает:

а) введение первому субъекту рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп.1-6 в количестве, эффективном для создания набора CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I;

б) идентификацию первого CD8+ TCR из набора CD8+ Т-клеток, при этом первый CD8+ TCR распознает полученный из МНС-I/гетерологичного антигена пептидный комплекс;

с) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

д) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ TCR, и промо-

тор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ TCR, при этом второй CD8+ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I.

29. Способ получения CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I, при этом способ включает:

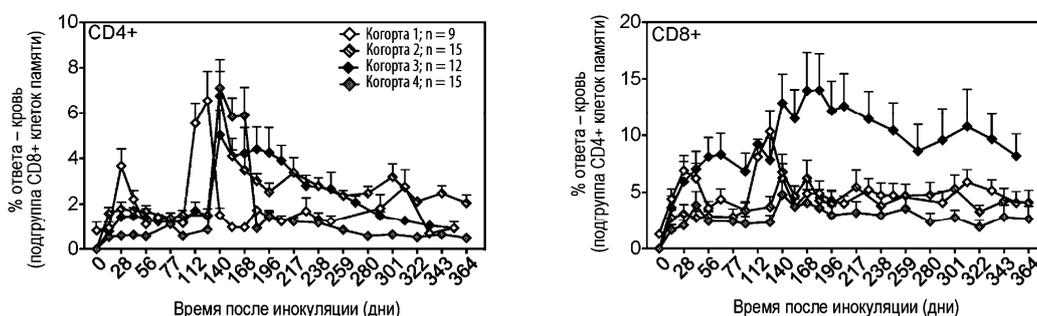
а) идентификацию первого CD8+ ТCR, который распознает полученный из МНС-I/гетерологического антигена пептидный комплекс из набора CD8+ Т-клеток, которые распознают полученный из МНС-I/гетерологического антигена пептидный комплекс, при этом набор CD8+ Т-клеток получают из рекомбинантного вектора на основе HCMV по любому из пп. 1-6;

б) выделение одной или нескольких CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

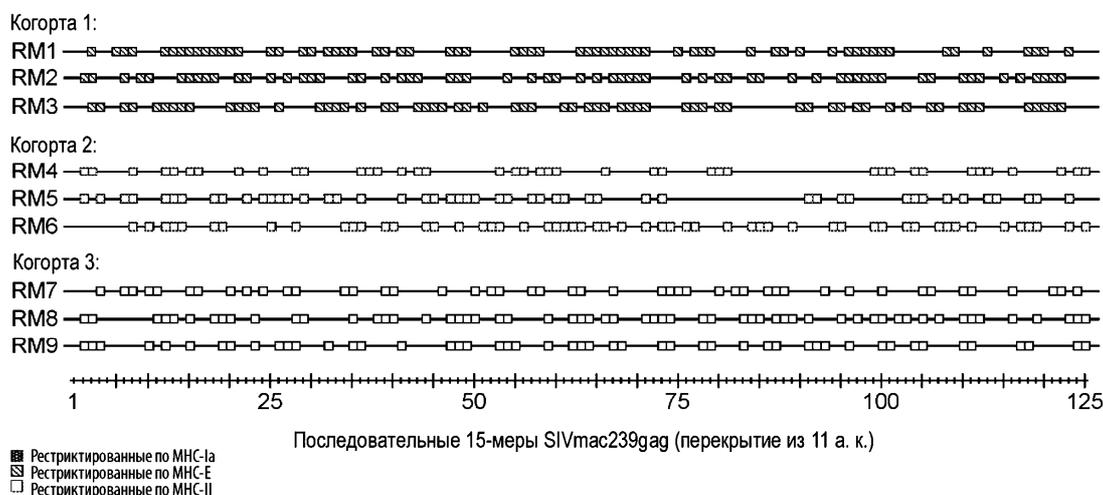
с) трансфекцию одной или нескольких CD8+ Т-клеток вектором экспрессии, при этом вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ ТCR, и промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ ТCR, при этом второй CD8+ ТCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ ТCR, за счет чего образуется одна или несколько CD8+ Т-клеток, которые распознают пептидные комплексы МНС-I.

30. Рекомбинантный вектор на основе HCMV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько антигенов, полученных из вируса иммунодефицита человека, которые включают аминокислотную последовательность

LDAWEKIRLRPGGKK (SEQ ID NO: 13); DAWEKIRLR (SEQ ID NO: 14);
KKAQQAADTGNSSQ (SEQ ID NO: 15); KAQQAADT (SEQ ID NO: 16);
QMVHQAI SPRTLNAW (SEQ ID NO: 17); HQAI SPRTL (SEQ ID NO: 18);
NTMLNTVGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 19); VGGHQAAMQ (SEQ ID NO: 20);
STLQEQIGWMTNPP (SEQ ID NO: 21); STLQEQIGW (SEQ ID NO: 22);
IVRMYS PVSILDIRQ (SEQ ID NO: 23); RMYSPVSIL (SEQ ID NO: 24);
QKQEPIDKELYPLAS (SEQ ID NO: 25); KQEPIDKEL (SEQ ID NO: 26);
SFSFPQITLWQRPLV (SEQ ID NO: 27); VRQYDQILIEICGKK (SEQ ID NO: 28);
EPFRKQNPDI VIYQL (SEQ ID NO: 29); YVDGAANRET KLGKA (SEQ ID NO: 30);
EENEKYSNWRAMAS (SEQ ID NO: 31); или ILDLWVYHTQGYFPD (SEQ ID NO: 32).

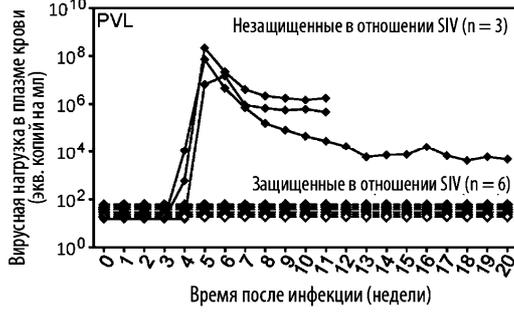


Фиг. 1

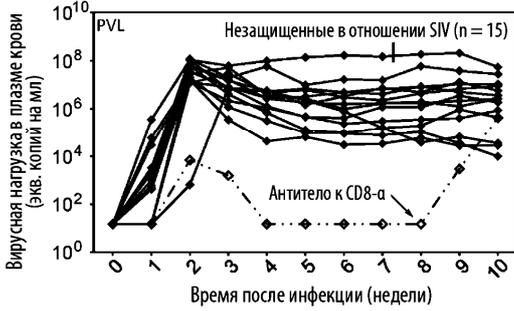


Фиг. 2

Когорта 1:

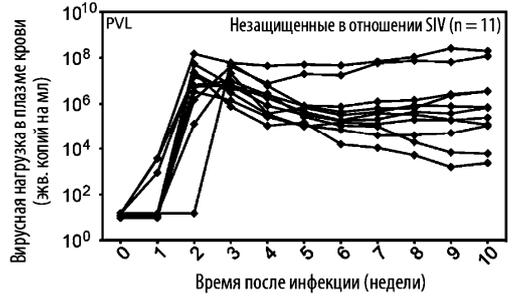


Когорта 2:



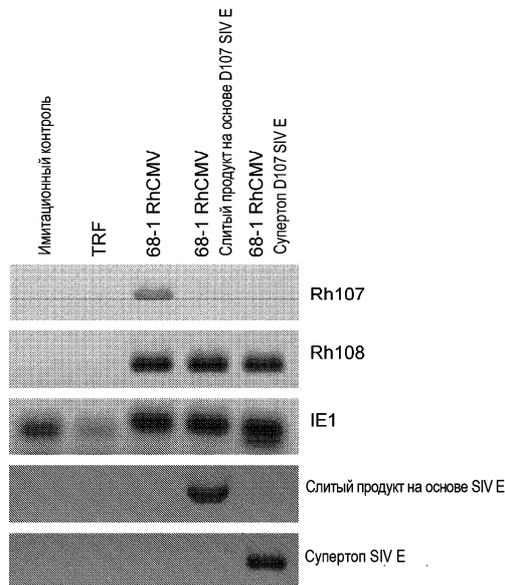
Фиг. 3

Когорта 3:

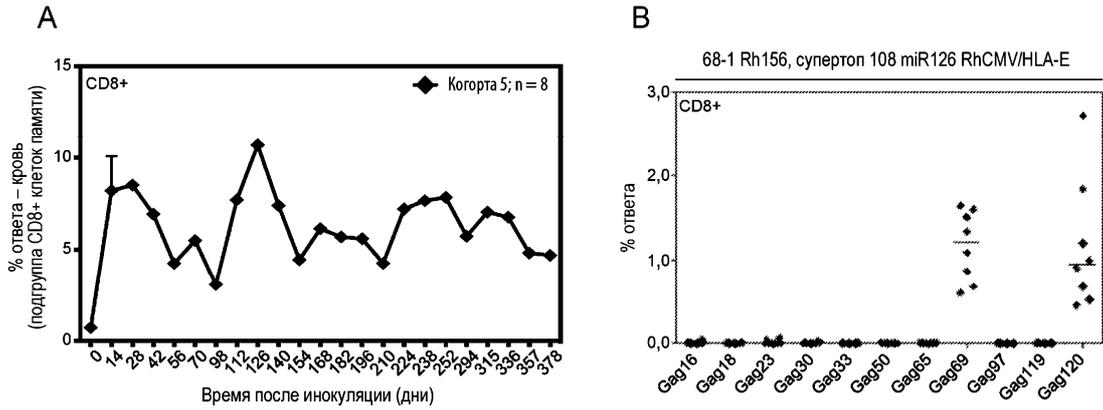


Фиг. 3

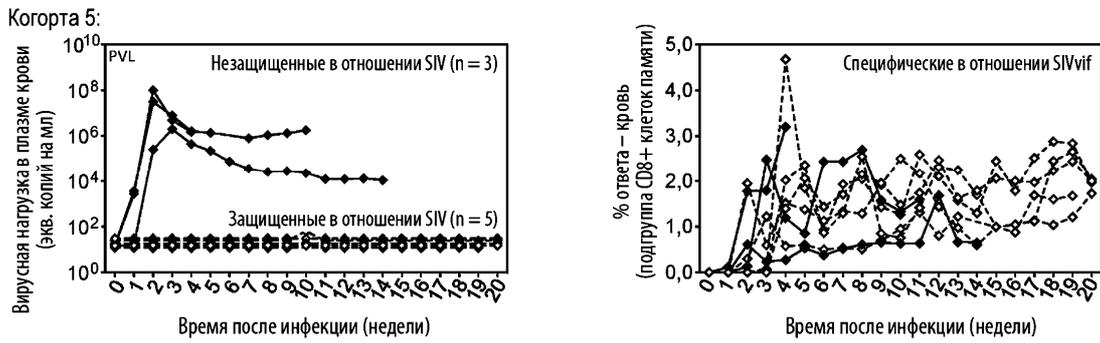
(Продолжение)



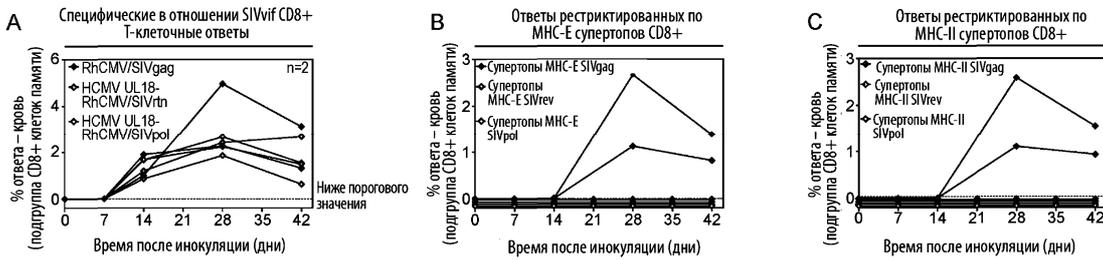
Фиг. 4



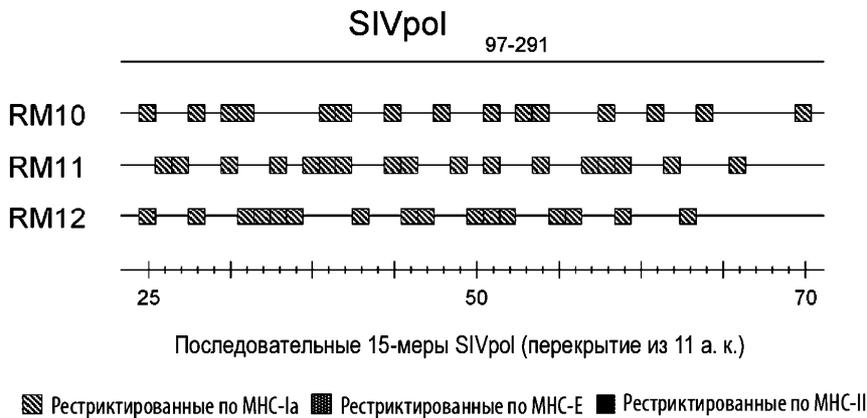
Фиг. 5



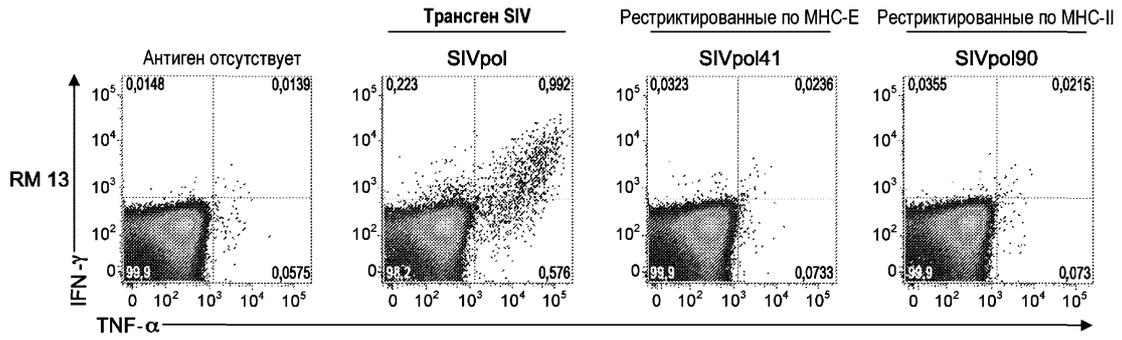
Фиг. 6



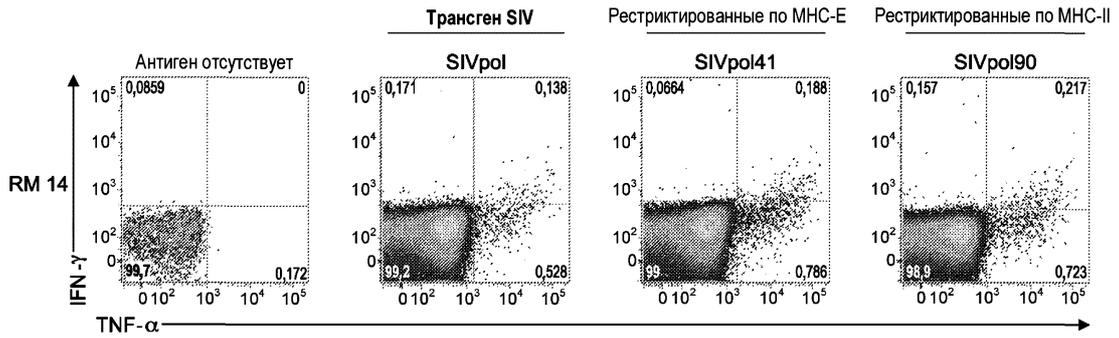
Фиг. 7



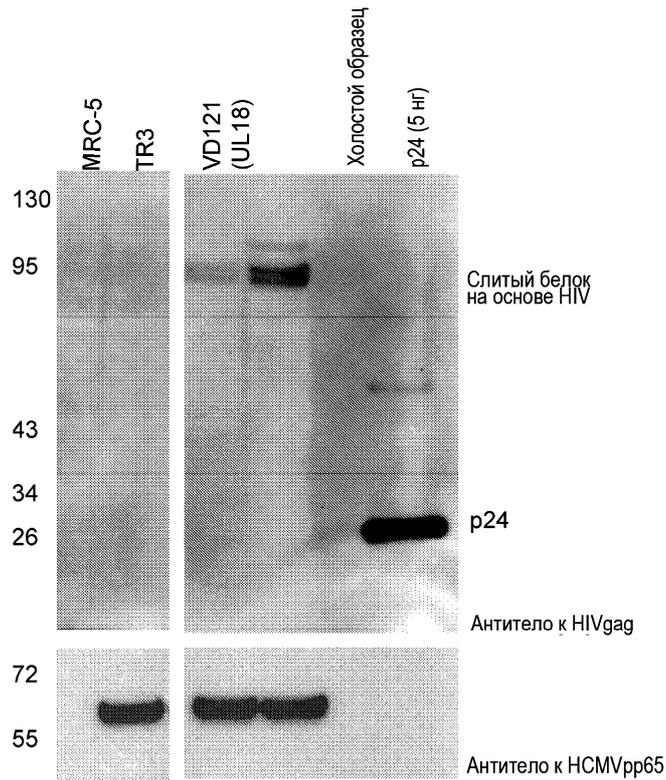
Фиг. 8



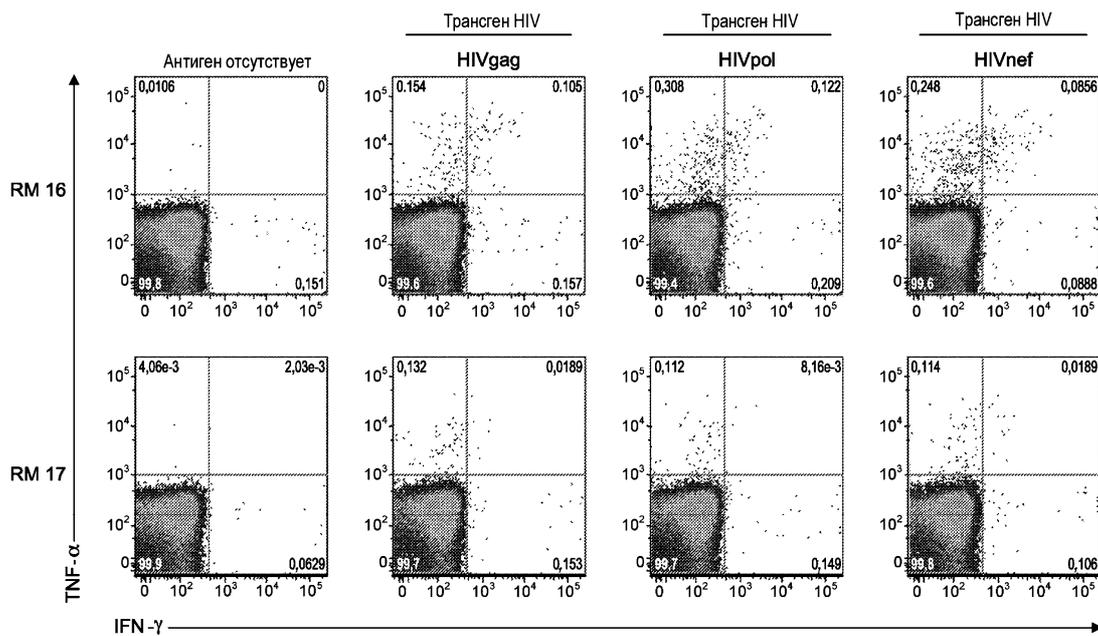
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11

