

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490367 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.08

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.08.30

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ HCMV-ВЕКТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/239,298; 63/356,386

(72) Изобретатель:

(32) 2021.08.31; 2022.06.28

Арвин Анн М., Дуглас Дженет Л.,
Маршалл Эмили, Вирджин Герберт В.
(US)

(33) US

(86) PCT/US2022/075670

(87) WO 2023/034801 2023.03.09

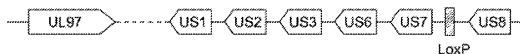
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ВИР БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(US)

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Алексеев В.В., Галухина Д.В. (RU)

(57) Изобретение относится к векторам на основе цитомегаловируса человека (HCMV) для доставки гетерологичных антигенов и содержащих их иммуногенных композиций.



202490367

A1

A1

202490367

РЕКОМБИНАНТНЫЕ HCMV-ВЕКТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПОЯСНЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ.

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, предоставлен в формате XML вместо бумажной копии и включен в описание посредством ссылки. XML-файл, содержащий Перечень последовательностей, имеет название 930485_438WO_SequenceListing.xml. XML-файл имеет размер 1189916 байт, был создан 25 августа 2022 г. и был подан в электронной форме посредством EFS-Web.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Было обнаружено, что вакцинные векторы на основе цитомегаловируса (CMV) вызывают сильные иммунные ответы на доставляемые антигены, даже в случае патогенов, которые традиционно были способны избегать естественного иммунитета и вызывать повторные или хронические инфекции. Например, штамм 68-1 цитомегаловируса (RhCMV) резусов, модифицированный для кодирования вируса иммунодефицита обезьян (SIV), был связан с долгосрочной защитой при стимуляции SIV (Hansen, SG et al., Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* 502, 100–104 (2013); Hansen, SG et al., Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473, 523–527 (2011); Hansen, SG et al., Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med.* 15, 293–299 (2009)). Последующее исследование с CMV-векторами показало, что можно вызывать разные иммунные ответы в зависимости от конкретных генетических компонентов остова CMV (Früh, K et al., CD8⁺ T cell programming by cytomegalovirus vectors: applications in prophylactic and therapeutic vaccination. *Curr Opin Immunol.* 47, 52–56 (2017); Hansen, SG et al. Cytomegalovirus vectors violate CD8⁺ T cell epitope recognition paradigms. *Science* 340, 1237874 (2013)).

Было показано, что 68-1 цитомегаловируса (RhCMV) резусов индуцирует CD8⁺ Т-клетки, которые распознают пептиды, презентруемые ГКГС-II и ГКГС-E вместо традиционных ГКГС-I. Этот эффект также наблюдали для CMV яванских макаков (СуCMV), продемонстрировав, что удаление RhCMV- и СуCMV-гомологов HCMV UL128, UL130, UL146 и UL147 делает возможной индукцию ГКГС-E-ограниченных CD8⁺ Т-клеток (публикации международных заявок №№ WO2016/130693A1, WO2018/075591A1). Кроме того, эти векторы индуцируют ГКГС-II-рестриктированные CD8⁺ Т-клетки. Индукцию ГКГС-II-рестриктированных CD8⁺ Т-клеток можно устранить путем вставки нацеливающего сайта для специфической в отношении эндотелиальных клеток микроРНК

(miR) 126 в ключевые вирусные гены этих векторов, что приводит к получению «только ГКГС-Е» векторов, которые индуцируют исключительно ГКГС-Е-рестриктированные CD8⁺ Т-клетки (публикация международной заявки № WO2018/075591A1). В отличие от этого, было показано, что вставка специфической в отношении миелоидных клеток miR142-3p в 68-1 RhCMV предотвращает индукцию ГКГС-Е-рестриктированных CD8⁺ Т-клеток, что приводит к получению векторов, которые индуцируют CD8⁺ Т-клетки, рестриктированные исключительно по ГКГС-II (публикация международной заявки № WO2017/087921A1). Также было показано, что удаление гомолога UL40 Rh67 предотвращает индукцию ГКГС-Е рестриктированных CD8⁺ Т-клеток, что приводит к получению «только ГКГС-II векторов»-(публикация международной заявки № WO2016/130693A1). Соответственно, за счет конструирования CMV-векторов, имеющих конкретные генные делеции, CMV можно использовать для доставки антигенов и «программирования» иммунных ответов на эти антигены.

В соответствии с оценками Всемирной организации здравоохранения на 2019 г. 38 миллионов людей по всему миру живут с вирусом иммунодефицита человека (HIV или ВИЧ), и при этом приблизительно 690000 людей умрут по причине ВИЧ/синдрома приобретенного иммунодефицита (ВИЧ/СПИД). На данный момент не существует доступной вакцины для предотвращения или лечения ВИЧ. Кроме того, хотя в лечении ВИЧ/СПИД был достигнут научный прогресс, людям, живущим с ВИЧ, все еще требуется пожизненная терапия, поскольку существующие варианты лечения не обеспечивают клиренс латентных вирусных резервуаров (смотрите Eriksson, S et al. Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. PLoS Pathog 9, e1003174 (2013)). Соответственно, остается потребность в эффективных превентивных или терапевтических вакцинах для ВИЧ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3 и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген, при этом:

- (a) (i) вектор не экспрессирует UL18, UL78, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;
- (ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL82 или его ортолог; и
- (iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78;

(b) (i) вектор не экспрессирует UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL18 или его ортолог, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортолог, и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82; или

(c) (i) вектор не экспрессирует UL18, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортологи; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген включает антиген HIV, например, слитый белок, содержащий HIV Gag, а HIV Nef и HIV Pol, или его иммуногенные фрагменты, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген представляет собой или содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит, состоит или состоит преимущественно из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит, состоит или состоит преимущественно из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

В настоящем изобретении также предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит, состоит или состоит преимущественно из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит, состоит или состоит преимущественно из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит, состоит или состоит преимущественно из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 проиллюстрированы когорты повышения дозы в клинической оценке вакцины против HIV на основе HCMV. Когорта 1 будет состоять из 6 субъектов, рандомизованных в соотношении 4:2 для получения вакцины или плацебо. Когорта 2 будет состоять из 8 субъектов, рандомизованных в соотношении 6:2 для получения вакцины или плацебо. Когорта 3 будет состоять из 12 субъектов, рандомизованных в соотношении 10:2 для получения вакцины или плацебо. Начальная стартовая доза будет составлять 1×10^3 фокусирующихся единиц (ФОЕ). Дозу в последующих когорте будут поэтапно повышать с приблизительно 30-кратным приростом до 1×10^6 ФОЕ на основании данных по безопасности в течение 8 недель. Субъекты будут получать вторую подкожную дозу в день

57. Вторая доза будет составлять такой же уровень дозировки продукта, что и во время введения первой дозы.

На Фиг. 2А-2F проиллюстрировано расписание проведения оценок (РПО), используемое в клинической оценке вакцины против HIV на основе HCMV.

На Фиг. 3 приведен перечень лабораторных оценок, используемых в клинической оценке вакцины против HIV на основе HCMV.

На Фиг. 4 проиллюстрирована градация тяжести нежелательных явлений (НЯ) в клинической оценке вакцины против HIV на основе HCMV.

На Фиг. 5 проиллюстрировано расписание введения дозы для CMV-серопозитивных («CMV(+)») и CMV-серонегативных («CMV(-)») субъектов, получавших вектор 2 или вектор 3. CMV-серонегативные субъекты будут получать возрастающие дозы вектора 2 или вектора 3, начиная с дозы 5×10^4 ФОЕ, а поэтапный переход к более высокому уровню доз (5×10^5 ФОЕ или 5×10^6 ФОЕ) будут инициировать на основании данных по безопасности в течение 8 недель. CMV-серопозитивные субъекты будут получать вектор 2 или вектор 3 в дозе 5×10^4 ФОЕ, 5×10^5 ФОЕ или 5×10^6 ФОЕ, при этом введение доз во всех трех когортах будут проводить одновременно.

На Фиг. 6А-6Е проиллюстрирована разработка векторной конструкции для остова CMV-вектора. На Фиг. 6А проиллюстрирована УК (уникальная короткая) область HCMV TR, в которую была вставлена кассета ВАС, помимо мутации гена UL97, придающей устойчивость к ганцикловиру. На Фиг. 6В проиллюстрирована вставка кассеты ВАС, необходимой для размножения в *E. coli*, между US1 и US7 с удалением, таким образом, US2-US6. На Фиг. 6С проиллюстрирована вставка US2-US7 из штамма HCMV AD169, GFP, и сайтов LoxP, а также последующая делеция US7 из TR. На Фиг. 6D проиллюстрированы замена TR UL97 на AD169 UL97 для восстановления чувствительности к ганцикловиру, удаление гена GFP и добавление рекомбиназы Cre в кассету ВАС под управлением раннего промотора SV40. На Фиг. 6Е проиллюстрировано вырезание кассеты ВАС после восстановления вируса с оставлением одного 34 п. о. сайта LoxP, расположенного между US7 и US8, в качестве единственной оставшейся невирусной последовательности в вирусном геноме.

На Фиг. 7 проиллюстрирован процесс производства для создания главного посевного вирусного материала и материала для клинического исследования для вектора 2 и вектора 3.

На Фиг. 8 проиллюстрировано сравнение времени выдержки в двух типах пакетов для биообработки, CX5-14 Labtainer™ PE (полиэтилен) и Flexboy® EVA (этиленвинилацетат), в течение 72 часов при 2–8 °С.

На Фиг. 9 проиллюстрированы титры после исследования кумулятивного времени выдержки. Репрезентативный промежуточный продукт, составленный в гистидин-трегалозовом (ГТ) буфере, выдерживали в пакете Flexboy® EVA, наполненном до 30 % вместимости, в течение ночи («Т/Н») при 2–8 °С в течение 16 часов (обозначено «№2»). После выдержки в течение ночи промежуточный продукт выдерживали в течение до 72 часов при комнатной температуре (КТ) (обозначено от «№3» до «№5»), после чего его фасовали в флаконы в объеме 0,7 мл и выдерживали еще в течение 48 часов при КТ (обозначено «№6» и «№7») для имитации наихудшего сценария для выдержки при КТ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

СЛОВАРЬ

В следующих разделах приведено подробное описание CMV-векторов и связанных с ними фармацевтических композиций и способов индукции иммунного ответа, такого как иммунный ответ против ВИЧ, а также способов лечения или предотвращения заболевания (например, ВИЧ). Перед более подробным изложением данного изобретения, для его понимания может быть полезно привести определения некоторых используемых в данном документе терминов. Дополнительные определения приведены в тексте данного изобретения.

Если контекст не подразумевает иное, в тексте представленного описания и формулы изобретения слово «содержать» и его вариации, такое как «содержит» и «содержащий», следует понимать в открытом включительном смысле, то есть, как «включающий, но не ограничивающийся этим». «Состоящий из» означает исключение более чем следовых элементов других ингредиентов и существенных этапов способов, описанных в данном документе, и в случае аминокислотной или нуклеотидной последовательности, исключение дополнительных аминокислот или нуклеотидов, соответственно. Термин «состоящий преимущественно из» ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или этапами или теми, которые не оказывают материального влияния на основные характеристики заявленного изобретения. Например, в композиции, состоящей преимущественно из элементов, определенных в данном документе, не исключается наличие следовых примесей от способа выделения и очистки и фармацевтически приемлемых носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, консервантов и т. п. Аналогично, белок состоит преимущественно из конкретной аминокислотной последовательности, когда белок содержит дополнительные аминокислоты, которые составляют не более 20 % длины белка и не оказывают существенного влияния на активность белка (например, изменяют активность белка не

более чем на 50 %). Варианты осуществления, определяемые каждым из переходных терминов, входят в объем данного изобретения.

В представленном описании термин «около» означает $\pm 20\%$ от указанных диапазона, значения или структуры, если не указано иное.

Следует понимать, что в контексте данного документа термины в единственном числе включают «один или более» пронумерованных компонентов, если не указано иное. Использование альтернативного варианта (например, «или») следует понимать как означающее один, оба или любую комбинацию альтернативных вариантов, и может использоваться как синоним «и/или». В контексте данного документа термины «включать» и «иметь» используются как синонимы, при этом данные термины и их варианты следует считать неограничивающими.

Слово «практически» не исключает «полностью»; например, композиция, которая «практически не содержит» Y может вообще не содержать Y. При необходимости слово «практически» может быть исключено из предложенных в данном документе определений.

В контексте данного документа термины «пептид», «полипептид» и «белок», а также вариации этих терминов, относятся к молекуле, в частности пептиду, олигопептиду или белку, включая слитый белок, соответственно, содержащей по меньшей мере две аминокислоты, соединенные друг с другом нормальной пептидной связью или модифицированной пептидной связью, например, как в случаях изостерических пептидов. Например, пептид, полипептид или белок может состоять из аминокислот, выбранных из 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, связанных друг с другом нормальной пептидной связью («классический» полипептид). Пептид, полипептид или белок может состоять из L-аминокислот и/или D-аминокислот. В частности, термины «пептид», «полипептид» и «белок» также включают «пептидомиметики», которые определяются как пептидные аналоги, содержащие непептидные структурные элементы, при этом такие пептиды способны имитировать или антагонизировать биологическое действие природного родительского пептида. У пептидомиметика отсутствуют характеристики классического пептида, такие как ферментативно расщепляемые пептидные связи. В частности, пептид, полипептид или белок может содержать аминокислоты, отличные от 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом, помимо этих аминокислот, или он может состоять из аминокислот, отличных от 20 аминокислот, определяемых генетическим кодом. В частности, пептид, полипептид или белок в контексте настоящего изобретения может в равной мере состоять из аминокислот, модифицируемых естественными процессами, такими как процессы посттрансляционного созревания, или химическими процессами, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Такие модификации

полностью подробно описаны в литературе. Эти модификации могут присутствовать в любом месте в полипептиде: в пептидном скелете, в аминокислотной цепи или даже на карбокси- или амино-концах. В частности, пептид или полипептид может быть разветвленным после убиквитинирования или быть циклическим с разветвлением или без. Этот тип модификации может быть результатом природных или синтетических посттрансляционных процессов, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. В частности, термины «пептид», «полипептид» или «белок» в контексте настоящего изобретения также включают модифицированные пептиды, полипептиды и белки. Например, пептидные, полипептидные или белковые модификации могут включать ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентную фиксацию нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентную фиксацию липида или липидного производного, ковалентную фиксацию фосфатидилинозитола, ковалентное или нековалентное перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, гликозилирование, включая пэгилирование, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристиолирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, сенолоилирование, сульфатацию, добавление аминокислоты, например аргинина, или убиквитинирование. Такие модификации полностью подробно описаны в литературе. (Proteins Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, New York (1993); Post-translational Covalent Modifications of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter, et al., Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182:626-46 (1990); и Rattan, et al., Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci 663:48-62(1992)). Соответственно, термины «пептид», «полипептид» и «белок» включают, например, липопептиды, липопротеины, гликопептиды, гликопротеины и т. п.

«Ортологи» белков, как правило, характеризуются наличием более чем 75 % идентичности последовательности, рассчитываемой при выравнивании на протяжении полной длины с аминокислотной последовательностью конкретного белка с использованием алгоритма выравнивая, например программы ALIGN (версия 2.0) с установленными параметрами по умолчанию. Белки с даже большим сходством с эталонной последовательностью демонстрируют 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 % идентичности последовательности. Помимо этого, идентичность последовательности можно сравнивать вдоль полной длины конкретных доменов описанных пептидов.

Термин «гомологичный» или «гомолог» относится к молекуле или активности,

встречающейся в клетке-, виде- или штамме-хозяине или получаемой от них. Например, гетерологичная или экзогенная молекула или гетерологичный или экзогенный ген, кодирующий молекулу, могут быть гомологичными молекуле или гену, который кодирует молекулу, нативных организма-хозяина или клетки-хозяина, но могут иметь измененные структуру, последовательность, уровень экспрессии или их комбинации.

В контексте данного документа «(поли)пептид» содержит одну цепь аминокислотных мономеров, соединенных пептидными связями, как объяснено выше. В контексте данного документа «белок» содержит один или более, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (поли)пептидов, т. е. одну или более цепей аминокислотных мономеров, связанных пептидными связями, как объяснено выше. В конкретных вариантах осуществления белок в соответствии с настоящим изобретением содержит 1, 2, 3 или 4 полипептида.

В контексте данного документа термины «нуклеиновая кислота», «молекула нуклеиновой кислоты», «последовательность нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются взаимозаменяемо и включают молекулы ДНК и молекулы РНК, включая, без ограничения, матричную РНК (мРНК), гибриды ДНК/РНК или синтетические нуклеиновые кислоты. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или частично или полностью двухцепочечной (дуплексной). Дуплексные нуклеиновые кислоты могут быть гомодуплексными или гетеродуплексными. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

В контексте данного документа подразумевается, что термин «кодирующая последовательность» относится к молекуле полинуклеотида, которая кодирует аминокислотную последовательность белкового продукта. Границы кодирующей последовательности в общем случае определяются открытой рамкой считывания, которая обычно начинается со стартового кодона АТГ.

В контексте данного документа термин «экспрессия» относится к любому этапу, касающемуся выработки полипептида, включая транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию, секрецию и т. п.

В контексте данного документа термин «вариант по последовательности» относится к любой последовательности, имеющей одно или более изменений по сравнению с эталонной последовательностью, при этом эталонная последовательность представляет собой любую из последовательностей, перечисленных в перечне последовательностей, т. е. от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 9. Таким образом, термин «вариант по последовательности» включает варианты по нуклеотидной последовательности и варианты по аминокислотной последовательности. В случае варианта по последовательности в контексте нуклеотидной

последовательности эталонная последовательность также представляет собой нуклеотидную последовательность, а в случае варианта по последовательности в контексте аминокислотной последовательности эталонная последовательность также представляет собой аминокислотную последовательность. В контексте данного документа «вариант по последовательности» является по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичным эталонной последовательности. Идентичность последовательности обычно рассчитывают в отношении полной длины эталонной последовательности (т. е. последовательности, приведенной в заявке), если не указано иное. Процент идентичности согласно данному документу можно определять, например, используя различные способы выравнивания, известные в данной области техники, такие как BLAST с использованием параметров по умолчанию, определенных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [матрица Blosum 62; штраф за открытие гэпа = 1 и штраф за продление гэпа = 1]. «Вариант по последовательности» в контексте последовательности нуклеиновой кислоты (нуклеотидной последовательности) имеет измененную последовательность, в которой один или более нуклеотидов в эталонной последовательности удалены или замещены, или же один или более нуклеотидов вставлены в последовательность эталонной нуклеотидной последовательности. Нуклеотиды обозначены в данном документе с помощью стандартного однобуквенного обозначения (A, C, G или T). Вследствие вырожденности генетического кода «вариант по последовательности» нуклеотидной последовательности может приводить к изменению в соответствующей эталонной аминокислотной последовательности, т. е. к «варианту по аминокислотной последовательности», или нет. В определенных вариантах осуществления варианты по нуклеотидной последовательности представляют собой варианты, которые не приводят к вариантам по аминокислотной последовательности (т. е. содержат молчащие мутации). При этом варианты по нуклеотидной последовательности, приводящие к «не молчащим» мутациям, также входят в объем, в частности, такие варианты по нуклеотидной последовательности, которые приводят к получению аминокислотной последовательности, являющейся по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичной с эталонной аминокислотной последовательностью. «Вариант по последовательности» в контексте аминокислотной последовательности имеет измененную последовательность, в которой удалены, замещены или вставлены одна или более аминокислот по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью. В результате изменений такой вариант по

последовательности имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 85 %, по меньшей мере на 90 %, по меньшей мере на 95 %, по меньшей мере на 98 % или по меньшей мере на 99 % идентичной эталонной аминокислотной последовательности. Например, на 100 аминокислот эталонной последовательности вариант по последовательности, имеющий не более 10 изменений, т. е. любую комбинацию делеций, вставок или замен, является «по меньшей мере на 90 % идентичным» эталонной последовательности.

Хотя возможны неконсервативные аминокислотные замены, в определенных вариантах осуществления замены представляю собой консервативные аминокислотные замены, при которых замещенная аминокислота имеет сходные структурные или химические свойства с соответствующей аминокислотой в эталонной последовательности. В качестве примера консервативные аминокислотные замены включают замену одной алифатической или гидрофобной аминокислоты, например аланина, валина, лейцина и изолейцина, другой; замену одной гидроксил-содержащей аминокислоты, например серина и треонина, другой; замену одного кислого остатка, например глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, другим; замещение одного амид-содержащего остатка, например аспарагина и глутамина, другим; замещение одного ароматического остатка, например фенилаланина и тирозина, другим; замещение одного основного остатка, например лизина, аргинина и гистидина, другим; и замещение одной небольшой аминокислоты, например аланина, серина, треонина, метионина и глицина, другой.

Вставки аминокислотной последовательности включают amino- и/или карбокси-концевые слияния, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают слияние с N- или C-концом аминокислотной последовательности с репортерной молекулой или ферментом.

Если не указано иное, изменения в вариантах по последовательности не устраняют функциональность соответствующей эталонной последовательности, например, в представленном случае, функциональность антигена или вектора, описанного в данном документе. Руководства по определению того, какие нуклеотиды и аминокислотные остатки, соответственно, можно замещать, вставлять или удалять без устранения такой функциональности, можно найти, используя компьютерные программы, известные в данной области техники.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть кодон-оптимизированными, например, кодоны могут быть оптимизированными для

использования в клетках человека. Например, таким образом можно изменять любую вирусную или бактериальную последовательность. Многие вирусы, включая ВИЧ и другие лентивирусы, используют большое количество редких кодонов, и за счет изменения этих кодонов так, чтобы они соответствовали кодонам, обычно используемым у необходимого субъекта, можно обеспечить повышенную экспрессию антигенов, как описано в André, S et al. (Increased Immune Response Elicited by DNA Vaccination with a Synthetic gp120 Sequence with Optimized Codon Usage. *J Virol.* 72, 1497-1503 (1998)).

В контексте данного документа последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, «полученная из» указанных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, относится к происхождению нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной последовательности, из которой она получена, или ее части, при этом «по существу идентичные» включает варианты по последовательности согласно определению выше. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного пептида или белка, получена из соответствующего домена в конкретном пептиде или белке. Следовательно, «соответствующая» относится, в частности, к такой же функциональности. Например, «внеклеточный домен» соответствует другому «внеклеточному домену» (другого белка), или «трансмембранный домен» соответствует другому «трансмембранному домену» (другого белка). «Соответствующие» части пептидов, белков и нуклеиновых кислот, следовательно, могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники. Аналогично, последовательности, «полученные из» других последовательностей, обычно могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники, как происходящие из этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из других нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может быть идентичной исходным нуклеиновой кислоте, пептиду, полипептиду или белку (из которых она получена). При этом последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, полученная из других нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может также иметь одну или более мутаций относительно исходных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которых она получена), в частности последовательность нуклеиновой кислоты или

аминокислотная последовательность, полученная из других нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, может представлять собой функциональный вариант по последовательности, описанный выше, исходных нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка (из которых она получена). Например, в пептиде/белке один или более аминокислотных остатков могут быть замещены другими аминокислотными остатками или могут присутствовать одна или более вставок или делеций аминокислотных остатков.

В контексте данного документа термин «мутация» относится к изменению в последовательности нуклеиновой кислоты и/или в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, например, соответствующей геномной последовательностью. Мутация, например по сравнению с геномной последовательностью, может представлять собой, например (встречающуюся в природе) соматическую мутацию, спонтанную мутацию, индуцированную мутацию, например, индуцированную ферментами, химическими веществами или излучением, или мутацию, обусловленную сайт-направленным мутагенозом (способы молекулярной биологии для создания специфических и преднамеренных изменений в последовательности нуклеиновой кислоты и/или аминокислотной последовательности). Таким образом, термины «мутация» или «мутирование» следует понимать как включающие также физическое создание мутации, например, в последовательности нуклеиновой кислоты или в аминокислотной последовательности. Мутация включает замену, делецию и вставку одного или более нуклеотидов или одной или более аминокислот, а также инверсию нескольких последовательных нуклеотидов или аминокислот. Некоторые типы мутаций кодирующей последовательности включают точечные мутации (различия в отдельных нуклеотидах или аминокислотах); молчащие мутации (различия в нуклеотидах, которые не приводят к аминокислотным изменениям); делеции (различия, при которых отсутствуют один или более нуклеотидов или одна или более аминокислот, вплоть до и включительно с делецией всей кодирующей последовательности гена); мутации со сдвигом рамки (различия, при которых делеция числа нуклеотидов, не делящегося на 3, приводит к изменению аминокислотной последовательности). Мутацию, которая приводит к различию в аминокислотах, также можно назвать мутацией аминокислотной замены. Мутации аминокислотных замен можно описать аминокислотным изменением относительно дикого типа в конкретной позиции в аминокислотной последовательности. Для обеспечения мутации в аминокислотной последовательности можно вносить мутацию в нуклеотидную последовательность, кодирующую указанную аминокислотную последовательность, с целью экспрессии (рекомбинантного) мутированного полипептида. Мутацию можно

обеспечить, например, путем изменения, например путем сайт-направленного мутагенеза, кодона молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующего одну аминокислоту, для получения кодона, кодирующего отличную аминокислоту, или путем синтеза варианта по последовательности, например, зная нуклеотидную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, и путем разработки синтеза молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида, без необходимости мутации одного или более нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты.

В контексте данного документа термин «рекомбинантный» (например, рекомбинантный белок, рекомбинантная нуклеиновая кислота, рекомбинантное антитело и т. д.) относится к любой молекуле (например, нуклеиновой кислоте, антителу и т. д.), которая получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантными способами и которая не встречается в природе. В отношении нуклеиновой кислоты или полипептида «рекомбинантный» относится к такому, который имеет последовательность, которая не встречается в природе, или имеет последовательность, которая создана путем искусственной комбинации двух или более в ином случае разделенных сегментов последовательности, например, CMV-вектору, содержащему гетерологичный антиген. Эту искусственную комбинацию часто осуществляют путем химического синтеза или, что более распространено, искусственной манипуляции с выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, с помощью технологий генной инженерии. Рекомбинантный полипептид также может относиться к полипептиду, который был создан с использованием рекомбинантных нуклеиновых кислот, включая рекомбинантные нуклеиновые кислоты, перенесенные в организм-хозяин, который не является естественным источником полипептида (например, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды, который образуют CMV-вектор, содержащий гетерологичный антиген).

В контексте данного документа термин «вектор» относится к носителю, в который можно включать молекулы нуклеиновых кислот с конкретной последовательностью, а затем вносить в клетку-хозяина, тем самым получая трансформированную клетку-хозяина. Вектор может содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют ему реплицироваться в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может содержать один или более генов селективных маркеров и другие генетические элементы, известные в данной области техники, включая промоторные элементы, которые управляют экспрессией нуклеиновых кислот. Векторы могут представлять собой вирусные векторы, такие как CMV-векторы. Вирусные векторы можно конструировать из вирусов дикого типа или аттенуированных вирусов, включая дефектный по репликации вирус.

В контексте использования в данном документе термина «функционально связанный», первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты размещена таким образом, чтобы она имела эффект на вторую последовательность нуклеиновой кислоты. Функционально связанные последовательности ДНК могут быть непрерывными или же могут функционировать на расстоянии.

В контексте данного документа термин «промотор» может относиться в любому числу регуляторных последовательностей нуклеиновых кислот, которые управляют транскрипцией нуклеиновой кислоты. Как правило, эукариотический промотор содержит необходимые последовательности нуклеиновой кислоты вблизи сайта инициации транскрипции, такие как, в случае промотора типа полимеразы II, ТАТА-элемент, или любую другую последовательность ДНК, которая распознается одним или более транскрипционными факторами. Экспрессию промотором можно дополнительно модулировать с помощью энхансерных или репрессорных элементов. Многочисленные примеры промоторов доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники. Нуклеиновая кислота, содержащая промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, может называться экспрессионным вектором.

В контексте данного документа термины «клетка», «линия клеток» и «культура клеток» используются взаимозаменяемо, при этом все такие обозначения включают потомство. Таким образом, слова «трансформанты» и «трансформированные клетки» включают первичную рассматриваемую клетку и полученные от нее культуры вне зависимости от числа переносов. Также понятно, что все потомство может не быть точно идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Включено вариантное потомство, которое обладает такой же самой функцией или биологической активностью, что и отобранная первоначально трансформированная клетка. То, что предусмотрены различные обозначения, будет ясно из контекста.

В контексте данного документа термин «миРНК» относится к основному классу биомолекул, участвующих в регуляции генной экспрессии. Например, в сердце, печени или головном мозге человека миРНК играют роль в тканевой спецификации или определении клеточной линии дифференцировки. Кроме того, миРНК влияют на ряд процессов, включая раннее развитие, клеточную пролиферацию и клеточную гибель, а также апоптоз и метаболизм жиров. Большое число геном миРНК, разнообразные профили экспрессии и распространенность потенциальных мишеней миРНК позволяют предположить, что миРНК могут быть существенным источником генетического разнообразия. Зрелая миРНК,

как правило, представляет собой некодирующую РНК из 8–25 нуклеотидов, которая регулирует экспрессию мРНК, включая последовательности, комплементарные миРНК. Известно, что эти малые молекулы РНК контролируют генную экспрессию за счет регуляции стабильности и/или трансляции мРНК. Например, миРНК связываются с 3' НТО целевых мРНК и подавляют трансляцию. миРНК также могут связываться с целевыми мРНК и опосредовать сайленсинг генов посредством пути РНКи. миРНК также могут регулировать генную экспрессию за счет инициации конденсации хроматина.

миРНК обуславливает сайленсинг трансляции одной или более конкретных молекул мРНК за счет связывания с элементом распознавания миРНК (ЭРМ), который определяется как любая последовательность, которая непосредственно подвергается спариванию оснований и взаимодействует с миРНК в каком-либо участке мРНК-транскрипта. Часто ЭРМ находится в 3' нетранслируемой области (НТО) мРНК, но также может присутствовать в кодирующей последовательности или в 5' НТО. ЭРМ не обязательно идеально комплементарны миРНК, обычно они содержат всего несколько оснований, комплементарных с миРНК, и часто содержат одно или более несовпадений в основаниях комплементарности. ЭРМ могут представлять собой любую последовательность, которую миРНК может связывать в достаточной степени, чтобы подавлять трансляцию гена, с которым ЭРМ функционально связан (такого как ген CMV, который важен для роста *in vivo* или способствует ему), за счет механизма сайленсинга миРНК, такого как RISC.

В контексте данного документа термин «вакцина», как правило, понимается как профилактический или терапевтический материал, обеспечивающий по меньшей мере один антиген или иммуноген. Антиген или иммуноген могут быть получены из любого материала, который подходит для вакцинации. Например, антиген или иммуноген могут быть получены из патогена, например из бактериальных или вирусных частиц и т. д., или из опухолевой или раковой ткани. Антиген или иммуноген стимулирует адаптивную иммунную систему организма для обеспечения адаптивного иммунного ответа. В частности, «антиген» или «иммуноген», как правило, относится к веществу, которое может распознаваться иммунной системой (например, адаптивной иммунной системой) и которое способно инициировать антиген-специфический иммунный ответ, например, путем образования антител и/или антиген-специфических Т-клеток как части адаптивного иммунного ответа. Как правило, антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, который ГКГС может презентировать Т-клеткам. Вакцины можно использовать профилактически или терапевтически. Таким образом, вакцины можно использовать для снижения вероятности развития заболевания (такого как опухоль или патологическая инфекция) или для снижения тяжести симптомов заболевания или

патологического состояния, ограничения прогрессирования заболевания или патологического состояния (такого как опухоль или патологическая инфекция) или ограничения повторного появления заболевания или патологического состояния (такого как опухоль). В конкретных вариантах осуществления вакцина содержит дефицитный по репликации CMV, экспрессирующий гетерологичный антиген, такой как антиген ВИЧ.

В контексте данного документа термины «антиген» или «иммуноген» используются взаимозаменяемо для обозначения вещества, так правило белка, которое способно индуцировать иммунный ответ у субъекта. Этот термин также относится к белкам, которые являются иммуногенно активными в том смысле, что после введения субъекту (непосредственно или путем введения субъекту нуклеотидной последовательности или вектора, которые кодируют белок) белок способен вызывать иммунный ответ гуморального и/или клеточного типа направленный против этого белка.

В контексте данного документа термин «гетерологичный антиген» относится к любому белку или его фрагменту, который не получен из CMV. Гетерологичные антигены могут представлять собой патоген-специфические антигены, опухолевые вирусные антигены, опухолевые антигены, собственные антигены клетки-хозяина или любой другой антиген.

В контексте данного документа «антиген-специфическая Т-клетка» относится к CD8⁺ или CD4⁺ лимфоциту, который распознает конкретный антиген. В общем случае антиген-специфические Т-клетки специфически связываются с конкретным антигеном, презентруемым молекулами ГКГС, но не с другими антигенами, презентруемыми тем же ГКГС.

В контексте данного документа «иммуногенный пептид» относится к пептиду, который содержит аллель-специфический мотив или другую последовательность, такую как N-концевой повтор, так, чтобы пептид связывался с молекулой ГКГС и индуцировал ответ цитотоксических Т-лимфоцитов («ЦТЛ») или ответ В-клеток (например, выработку антител) против антигена, из которого получен иммуногенный пептид. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные пептиды идентифицируют, используя мотивы последовательностей или другие способы, такие как нейросетевые или полиномиальные определения, известные в данной области техники. Как правило, алгоритмы используют для определения «порога связывания» пептидов, чтобы выбрать имеющие оценки, которые обеспечивают им высокую вероятность связывания с определенной аффинностью и иммуногенности. Эти алгоритмы основаны на действии на связывание ГКГК конкретной аминокислоты в конкретной позиции, действии на связывании антителом конкретной аминокислоты в конкретной позиции или действии на связывание конкретной замены в

содержащем мотив пептиде. В контексте иммуногенного пептида «консервативный остаток» представляет собой такой, который встречается со значительно большей частотой, чем ожидалось бы при случайном распределении в конкретной позиции в пептиде. В некоторых вариантах осуществления консервативный остаток представляет собой такой, где структура ГКГС может обеспечить точку контакта с иммуногенным пептидом.

В контексте данного документа термин «введение» означает предоставлять или давать субъекту агент, такой как композиция, содержащая эффективное количество CMV-вектора, содержащего экзогенный антиген, любым эффективным путем. Типовые пути введения включают, но не ограничиваются этим, инъекционный (такой как подкожный, внутримышечный, интрадермальный, внутрибрюшинный и внутривенный), пероральный, подъязычный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути.

В контексте данного документа применяемый «фармацевтически приемлемый носитель» является традиционным. В Remington's Pharmaceutical Sciences авторства E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition, 1995, описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки описанных в данном документе композиций. В общем, 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 солевой раствор, сбалансированные растворы солей, буферы, водный раствор декстрозы, глицерин и т. п., в качестве носителя. В случае твердых композиций (таких как, в форме порошков, пилюль, таблеток или капсул) традиционные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит, лактозу, крахмал или стеарат магния фармацевтической степени чистоты. Помимо биологически нейтральных носителей предназначенные для введения фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты и pH-буферные агенты и т. п., например ацетат натрия или сорбитанмонолаурат.

Дозы часто выражают по отношению к массе тела. Таким образом, доза, выраженная как [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и т. д.) обычно относится к [г, мг или другой единице] «на кг (или г, мг и т. д.) массы тела», даже если термин «масса тела» явным образом не упомянут.

Дозы могут быть выражены в фокусообразующих единицах (ФОЕ) на мл по определению в анализе фокусообразования, в котором подсчитывают участки (фокусы) цитопатического действия, которые указывают на репликацию вируса на газоне из клеток.

В контексте данного документа подразумевается, что термин «заболевание» в общем случае является синонимом и используется взаимозаменяемо с терминами «нарушение» и «патологическое состояние» (как в случае медицинского состояния) в том, что все они отображают аномальное состояние организма человека или животного или одной из его частей, которое нарушает нормальное функционирование, как правило, проявляется в виде различных признаков и симптомов, и приводит к снижению продолжительности или качества жизни человека или животного.

АНТИГЕНЫ

Слитые антигены HIV

В данном документе описаны слитые белки, содержащие антигены HIV, и кодирующие их нуклеиновые кислоты.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, содержащий одно или более из HIV Gag, HIV Nef и HIV Pol или их частей. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген содержит аминокислотную последовательность, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген содержит аминокислоты 2–912 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген содержит аминокислоты 2–911 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген состоит из аминокислот 2–912 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления слитый антиген

состоит из аминокислот 2–911 аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитые белки, описанные выше, например, молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая слитый белок, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, состоящая из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, состоящая из последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены векторы, кодирующие слитый белок, описанный выше. Например, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен вектор, кодирующий слитый белок, при этом слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен вектор, кодирующий слитый белок, при этом слитый белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен вектор,

кодирующий слитый белок, при этом слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен вектор, кодирующий слитый белок, при этом слитый белок состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4.

Вектор может представлять собой любой экспрессионный вектор, известный в данной области техники. В случае предназначенных для экспрессии антигенов кодирующая белок последовательность слитого белка должна быть «функционально связанной» с регуляторными или контрольными последовательностями нуклеиновой кислоты, которые управляют транскрипцией и трансляцией белка. Говорят, что кодирующая последовательность и контрольная последовательность нуклеиновой кислоты или промотор «функционально связаны», когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности находилась под влиянием или управлением контрольной последовательности нуклеиновой кислоты. «Контрольная последовательность нуклеиновой кислоты» может представлять собой любой элемент нуклеиновой кислоты, такой как, но не ограничиваясь этим, промоторы, энхансеры, IRES, интроны и другие элементы, описанные в данном документе, которые управляют экспрессией последовательности нуклеиновой кислоты или кодирующей последовательности, функционально связанной с ними. «Промотор» относится к группе модулей транскрипционного контроля, которые кластеризованы вокруг сайта инициации для РНК-полимеразы II и, когда они функционально связаны с кодирующими белок последовательностями по изобретению, приводят к экспрессии кодируемого белка. Экспрессия гетерологичных антигенов и слитых белков по настоящему изобретению может находиться под управлением конститутивного промотора или индуцибельного промотора, который иницирует транскрипцию только при воздействии некоторых конкретных внешних стимулов, таких как, без ограничения, антибиотики, такие как тетрациклин, гормоны, такие как экдизон, или тяжелые металлы. Промотор также может быть специфическим в отношении конкретного типа клеток, тканей или органов. Многие подходящие промоторы и энхансеры известны в данной области техники, и при этом любой такой подходящий промотор или энхансер можно использовать для экспрессии трансгенов по изобретению. Например, подходящие промоторы и/или энхансеры можно выбрать из базы данных эукариотических промоторов (EPDB).

В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой плазмиду, бактериальный вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, например, на основе поксвируса, аденовируса, вируса краснухи, вируса Сендай, вируса бешенства, альфавируса,

вируса герпеса или аденоассоциированного вируса. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой CMV-вектор, например, RhCMV- или HCMV-вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий слитый белок, представляет собой рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы генерации иммунного ответа на HIV или предотвращения или лечения HIV у субъекта, включающие введение вектора, кодирующего слитый белок, описанный выше.

В настоящем изобретении также предложены вакцины, содержащие РНК или белки на основе слитого белка, описанного выше, и их применение в способах генерации иммунного ответа на HIV или предотвращения или лечения HIV у субъекта.

Другие антигены

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген, кодируемый HCMV-вектором, описанным в данном документе, представляет собой патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, опухолеспецифический антиген или собственный антиген хозяина.

Патоген-специфический антиген может быть получен, например, из вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса простого герпеса типа 1, вируса простого герпеса типа 2, вируса гепатита В, вируса гепатита С, папилломавируса, паразитов Plasmodium, Clostridium tetani или Mycobacterium tuberculosis.

В некоторых вариантах осуществления патоген-специфический антиген содержит HIV Env, HIV Tat, HIV Rev, HIV Vif, HIV Vpr, HIV Gag, HIV Nef или HIV Pol. В некоторых вариантах осуществления патоген-специфический антиген содержит слитый белок, содержащий два или более из HIV Env, HIV Tat, HIV Rev, HIV Vif, HIV Vpr, HIV Gag, HIV Nef и HIV Pol. В некоторых вариантах осуществления патоген-специфический антиген содержит антиген HIV Gag, HIV Nef или HIV Pol. Например, антиген может представлять собой последовательность любого антигена HIV или его слитого белка, описанную в публикации международной заявки № WO2016/054654A1, которая включена в данный документ посредством ссылки в отношении информации, связанной с антигенами HIV.

В некоторых вариантах осуществления патоген-специфический антиген содержит антиген Mycobacterium tuberculosis. В некоторых вариантах осуществления патоген-специфический антиген содержит слитый белок, содержащий два или более антигенов Mycobacterium tuberculosis. Например, антиген может представлять собой любой антиген или его слитый белок, описанный в публикации международной заявки № WO2017/223146A1, которая включена в данный документ посредством ссылки в отношении информации, связанной с антигенами Mycobacterium tuberculosis. В некоторых

вариантах осуществления патоген-специфический антиген представляет собой Ag85A-Ag85B-Rv3407, Rv1733-Rv2626c, RpfA-RpfC-RpfD, Ag85B-ESAT6 или Ag85A-ESAT6-Rv3407-Rv2626c-RpfA-RpfD.

Опухолевые антигены относительно ограничены опухолевыми клетками и могут представлять собой любой белок, который индуцирует иммунный ответ. При этом многие опухолевые антигены являются белками хозяина (собственными) и, следовательно, как правило, не воспринимаются как антигенные иммунной системой хозяина. Опухолевые антигены также могут аномально экспрессироваться раковыми клетками. Опухолевые антигены также могут представлять собой антигены зародышевой линии/тестикулярные антигены, экспрессируемые в раковых клетках, антигены клеточных линий дифференцировки, не экспрессируемые во взрослой ткани, или антигены, сверхэкспрессируемые в раковых клетках. Опухолевые антигены включают, но не ограничиваются этим: простатическую кислую фосфатазу (PAP); супрессорный белок опухоли Вильмса (WT1); мезотелин (MSLN); Her-2 (HER2); антиген вируса папилломы человека Е6 штамма HPV16; антиген вируса папилломы человека Е7 штамма HPV16; антиген вируса папилломы человека Е6 штамма HPV18; антиген вируса папилломы человека Е7 штамма HPV18; слитый белок вируса папилломы человека Е6 и Е7 из HPV16 и HPV18; муцин 1 (MUC1); LMP2; рецептор эпидермального фактора роста (EGFR); p53; антиген нью-йоркской карциномы пищевода 1 (NY-ESO-1); простат-специфический мембранный антиген (PSMA); GD2, карциноэмбриональный антиген (CEA); антиген меланомы/антиген меланомы 1, распознаваемый Т-клетками (MelanA/MART1); Ras; gp100, протеиназу 3 (PR1), Vcr-abl; сурвивин; простат-специфический антиген (PSA); обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT); EphA2; ML-IAP; альфа-фетопротеин (AFP); EpCAM; ERG; NA17; PAX3; ALK; андрогеновый рецептор (AR); циклин B1; MYCN; RhoC; тирозин-подобный белок 2 (TRP-2); GD3; фукозил GM1; PSCA; sLe(a); CYP1B1; PLCA1; GM3; BORIS; Tn; GloboH; Ets вариантный ген б/ген острого миелоидного лейкоза 1 ETS (ETV6-AML); NY-BR-1; RGS5; антиген отторжения плоскоклеточной опухоли 3 (SART3); STn; угольную ангидразу IX; PAX5; OY-TES1; белок спермиев 17; LCK; HMWMAA; AKAP-4; SSX2; B7H3; легумин; Tie 2; Page4; VEGFR2; MAD-CT-1; FAP; PDGFR; MAD-CT-2; Fos-подобный антиген 1; TAG-72; 9D7; EphA3; теломеразу; SAP-1; семейство BAGE; семейство CAGE; семейство GAGE; семейство MAGE; семейство SAGE; семейство XAGE; предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME); рецептор меланокортина 1 (MC1R); β -катенин; BRCA1/2; CDK4; антиген хронического миелоидного лейкоза бб (CML66); и TGF- β . В определенных вариантах осуществления собственные антигены хозяина включают простатическую кислую фосфатазу, супрессорный белок опухоли

Вильмса, мезотелин или Her-2.

В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген получен из рака. Виды рака включают, но не ограничиваются этим, следующие: острый лимфобластный лейкоз; острый миелоидный лейкоз; аденокарцинома; связанные со СПИДом виды рака; связанная со СПИДом лимфома; рак анального канала; рак аппендикса; астроцитомы, детская мозжечковая или мозговая; базальноклеточная карцинома; рак желчных протоков, внепеченочный; рак мочевого пузыря; рак костей, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома; глиома ствола головного мозга; опухоль головного мозга; опухоль головного мозга, астроцитомы мозжечка; опухоль головного мозга, астроцитомы мозжечка/злокачественная глиома; опухоль головного мозга, эпендимомы; опухоль головного мозга, медуллобластома; опухоль головного мозга, супратенториальный примитивный нейроэктодермальный опухоли; опухоль головного мозга, глиома зрительного пути и гипоталамуса; рак молочной железы; бронхиальные аденомы/карциноидные опухоли; лимфома Беркитта; карциноидная опухоль, детская; карциноидная опухоль, желудочно-кишечная; карцинома неизвестного происхождения; лимфома центральной нервной системы, первичная; астроцитомы мозжечка, детская; астроцитомы мозга/злокачественная глиома, детская; рак шейки матки; детские виды рака; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелогенный лейкоз; хронические миелолиферативные нарушения; рак толстой кишки; кожная Т-клеточная лимфома; десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль; рак эндометрия; эпендимомы; рак пищевода; саркома Юинга из семейства опухолей Юинга; экстракраниальная герминогенная опухоль, детская; внегонадная герминогенная опухоль; рак внепеченочных желчных протоков; рак глаза, интраокулярная меланома; рак глаза, ретинобластома; рак желчного пузыря; рак желудка; желудочно-кишечная карциноидная опухоль; желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО); герминогенная опухоль: внечерепная, внегонадная или яичника; гестационная трофобластическая опухоль; глиома ствола головного мозга; глиома, детская астроцитомы головного мозга; глиома, детская, зрительного пути и гипоталамуса; карциноидная опухоль желудка; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; рак сердца; гепатоцеллюлярный (печеночный) рак; лимфома Ходжкина; гипофарингеальный рак; глиома гипоталамуса и зрительного пути, детская; интраокулярная меланома; карцинома из островковых клеток (эндокринная, поджелудочной железы); саркома Капоши; рак почки (почечно-клеточный рак); рак гортани; лейкозы; лейкоз, острый лимфобластный (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом); лейкоз, острый миелоидный (также называемый острым миелогенным лейкозом); лейкоз, хронический лимфоцитарный (также называемый

хроническим лимфоцитарным лейкозом); лейкоз, хронический миелогенный (также называемый хроническим миелогенным лейкозом); лейкоз, волосатоклеточный; рак губы и ротовой полости; рак печени (первичный); рак легкого, немелкоклеточный; рак легкого, мелкоклеточный; лимфомы; лимфома, связанная со СПИДом; лимфома, Беркитта; лимфома, кожная Т-клеточная; лимфома, Ходжкина; лимфомы, неходжкинские (старая классификация всех лимфом, за исключением лимфомы Ходжкина); лимфома, первичная, центральной нервной системы; Маркуса Уиттла, смертельное заболевание; макроглобулинемия, Вальденстрема; злокачественная фиброзная гистиоцитома костей/остеосаркома; медуллобластома, детская; меланома; меланома, интраокулярная (глаза); карцинома из клеток Меркеля; мезотелиома взрослых, злокачественная; мезотелиома, детская; метастатический плоскоклеточный рак шеи, неопределяемый первично; рак ротовой полости; синдром множественной эндокринной неоплазии, детский; множественная миелома/новообразование из плазматических клеток; фунгоидный микоз; миелодиспластические синдромы; миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания; миелогенный лейкоз, хронический; миелоидный лейкоз взрослых, острый; миелоидный лейкоз, детский, острый; миелома, множественная (рак костного мозга); миелопролиферативные нарушения, хронические; рак носовой полости и придаточных пазух носа; носоглоточная карцинома; нейробластома; неходжкинская лимфома; немелкоклеточный рак легкого; рак ротовой полости; рак ротоглотки; остеосаркома/ злокачественная фиброзная гистиоцитома костей; рак яичника; эпителиальный рак яичника (поверхностная эпителиально-стромальная опухоль); герминогенная опухоль яичника; пограничная опухоль яичника; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной железы, из островковых клеток; рак придаточных пазух носа и носовой полости; рак парашитовидной железы; рак полового члена; рак глотки; феохромоцитома; астроцитомы полового члена; герминома полового члена; пинеобластома и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, детские; аденома гипофиза; новообразование из плазматических клеток/множественная миелома; плевроролечная бластома; первичная лимфома центральной нервной системы; рак предстательной железы; ректальный рак; почечно-клеточная карцинома (рак почки); рак почечной лоханки и мочеточника из переходных клеток; ретинобластома; рабдомиосаркома, детская; рак слюнных желез; саркома, семейство опухолей Юинга; саркома, Капоши; саркома, мягких тканей; саркома, матки; синдром Сезари; рак кожи (не меланома); рак кожи (меланома); карцинома кожи, из клеток Меркеля; мелкоклеточный рак легкого; рак тонкой кишки; саркома мягких тканей; плоскоклеточная карцинома — смотрите рак кожи (не меланома); плоскоклеточный рак шеи неопределяемый первично, метастатический; рак желудка; супратенториальная

примитивная нейроэктодермальная опухоль, детская; Т-клеточная лимфома, кожная (фунгоидный микоз и синдром Сезари); рак яичка; рак горла; тимома, детская; тимома и рак вилочковой железы; рак щитовидной железы; рак щитовидной железы, детский; рак почечной лоханки и мочеточника из переходных клеток; трофобластическая опухоль, гестационная; карцинома взрослых с неизвестной первичной локализацией; детский рак с неизвестной первичной локализацией; рак почечной лоханки и мочеточника, из переходных клеток; рак уретры; рак матки, эндометриальный; саркома матки; рак влагалища; глиома зрительного пути и гипоталамуса, детская; рак вульвы; макроглобулинемия Вальденстрема; и опухоль Вильмса (рак почки).

В некоторых вариантах осуществления собственный антиген хозяина получен из вариабельной области Т-клеточного рецептора (TCR) или получен из вариабельной области В-клеточного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления антиген может являться подходящим для использования в вакцине или иммунологических композициях (например, Медицинский словарь Стедмана (24-ое издание, 1982, например, определение вакцины (для перечня антигенов, используемых в вакцинных составах)); можно использовать такие антигены или представляющие интерес эпитопы из этих антигенов. Специалист в данной области техники может выбрать антиген и кодирующую его ДНК на основании известных аминокислотной и соответствующей ДНК-последовательностей пептида или полипептида, а также на основании природы конкретных аминокислот (например, размера, заряда и т. д.) и словаря кодонов.

Один из способов определения Т-эпитопов антигена включает картирование эпитопов. Перекрывающиеся пептиды опухолевого антигена создают посредством олигопептидного синтеза. Отдельные пептиды затем тестируют в отношении их способности индуцировать активацию Т-клеток. Этот подход был исключительно полезным при картировании эпитопов Т-клеток, поскольку Т-клетка распознает короткие линейные пептиды, образующие комплекс с молекулами ГКГС.

CMV-ВЕКТОРЫ

В данном документе описаны рекомбинантные CMV-векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор представляет собой или получен из HCMV TR3. В контексте данного документа «HCMV TR3» или «TR3» относится к векторному остову HCMV-TR3, полученному из клинического изолята HCMV TR, как описано в Caposio, P et al. (Characterization of a live attenuated HCMV-based vaccine platform. Scientific Reports 9, 19236 (2019)).

Как описано в данном документе, рекомбинантные CMV-векторы можно характеризовать присутствием или отсутствием одного или более генов CMV. CMV-векторы также можно характеризовать присутствием или отсутствием одного или более белков, кодируемых одним или более генами CMV. Белок, кодируемый геном CMV, может отсутствовать из-за наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ген CMV. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать ортолог или гомолог гена CMV. Примеры генов CMV включают, но не ограничиваются этим, UL82, UL128, UL130, UL146, UL147, UL18 и UL78.

Ген UL82 цитомегаловируса человека кодирует pp71, белок, который локализован в наружном домене вирусной частицы. Например, ген UL82 штамма CMV TR составляет от 118811 до 120490 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Pp71 может осуществлять одну или более функций, включая ингибирование репрессии Дахх транскрипции вирусного гена, негативную регуляцию STING и уклонение от клеточных противовирусных ответов (Kalejta RF, et al. Expanding the Known Functional Repertoire of the Human Cytomegalovirus pp71 Protein. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Mar 12;10:95). Удаление UL82 или разрушение UL82 путем вставки чужеродного гена в локус UL82 приводит к отсутствию белка pp71 и, следовательно, снижает репликацию в фибробластах, эндотелиальных клетках, эпителиальных клетках и астроцитах (Carosio P et al., Characterization of a live-attenuated HCMV-based vaccine platform. *Sci Rep.* 2019 Dec 17;9(1):19236). Эффекты делеции или разрушения UL82 обратимы с помощью ингибиторов клеточных киназ. Ген цитомегаловируса макака-резус (RhCMV) RhCMV 110 гомологичен CMV UL82 человека (Hansen SG, et al. Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J Virol.* 2003 Jun;77(12):6620-36).

Гены цитомегаловируса человека UL128 и UL130 кодируют структурные компоненты вирусной оболочки (Patrone, M et al. Human cytomegalovirus UL130 protein promotes endothelial cell infection through a producer cell modification of the virion. *J Virol.* 79(13):8361-73 (2005); Ryckman, BJ et al. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. *J Virol.* 82(1):60-70 (2008); Wang, D et al. Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(50):18153-8 (2005)). Например, ген UL128 штамма CMV TR составляет от 176206 до 176964 для номера доступа GenBank № KF021605.1, а ген UL130 штамма CMV TR составляет от 177004 до 177648 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Гены цитомегаловируса человека UL146 и UL147 кодируют хемокины CXC vCXC-1 и vCXC-2, соответственно (Penfold, ME et al. Cytomegalovirus encodes a potent alpha

chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(17):9839-44 (1999)). Например, ген UL146 штамма CMV TR составляет от 180954 до 181307 для номера доступа GenBank № KF021605.1, а ген UL147 штамма CMV TR составляет от 180410 до 180889 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Ген цитомегаловируса человека UL18 кодирует мембранный гликопротеин типа I, который ассоциирует с β 2-микроглобулином и может связывать эндогенные пептиды (Park, B et al. Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent peptide loading and optimization of the MHC class I peptide cargo for immune evasion. *Immunity.* 20(1):71-85 (2004); Browne, H et al. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and beta 2 microglobulin. *Nature.* 347(6295):770-2 (1990); Fahnestock, ML et al. The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity.* 3(5):583-90 (1995)). Например, ген UL18 штамма CMV TR составляет от 24005 до 25111 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

Ген цитомегаловируса человека UL78 кодирует предполагаемый сопряженный с протеином G рецептор (Chee, MS et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1154:125-69 (1990)) и также может играть роль в репликации вируса (Michel, D et al. The human cytomegalovirus UL78 gene is highly conserved among clinical isolates, but is dispensable for replication in fibroblasts and a renal artery organ-culture system. *J Gen Virol.* 86(Pt 2):297-306 (2005)). Например, ген UL78 штамма CMV TR составляет от 114247 до 115542 для номера доступа GenBank № KF021605.1.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортолог. В некоторых вариантах осуществления CMV-вектор также является дефицитным в отношении одного или более из UL18, UL78 и UL82 и их ортологов вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL78 или UL82 или их ортолог. В некоторых вариантах осуществления CMV-вектор также является дефицитным в отношении US11 и его ортологов вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей US11 или его ортолог. В вышеупомянутых вариантах осуществления мутация или мутации могут представлять собой мутацию, которая приводит к отсутствию экспрессии активных белков. Такие мутации включают, например, точечные мутации, мутации со сдвигом рамки, делеции менее чем всей последовательности, которая кодирует белок (мутации усечения), или

делеции всей последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) также экспрессирует UL40 и US28 или их ортологи.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL82, UL128, UL130, UL146 и UL147 или их ортологи. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор также является дефицитным в отношении UL18 вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL78, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL78, UL128, UL130, UL146 и UL147 или их ортологи. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор также является дефицитным в отношении UL18 вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) не экспрессирует UL78, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи вследствие наличия мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL78, UL82, UL128, UL130, UL146 и UL147 или их ортологи.

Затруднением для производства HCMV-векторов, имеющих необходимые свойства для вакцин, является то, что векторы часто разрабатывают так, чтобы они имели сниженные вирусные репликацию или рост. Например, некоторые HCMV-HIV векторы для живой аттенуированной вакцины конструируют так, чтобы они были дефицитными по росту, путем делеции гена UL82 HCMV (который кодирует покровный белок pp71), что приводит к низкому вирусному выходу. pp71 важен для инфекции HCMV дикого типа, поскольку его покровный белок транслоцируется в ядро, где он подавляет клеточную функцию Daхх, таким образом обеспечивая возможность немедленно-ранней (НР) экспрессии гена CMV, которая инициирует цикл репликации. Некоторые процессы производства основаны на функциональном дополнении с использованием временной трансфекции клеток MRC-5 миРНК, нацеленной на Daхх, что имитирует одну из функций HCMV pp71. Другим подходом является использование трансфекции мРНК, кодирующей pp71, чтобы клетка-

хозяйин могла экспрессировать важный вирусный ген. Трансфекция мРНК для экспрессии важного вирусного гена может быть способна обеспечить все функции гена, которые вероятно усилят инфекционный процесс, такие как стимуляция клеточного цикла, эффективная упаковка вирионов и стабильности вируса. Кроме того, белок, присутствующий на поздней стадии инфекции, потенциально может быть упакован в вирусное потомство, что может снизить необходимую дозу вакцины за счет более эффективной инфекции в первом раунде и развития персистентной инфекции. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ получения рекомбинантного CMV-вирусного вектора, включающий: (a) внесение в клетку мРНК, кодирующей белок pp71; (b) инфицирование клетки рекомбинантным CMV; (c) инкубацию клетки; и (d) сбор рекомбинантного CMV-вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую белок pp71, доставляют в клетку, используя трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку MRC-5. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV представляет собой рекомбинантный HCMV, описанный в данном документе (например, рекомбинантный HCMV-вектор, полученный из остова TR3). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV и рекомбинантный CMV-вирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный патоген-специфический антиген, такой как антиген вируса иммунодефицита человека (HIV), описанный в данном документе. CMV-вирусный вектор, полученный таким способом, также входит в объем изобретения.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (миРНК) (ЭРМ). В некоторых вариантах осуществления HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, который содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках. Примерами миРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках, являются miR126, miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 и miR-328. В некоторых вариантах осуществления HCMV-вектор не содержит UL18, UL128, UL130, UL146 и UL147 (и, необязательно, UL82) и экспрессирует UL40 и US28, а ЭРМ содержит целевые сайты для микроРНК, экспрессируемых в эндотелиальных клетках.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный CMV-вектор (например, рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, который содержит целевые сайты для

микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках. Примерами микроРНК, экспрессируемых в миелоидных клетках, являются miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR-146a, miR-132, miR-21, miR-124 и miR-125.

ЭРМ, которые могут быть включены в рекомбинантный CMV-вектор, описанный в данном документе, могут представлять собой любой элемент распознавания микроРНК, который обеспечивает сайленсинг экспрессии в присутствии микроРНК, экспрессируемой эндотелиальными клетками, или любой элемент распознавания микроРНК, который обеспечивает сайленсинг экспрессии в присутствии микроРНК, экспрессируемой миелоидными клетками. Такой ЭРМ может быть полностью комплементарным микроРНК. В альтернативном варианте для заданной микроРНК можно использовать другие последовательности в качестве ЭРМ. Например, ЭРМ можно спрогнозировать из последовательностей с использованием общедоступных баз данных. В одном примере можно проводить поиск микроРНК на веб-сайте microRNA.org (www.microgna.org). В свою очередь, будет приведен перечень микроРНК-мишеней микроРНК. Для каждой перечисленной на странице мишени можно получить доступ к «подробностям выравнивания» и доступ к предположительным ЭРМ. Специалист в данной области техники может выбрать валидированную, предположительную или мутированную последовательность ЭРМ из литературы, которая прогнозируемо будет индуцировать сайленсинг в присутствии микроРНК, экспрессируемой в миелоидных клетках, таких как макрофаг. Один из примеров включает указанный выше веб-сайт. Специалист в данной области техники затем может получить экспрессионную конструкцию, в которой экспрессия репортерного гена (например, флуоресцентного белка, фермента или другого репортерного гена) управляется промотором, таким как конститутивно активный промотор или клеточноспецифический промотор. Последовательность ЭРМ затем можно вносить в экспрессионную конструкцию. Экспрессионную конструкцию можно трансфицировать в соответствующую клетку, а клетку трансфицировать представляющей интерес микроРНК. Отсутствие экспрессии репортерного гена указывает на то, что ЭРМ обеспечивает сайленсинг генной экспрессии в присутствии микроРНК.

В некоторых вариантах осуществления CMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая не кодирует какие-либо ЭРМ.

В некоторых вариантах осуществления CMV-векторы, описанные в данном документе, содержат мутации, которые могут предотвращать распространение от хозяина к хозяину, тем самым делая вирус неспособным инфицировать субъектов с ослабленным иммунитетом или других субъектов, которые могут столкнуться с осложнениями в результате инфекции CMV. CMV-векторы, описанные в данном документе, также могут

содержать мутации, которые приводят в презентации иммунодоминантных и неиммунодоминантных эпитопов, а также неканонической рестрикции ГКГС. При этом в некоторых вариантах осуществления мутации в CMV-векторах, описанных в данном документе, не влияют на способность вектора повторно инфицировать субъекта, который ранее был инфицирован CMV. Такие мутации CMV описаны, например, в публикации патентных заявок США №№ US2013/0136768A1, US2013/0142823A1; US2014/0141038A1; и публикации международной заявки № WO2014/138209A1, при этом данные мутации включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген может представлять собой патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, опухолеспецифический антиген или собственный антиген хозяина, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный CMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5. В некоторых

вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор состоит из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

CMV-векторы, описанные в данном документе, можно получать путем вставки ДНК, содержащей последовательность, которая кодирует гетерологичный антиген, в важную или не важную область генома CMV. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 или UL82. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82. Способ может дополнительно включать удаление одной или более областей из генома CMV. Способ может включать *in vivo* рекомбинацию. Таким образом, способ может включать трансфекцию клетки ДНК CMV в клеточно-совместимой среде в присутствии донорной ДНК, содержащей гетерологичную ДНК, фланкируемую последовательностями ДНК, гомологичными с частями генома CMV, при этом гетерологичную ДНК вносят в геном CMV, и, необязательно, выделение после этого CMV, модифицированного путем *in vivo*

рекомбинации. Способ также может включать расщепление ДНК CMV для получения расщепленной ДНК CMV, лигирование гетерологичной ДНК в расщепленную ДНК CMV для получения гибридной CMV-гетерологичной ДНК, трансфекцию клетки гибридной CMV-гетерологичной ДНК и, необязательно, выделение после этого CMV, модифицированного наличием гетерологичной ДНК. Поскольку предусмотрена *in vivo* рекомбинация, в способе также предложена плазида, содержащая донорную ДНК, которая естественным образом не встречается в CMV, кодирующую полипептид, чужеродный для CMV, при этом донорная ДНК находится в сегменте ДНК CMV, который в ином случае был бы колинеарным с важной или не важной областью генома CMV, так, чтобы ДНК из важной или не важной области генома CMV фланкировалась донорной ДНК. Гетерологичную ДНК можно вставлять в CMV для создания рекомбинантного CMV в любой ориентации, которая обеспечивает интеграцию этой ДНК и ее экспрессию, при необходимости.

ДНК, кодирующая гетерологичный антиген в рекомбинантном CMV-векторе, также может содержать промотор. Промотор может быть из любого источника, такого как вирус герпеса, включая эндогенный промотор цитомегаловируса (CMV), такой как промотор CMV человека (HCMV), CMV макака-резуса CMV (RhCMV), мышинный или другой промотор CMV. Промотор также может представлять собой невирусный промотор, такой как промотор EF1 α . Промотор может представлять собой усеченный транскрипционно активный промотор, который содержит область, трансаktivированную трансаktivировающим белком, обеспечиваемым вирусом, и минимальную промоторную область полноразмерного промотора из которого получен усеченный транскрипционно активный промотор. Промотор может состоять из ассоциации последовательностей ДНК, соответствующей минимальному промотору и вышележащим регуляторным последовательностям. Минимальный промотор состоит из сайта CAP плюс АТА-бокс (минимальные последовательности для базового уровня транскрипции; нерегулируемого уровня транскрипции); «вышележащие регуляторные последовательности» состоят из вышележащего(их) элемента(ов) и энхансерной(ых) последовательности(ей). Кроме того, термин «усеченный» указывает на то, что полноразмерный промотор не полностью присутствует, т. е., что некоторая часть полноразмерного промотора была удалена. Усеченный промотор может быть получен из вируса герпеса, такого как HCMV или HCMV, например, HCMV-IE или HCMV-IE. Уменьшение размера может составлять до 40 % и даже до 90 % от полноразмерного промотора на основании пар оснований. Промотор также может представлять собой модифицированный невирусный промотор. Информацию по промоторам HCMV можно найти по ссылке на патенты США №№ 5168062 и 5385839.

Информацию по трансфекции клеток плазмидной ДНК для экспрессии из них можно найти по ссылке Felgner, JH et al. (Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol. Chem.* 269, 2550-2561 (1994)). Информацию по прямой инъекции плазмидной ДНК в качестве простого и эффективного способа вакцинации от ряда инфекционных заболеваний можно найти по ссылке Ulmer, JB et al. (Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749 (1993)). Следовательно, в объем данного изобретения входит то, что вектор можно использовать для прямой инъекции векторной ДНК. Также описана экспрессионная кассета, которую можно вставлять в рекомбинантный вирус или плазмиду, содержащая усеченный транскрипционно активный промотор. Экспрессионная кассета может дополнительно содержать функциональный усеченный сигнал полиаденилирования; например, сигнал полиаденилирования SV40, который усечен, но сохраняет функциональность. Усеченный сигнал полиаденилирования решает проблемы ограничения размера вставки рекомбинантных вирусов, таких как CMV. Экспрессионная кассета также может содержать гетерологичную ДНК в отношении вируса или системы, в которые она вставлена; и при этом эта ДНК может представлять собой гетерологичную ДНК, описанную в данном документе.

Следует отметить, что ДНК, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный антиген, может сама содержать промотор для управления экспрессией в CMV-векторе или же ДНК может быть ограничена кодирующей ДНК антигена. Эту конструкцию можно размещать в такой ориентации относительно эндогенного промотора CMV, чтобы она была функционально связана с промотором и за счет этого экспрессировалась. Кроме того, для того чтобы приумножить или повысить экспрессию можно использовать множество копий ДНК, кодирующей антиген, или сильный или ранний промотор, или ранний и поздний промотор, или любую их комбинацию. Таким образом, ДНК, кодирующую антиген, можно предпочтительно размещать относительно эндогенного промотора CMV, или же эти промоторы можно транслоцировать для вставки в другой локации вместе с ДНК, кодирующей антиген. В CMV-вектор могут быть упакованы нуклеиновые кислоты, кодирующие более одного антигена.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Рекомбинантные CMV-векторы, описанные в данном документе, можно использовать в фармацевтической композиции (например, иммуногенной или вакцинной композиции), содержащей вектор и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Иммуногенная или вакцинная композиция, содержащая рекомбинантный вирус или вектор CMV (или продукт его экспрессии), вызывает иммунологический ответ

(местный или системный). Ответ может быть, но необязательно, защитным. Другими словами, иммуногенная или вакцинная композиция вызывает местный или системный защитный или терапевтический ответ.

Такие фармацевтические композиции можно готовить в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармации. Такие композиции можно вводить в дозировках и с помощью методов, хорошо известных специалистам в области медицины, учитывая такие факторы, как порода или вид, возраст, пол, масса и состояние конкретного пациента, а также путь введения. Композиции можно вводить отдельно или можно вводить совместно или последовательно с другими CMV-векторами или с другими иммунологическими, антигенными или вакцинными или терапевтическими композициями. Такие другие композиции могут содержать очищенные нативные антигены или эпитопы, или антигены или эпитопы, являющиеся продуктом экспрессии рекомбинантного CMV-вектора или другой векторной системы.

Описанные в данном документе фармацевтические композиции можно составлять так, чтобы использовать их в любой процедуре введения, известной в данной области техники. Такие фармацевтические композиции можно вводить парентеральным путем (интрадермальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутривенным или другими). Введение также можно осуществлять мукозальным путем, например, пероральным, назальным, генитальным и т. д.

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

Описанные в данном документе фармацевтические композиции, как правило, могут содержать адъювант и количество CMV-вектора или продукта экспрессии, чтобы вызывать необходимый ответ. В случае применения на людях типичным адъювантом являются квасцы (фосфат алюминия или гидроксид алюминия). Сапонин и его очищенный компонент Quil A, полный адъювант Фрейнда и другие адъюванты, используемые в исследованиях и ветеринарных применениях, имеют токсичность, которая ограничивает их потенциальное применение в человеческих вакцинах. Также можно использовать химически определенные препараты, такие как мурамилдипептид, монофосфориллипид A,

фосфолипидные конъюгаты, такие как описаны в Goodman-Snitkoff, G. et al. (Role of intrastructural/intermolecular help in immunization with peptide-phospholipid complexes. *J Immunol.* 147, 410-415 (1991)), инкапсуляцию белка в протеолипосоме, как описано в Miller, MD et al. (Vaccination of rhesus monkeys with synthetic peptide in a fusogenic proteoliposome elicits simian immunodeficiency virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J Exp. Med.* 176, 1739-1744 (1992)), и инкапсуляцию белка в липидных везикулах, таких как липидные везикулы Novasome (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, N.H.).

Композиция может быть упакована в единичную лекарственную форму для иммунизации путем парентерального (например, внутримышечного, интрадермального или подкожного) введения или введения через отверстия, например, перлингвального (например, перорального), внутрижелудочного, мукозального, в том числе внутривагинального, внутрианального, внутривагинального и т. п. введения. Эффективную дозировку и путь введения определяют природой композиции, природой продукта экспрессии, уровнем экспрессии в случае непосредственного применения рекомбинантного CMV и известными факторами, такими как порода или вид, возраст, пол, масса, состояние и природа субъекта, а также LD50 и другими исследовательскими процедурами, которые являются известными и не требуют проведения необязательных экспериментов. Дозировки экспрессируемого продукта могут находиться в диапазоне от нескольких до нескольких сотен микрограмм, например, от 5 до 500 мкг. CMV-вектор можно вводить в любом подходящем количестве для обеспечения экспрессии при этих уровнях дозировок. В неограничивающих примерах: CMV-векторы можно вводить в количестве по меньшей мере 10^2 БОЕ; таким образом, CMV-векторы можно вводить по меньшей мере в этом количестве; или в диапазоне от около 10^2 БОЕ до около 10^7 БОЕ. В неограничивающих примерах: CMV-векторы можно вводить в количестве по меньшей мере 1×10^3 фокусиобразующих единиц (ФОЕ); таким образом, CMV-векторы можно вводить по меньшей мере в этом количестве; или в диапазоне от около 1×10^3 до около 1×10^7 ФОЕ.

В неограничивающих примерах: CMV-векторы можно вводить в количестве около 1×10^3 ФОЕ, около 3×10^4 ФОЕ, около 5×10^4 ФОЕ, около 5×10^5 ФОЕ, около 1×10^6 ФОЕ, около 5×10^6 ФОЕ или около 1×10^7 ФОЕ. В неограничивающих примерах: CMV-векторы можно вводить в одной дозе, по меньшей мере одной дозе, двух дозах или по меньшей мере двух дозах. В качестве неограничивающего примера CMV-векторы можно вводить в двух дозах. Начальная доза может называться «прайм»-дозой, в любые последующие дозы или дозы могут называться «бустерной» дозой или «бустерными» дозами. В качестве неограничивающего примера «бустерную» дозу можно вводить через около 84 дней или 12 недель после введения «прайм»-дозы. Другие подходящие носители или разбавители могут

представлять собой воду или буферный солевой раствор с консервантом или без. CMV-вектор можно лиофилизировать для ресуспендирования во время введения или он может находиться в растворе. В неограничивающих примерах: суспендированный CMV-вектор можно вводить в виде инъекции, имеющей объем менее 1 мл, около 1 мл, около 2 мл или более 1 мл. В неограничивающем примере CMV-вектор можно вводить подкожно, необязательно, в дельтовидную область.

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ДРУГИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Антигены и рекомбинантные CMV-векторы, описанные в данном документе, можно применять в способах индукции иммунологического или иммунного ответа у субъекта, включающих введение субъекту композиции, содержащей рекомбинантный вирус или вектор CMV и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В контексте данного документа термин «субъект» относится к живым многоклеточным позвоночным организмам, категории, которая включает как людей, так и отличных от людей млекопитающих. Субъект может представлять собой животное, такое как млекопитающее, включая любое млекопитающее, которое может быть инфицировано HIV, например примата (такого как человек, отличный от человека примат, например обезьяна или шимпанзе), или животное, которое считается приемлемой клинической моделью патогенной инфекции, такой как мышьяная модель HBV-AAV (смотрите, например, Yang, DY et al. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy. *Cell and Mol Immunol* 11, 71-78 (2014)) или трансгенная мышьяная модель HBV 1.3xfs (Guidotti, LG et al. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 69, 6158-6169 (1995)).

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет серологический статус в отношении инфекции HCMV. В контексте данного документа термин «серопозитивный» относится к субъекту или иммунной системе, которые ранее подвергались воздействию антигена и, следовательно, имеют выявляемый сывороточный титр антител против представляющего интерес антигена. Выражение «серопозитивный в отношении HCMV» относится к субъекту или иммунной системе, которые ранее подвергались воздействию антигена HCMV. Серопозитивных субъекта или иммунную систему можно отличить по наличию антител или других иммунных маркеров в сыворотке, которые указывают на воздействие в прошлом конкретного антигена. В контексте данного документа термин «серонегативный» относится к субъекту или иммунной системе, которые ранее не подвергались воздействию антигена и, следовательно, у них отсутствует выявляемый сывороточный титр антител против представляющего интерес антигена. Выражение

«серонегативный в отношении HCMV» относится к субъекту или иммунной системе, которые ранее не подвергались воздействию антигена HCMV.

В контексте данного документа термин «лечение» относится к вмешательству, которое облегчает признак или симптом заболевания или патологического состояния. В контексте данного документа термины «лечение», «лечить» и «проведение лечения» в отношении заболевания патологического состояния или симптома, также относятся к любому наблюдаемому благоприятному эффекту лечения. О благоприятном эффекте может свидетельствовать, например, задержка появления клинических симптомов заболевания у восприимчивого субъекта, снижение тяжести некоторых или всех клинических симптомов заболевания, замедленное прогрессирование заболевания, снижение количества рецидивов заболевания, улучшение общего состояния здоровья или самочувствия субъекта или другие хорошо известные в данной области параметры, которые являются специфическими для конкретного заболевания. Профилактическое лечение представляет собой лечение, которое назначают субъекту, у которого не проявляются признаки заболевания или проявляются только ранние признаки, в целях снижения риска развития патологии. Терапевтическое лечение представляет собой лечение, которое назначают субъекту после развития признаков и симптомов заболевания.

В контексте данного документа термины «предотвращать» или «предотвращение» относятся к отсутствию развития заболевания, нарушения или патологического состояния или снижению развития признаков или симптомов, связанных с таким заболеванием, нарушением или патологическим состоянием (например, в клинически релевантной степени), или проявлению отсроченных признаков или симптомов (например, на дни, недели, месяцы или года). Для предотвращения может быть необходимо введение более чем одной дозы.

В контексте данного документа термин «эффективное количество» относится к количеству агента, такого как CMV-вектор, содержащий гетерологичный антиген, которое является достаточным для генерации необходимого ответа, такого как снижение или устранение признака или симптома патологического состояния или заболевания или индукция иммунного ответа на антиген. В некоторых примерах «эффективное количество» представляет собой количество, которое обеспечивает лечение (включая профилактику) одного или более симптомов и/или первопричин любого нарушения или заболевания. Эффективное количество может представлять собой терапевтически эффективное количество, включая количество, которое обеспечивает предотвращение развития одного или более признаков или симптомов конкретного заболевания или патологического состояния, например одного или более признаков или симптомов, связанных с

инфекционным заболеванием или раком.

Описанные CMV-векторы можно вводить *in vivo*, например, когда целью является индукция иммунологического ответа, включая иммунный ответ CD8⁺ Т-клеток, включая иммунный ответ, характеризуемый высоким процентом ответа CD8⁺ Т-клеток, рестриктированных по ГКГС-Е, ГКГС-II или ГКГС-I (или их гомологом или ортологом). Например, в некоторых примерах может быть желательно использовать описанные CMV-векторы в организме лабораторного животного, такого как макаки-резус, для доклинического тестирования иммуногенных композиций и вакцин с использованием RhCMV. В других примерах может быть желательно использовать описанные CMV-векторы в отношении субъектов-людей, например, в клинических исследованиях и для актуального клинического применения иммунологических композиций с использованием HCMV.

В случае таких *in vivo* применений описанные CMV-векторы можно вводить в качестве компонента иммуногенной или фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции по изобретению применимы для стимуляции иммунного ответа против гетерологичного антигена, при этом их можно использовать в качестве одного или более компонентов профилактической или терапевтической вакцины. Нуклеиновые кислоты и векторы по изобретению, в частности, применимы для создания генетических вакцин, т. е. вакцин для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих антигены по изобретению, субъекту, такому как человек, чтобы антигены затем экспрессировались в организме субъекта, чтобы вызвать иммунный ответ.

Программы (схемы) иммунизации хорошо известны для животных (включая людей) и могут быть легко определены для конкретного субъекта и иммуногенной композиции. Следовательно, иммуногены можно вводить субъекту один или более раз. Предпочтительно между отдельными введениями иммуногенной композиции существует установленный временной интервал. Хотя этот интервал варьируется для каждого субъекта, как правило, он находится в диапазоне от 10 дней до нескольких недель и часто составляет 2, 4, 6, 8 или 12 недель. Для людей интервал, как правило, составляет от 2 до 6 недель. В особенно преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения этот интервал составляет больше, 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. Программы иммунизации, как правило,

подразумевают от 1 до 6 введений иммуногенной композиции, но могут включать лишь одну, или две, или четыре. Способы индукции иммунного ответа также могут включать введение адъюванта с иммуногенами. В некоторых случаях исходный протокол иммунизации может быть дополнен бустерной иммунизацией через год, два года или более длинный интервал (5–10 лет). Представленные способы также включают ряд схем по типу прайм-буст. В этих способах за одной или более прайм-иммунизациями следуют одна или более бустерных иммунизаций. Фактическая иммуногенная композиция может быть одинаковой или разной для каждой иммунизации, при этом тип иммуногенной композиции (например, содержащей белок или экспрессионный вектор), путь и состав иммуногенов могут варьироваться. Например, если для праймирующего и бустерного этапов используют экспрессионный вектор, он может быть одинаковым или разным (например, ДНК, или бактериальный, или вирусный экспрессионный вектор). В одной из применимых прайм-буст схем предусмотрены две праймирующие иммунизации в интервалом в четыре недели, за которыми следуют две бустерные иммунизации через 4 и 8 недель после последней праймирующей иммунизации. Специалист в данной области техники без труда поймет, что существует несколько предусмотренных вариантов или комбинаций с использованием ДНК, бактериальных и вирусных экспрессионных векторов по изобретению для обеспечения схем праймирования и бустеризации. CMV-векторы можно использовать повторно, при условии, что они экспрессируют разные антигены, полученные из разных патогенов.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту любого из вышеупомянутых рекомбинантных HCMV-векторов или содержащих их композиций. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ направлен по меньшей мере на один гетерологичный антиген, доставляемый вектором. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный HCMV-вектор вводят в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать ответ CD8⁺ Т-клеток на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

Также в объем изобретения входит применение любого из вышеупомянутых рекомбинантных HCMV-векторов или содержащих их композиций в производстве лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта. В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные HCMV-векторы и связанные с ними композиции для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-

вектора или композиции, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать ответ CD8⁺ Т-клеток на по меньшей мере один гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложено применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в производстве лекарственного средства для применения в предотвращении заболевания у субъекта. В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные HCMV-векторы и связанные с ними композиции для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления в изобретении предложен способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для того, чтобы: (i) вызвать ответ CD8⁺ Т-клеток на по меньшей мере один антиген HIV; (ii) снизить вирусную и/или выявляемую нагрузку HIV, включая снижение выявляемой нагрузки HIV ниже предела обнаружения, с помощью любого доступного теста (например, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)); (iii) ограничить репликацию и/или мутацию HIV так, чтобы быстро устранить первичную инфекцию HIV; и (iv) предотвратить устойчивую инфекцию или заболевание так, чтобы не требовалось долгосрочное противовирусное лечение (ПВЛ). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложено применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в производстве лекарственного средства для применения в предотвращении заболевания у субъекта. В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные HCMV-векторы и связанные с ними композиции для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать ответ CD8⁺ Т-клеток на по меньшей мере один гетерологичный антиген. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложено применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта. В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные HCMV-векторы и связанные с ними композиции для применения в лечении заболевания у субъекта.

В дополнительных вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для того,

чтобы: (i) обеспечить лечение субъекта, имеющего HIV-инфекцию; (ii) вызвать ответ CD8+ Т-клеток на по меньшей мере один антиген HIV; (iii) снизить вирусную нагрузку и/или выявляемую вирусную нагрузку HIV, включая снижение выявляемой вирусной нагрузки HIV ниже предела обнаружения, с помощью любого доступного теста (например, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)); (iv) ограничить репликацию и/или мутацию HIV так, чтобы быстро устранить первичную инфекцию HIV; и (v) предотвратить устойчивую инфекцию или заболевание так, чтобы не требовалось долгосрочное противовирусное лечение (ПВЛ). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложено применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции, описанных в данном документе, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта. В настоящем изобретении также предложены рекомбинантные HCMV-векторы и связанные с ними композиции для применения в лечении заболевания у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления «устойчивая» HIV-инфекция может относиться к (1) выявлению по меньшей мере 10000 копий HIV на миллилитр крови или (2) выявлению HIV в образцах крови в течение трех или более последовательных недель.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения гетерологичный антиген представляет собой или содержит антиген HIV, а заболевание представляет собой HIV-инфекцию.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения гетерологичный антиген представляет собой патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, опухолеспецифический антиген или собственный антиген хозяина, а заболевание представляет собой патогенную инфекцию, опухоль или рак, или аутоиммунное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Е или его ортологу. В некоторых дополнительных 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 HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Е или его ортологу.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-И или его ортологу. В некоторых дополнительных 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 HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутых способов, применений или композиций для применения менее чем 10 %, менее чем 20 %, менее чем 30 %, менее чем 40 % или менее чем 50 % CD8⁺ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС класс Ia или его ортологу.

В некоторых дополнительных аспектах в настоящем изобретении предложен способ генерации CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид, путем введения рекомбинантного CMV-вектора, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

(a) введение первому субъекту рекомбинантного HCMV-вектора, описанного в данном документе, в количестве, эффективном для генерации группы CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/полученный из гетерологичного антигена пептид;

(b) идентификацию первого CD8⁺ TCR из группы CD8⁺ Т-клеток, причем первый CD8⁺ TCR распознает комплекс ГКГС-Е/пептид;

(c) выделение одной или более CD8⁺ Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD8⁺ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8⁺ TCR, и промотор, функциональной связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8⁺ TCR, при этом второй CD8⁺ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8⁺ TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид.

В некоторых вариантах осуществления первый субъект является серопозитивным в отношении HCMV. В некоторых вариантах осуществления первый субъект является серонегативным в отношении HCMV.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ генерации CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид, включающий:

(a) идентификацию первого CD8⁺ TCR из группы CD8⁺ Т-клеток, при этом группа CD8⁺ Т-клеток выделена от первого субъекта, которому ввели рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–26, и при этом первый CD8⁺ TCR распознает комплекс ГКГС-Е/полученный из гетерологичного антигена пептид;

(b) выделение одной или более CD8⁺ Т-клеток от второго субъекта; и

(c) трансфекцию одной или более CD8⁺ Т-клеток, выделенных от второго субъекта,

экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор 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, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид. В некоторых вариантах осуществления способа генерации CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид первый CD8⁺ TCR идентифицируют путем 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 первый и второй субъекты представляют собой людей. В некоторых вариантах осуществления первый субъект является серопозитивным в отношении HCMV. В некоторых вариантах осуществления первый субъект является серонегативным в отношении HCMV.

В настоящем изобретении также предложена CD8⁺ Т-клетка, созданная вышеупомянутыми способами. В некоторых дополнительных вариантах осуществления CD8⁺ Т-клетку используют в способе лечения или предотвращения заболевания у субъекта. CD8⁺ Т-клетку можно использовать в других дополнительных вариантах осуществления в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

ТИПОВЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено:

1. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3 и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген, при этом:

(a) (i) вектор не экспрессирует UL18, UL78, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL82 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78;

(b) (i) вектор не экспрессирует UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL18 или его ортолог, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его

ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82; или

(c) (i) вектор не экспрессирует UL18, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортологи; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

2. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что:

(i) вектор не экспрессирует UL18, UL78, UL128, UL130, UL146 или UL147;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL82 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78.

3. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что:

(i) вектор не экспрессирует UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL18 или его ортолог, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

4. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что:

(i) вектор не экспрессирует UL18, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

5. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–4, отличающийся тем, что вектор не экспрессирует один или более из белка UL18, белка UL78, белка UL82, белка UL128, белка UL130, белка UL146 или белка UL147, получаемых в результате наличия одной или более мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL78, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147.

6. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL78, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147, представляет собой точечную мутацию, мутацию со сдвигом рамки, мутацию усечения или делецию всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок.

7. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–6, отличающийся тем, что вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (миРНК) (ЭРМ), при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в эндотелиальных клетках.

8. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–7, отличающийся тем, что вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в миелоидных клетках.

9. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–8, отличающийся тем, что гетерологичный антиген представляет собой патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или собственный антиген хозяина.

10. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 9, отличающийся тем, что патоген представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразитов Plasmodium или Mycobacterium tuberculosis.

11. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 9, отличающийся тем, что патоген-специфический антиген содержит антиген HIV.

12. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий или состоящий из HIV Gag, а HIV Nef и HIV Pol, или его иммуногенных фрагментов, или их комбинаций.

13. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3.

14. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3.

15. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3.

16. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4.

17. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4.

18. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 12,

отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4.

19. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 9, отличающийся тем, что опухолевый антиген относится к острому миелогенному лейкозу, хроническому миелогенному лейкозу, миелодиспластическому синдрому, острому лимфобластному лейкозу, хроническому лимфобластному лейкозу, неходжкинской лимфоме, множественной миеломе, злокачественной меланоме, раку молочной железы, раку легкого, раку яичника, раку предстательной железы, раку поджелудочной железы, раку толстой кишки, почечно-клеточной карциноме (ПКК) или герминогенным опухолям.

20. Рекомбинантный HCMV-вектор по варианту осуществления 9, отличающийся тем, что собственный антиген хозяина представляет собой антиген, полученный из вариабельной области Т-клеточного рецептора (TCR), или антиген, полученный из вариабельной области В-клеточного рецептора.

21. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

22. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

23. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

24. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

25. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

26. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

27. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

28. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

29. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

30. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

31. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

32. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

33. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

34. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

35. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–35 и фармацевтически приемлемый носитель.

37. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 36, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер.

38. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 36 или 37, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер, содержащий около 20 мМ L-гистидина и около 10 % (масс./об.) трегалозы.

39. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 36–38, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер, содержащий 20 мМ L-гистидина и 10 % (масс./об.) трегалозы.

40. Фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 36–39, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гистидин-трегалозовый (ГТ) буфер, имеющий pH 7,2, содержащий 20 мМ L-гистидина и 10 % (масс./об.) трегалозы.

41. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–35 и фармацевтически приемлемый носитель.

42. Способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41.

43. Способ по варианту осуществления 42, отличающийся тем, что иммунный ответ направлен

на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

44. Применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41 в производстве лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

45. Рекомбинантный HCMV-вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–41 для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

46. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41.

47. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41.

48. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

49. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

50. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

51. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение

последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

52. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

53. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41.

54. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

55. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

56. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

57. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

58. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или

фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

59. Применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

60. Применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41 в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

61. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

62. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

63. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

64. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

65. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8, в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

66. Применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из вариантов осуществления 1–41 в производстве лекарственного средства для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

67. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7, в предотвращении заболевания у субъекта.

68. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9, в предотвращении заболевания у субъекта.

69. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5, в предотвращении заболевания у субъекта.

70. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6, в предотвращении заболевания у субъекта.

71. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8, в предотвращении заболевания у субъекта.

72. Рекомбинантный HCMV-вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–41 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

73. Рекомбинантный HCMV-вектор или композиция по любому из вариантов

осуществления 1–41 для применения в лечении заболевания у субъекта.

74. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7, для применения в лечении заболевания у субъекта.

75. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9, для применения в лечении заболевания у субъекта.

76. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении заболевания у субъекта.

77. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6, для применения в лечении заболевания у субъекта.

78. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8, для применения в лечении заболевания у субъекта.

79. Рекомбинантный HCMV-вектор или композиция по любому из вариантов осуществления 1–41 для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

80. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7, для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

81. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9, для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

82. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты

в соответствии с SEQ ID NO: 5, для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

83. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6, для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

84. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8, для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

85. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 42–84, отличающиеся тем, что субъект является серопозитивным в отношении HCMV.

86. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 42–84, отличающиеся тем, что субъект является серонегативным в отношении HCMV.

87. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 42–86, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве по меньшей мере 1×10^3 фокусообразующих единиц (ФОЕ).

88. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 87, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 5×10^4 ФОЕ.

89. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 87, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 5×10^5 ФОЕ.

90. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 87, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 5×10^6 ФОЕ.

91. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 87, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 1×10^3 ФОЕ.

92. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 87, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 3×10^4 ФОЕ.

93. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по варианту осуществления 87, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 1×10^6 ФОЕ.

94. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 42–93, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV-вектор вводят в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать ответ CD8⁺ Т-клеток на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

95. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 42–94, отличающиеся тем, что гетерологичный антиген представляет собой или содержит антиген HIV, а заболевание представляет собой инфекцию HIV.

96. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 42–94, отличающиеся тем, что заболевание представляет собой патогенную инфекцию, опухоль или рак или аутоиммунное заболевание.

97. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 63–96, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD8⁺ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Е или его ортологу.

98. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 63–97, отличающиеся тем, что 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 90 % или по меньшей мере 100 % CD8⁺ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Е или его ортологу.

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 HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-E или его ортологу.

99. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 63–98, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

100. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 63–99, отличающиеся тем, что 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 HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

101. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из вариантов осуществления 63–100, отличающиеся тем, что менее чем 10 %, менее чем 20 %, менее чем 30 %, менее чем 40 % или менее чем 50 % CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС класс Ia или его ортологу.

102. Способ генерации CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-E/пептид, включающий:

(a) введение первому субъекту рекомбинантного HCMV-вектора по любому из вариантов осуществления 1–35 в количестве, эффективном для генерации группы CD8+ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-E/полученный из гетерологичного антигена пептид;

(b) идентификацию первого CD8+ TCR из группы CD8+ Т-клеток, причем первый CD8+ TCR распознает комплекс ГКГС-E/пептид;

(c) выделение одной или более CD8+ Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD8+ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8+ TCR, и промотор, функциональной связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8+ TCR, при этом второй CD8+ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8+ TCR, с генерацией,

таким образом, одной или более CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид.

103. Способ генерации CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид, включающий:

(а) идентификацию первого CD8⁺ TCR из группы CD8⁺ Т-клеток, при этом группа CD8⁺ Т-клеток выделена от первого субъекта, которому ввели рекомбинантный HCMV-вектор по любому из вариантов осуществления 1–35, и при этом первый CD8⁺ TCR распознает комплекс ГКГС-Е/полученный из гетерологичного антигена пептид;

(b) выделение одной или более CD8⁺ Т-клеток от второго субъекта; и

(c) трансфекцию одной или более CD8⁺ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8⁺ TCR, и промотор, функциональной связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8⁺ TCR, при этом второй CD8⁺ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8⁺ TCR, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид.

104. Способ по варианту осуществления 102 или 103, отличающийся тем, что первый CD8⁺ TCR идентифицируют путем секвенирования ДНК или РНК.

105. Способ по любому из вариантов осуществления 102–104, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8⁺ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8⁺ TCR.

106. Способ по любому из вариантов осуществления 102–105, отличающийся тем, что первый субъект представляет собой человека.

107. Способ по любому из вариантов осуществления 102–106, отличающийся тем, что первый субъект является серопозитивным в отношении HCMV.

108. Способ по любому из вариантов осуществления 102–106, отличающийся тем, что первый субъект является серонегативным в отношении HCMV.

109. Способ по любому из вариантов осуществления 102–108, отличающийся тем,

что второй субъект представляет собой человека.

110. CD8+ Т-клетка, полученная способом по любому из вариантов осуществления 102–109.

111. Способ лечения или предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 110.

112. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 110.

113. Способ предотвращения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 110.

114. Применение CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 110 в производстве лекарственного средства для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

115. Применение CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 110 в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

116. Применение CD8+ Т-клетки по варианту осуществления 110 в производстве лекарственного средства для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

117. CD8+ Т-клетка по варианту осуществления 110 для применения в лечении или предотвращении заболевания у субъекта.

118. CD8+ Т-клетка по варианту осуществления 110 для применения в лечении заболевания у субъекта.

119. CD8+ Т-клетка по варианту осуществления 110 для применения в предотвращении заболевания у субъекта.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Эксперименты по иммуногенности на отличных от человека приматах

В вакцинных векторах на основе цитомегаловируса (CMV) используется природная способность этого вируса индуцировать и поддерживать циркулирующие и оседлые в тканях эффектор-дифференцированные Т-клетки, включая потенциальные сайты ранней HIV-инфекции. Например, векторы на основе CMV резусов (RhCMV), кодирующие вставки антигена вируса иммунодефицита обезьян (SIV), могут (1) суперинфицировать RhCMV-иммунных приматов и индуцировать высокочастотные эффектор-дифференцированные SIV-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки как в лимфоидных, так и в органных тканях, и (2) бесконечно поддерживать эти ответы, и (3) демонстрировать ранний жесткий контроль и, в конечном итоге, клиренс инфекции в случае высокопатогенного штамма SIVmac239. Была разработана профилактическая вакцина от HIV, которая стимулирует индукцию и поддержку высоких частот HIV-специфических CD8⁺ Т-клеток, с целью широкого охвата эпитопов для того, чтобы избежать селекции вариантов, уклоняющихся от цитотоксических Т-клеток, и признаков истощения Т-клеток HIV-специфических Т-клеток у пациентов. Эту вакцину тестируют на макаках-резус и/или яванских макаках.

ПРИМЕР 2: КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВАКЦИНЫ ОТ HIV НА ОСНОВЕ HCMV

Вакцину от HIV будут тестировать во впервые проводимом на людях рандомизированном многоцентровом двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании фазы 1a у здоровых добровольцев возрастом от 18 до 50 лет, которые являются серопозитивными в отношении CMV и не инфицированы HIV. Вакцина представляет собой вектор на основе живого аттенуированного CMV человека (вектор 1), который экспрессирует ген gag клады А HIV-1.

Хотя число новых случаев HIV-инфекции на год снижается, оно остается высоким с 1,8 миллиона новых случаев инфекции только в 2017 г., а ежегодная смертность вследствие HIV/приобретенного синдрома иммунодефицита (СПИД) продолжается оставаться высокой с приблизительно 0,9 миллиона летальных исходов в год по всему миру (UNAIDS/WHO Data 2018, https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaid-data-2018_en.pdf). Неспособность всех предшествующих кандидатных вакцин от HIV достичь эффективности позволяет предположить, что для защиты может требоваться вызываемая вакциной иммунность, которая качественно отличается от предшествующих вакцинных стратегий. Идеальная вакцина от HIV будет не только доставлять релевантные антигены HIV в иммунную систему, но эти антигены также будут экспрессироваться в векторе, который обладает способностью управлять тем, как иммунная система отвечает на эти антигены, концепция, которая была названа «антигенная доставка и иммунное программирование (АДИП)».

Долгое время было известно, что CMV вызывает мощный иммунный ответ, характеризуемый долгосрочным сохранением высокочастотных вирус-специфических Т-клеток, преимущественно с фенотипом эффекторных клеток памяти (T_{EM}), которые способны перемещаться в ткани и демонстрировать незамедлительные противовирусные эффекторные ответы. Поскольку антиген-специфические T_{EM} клетки имеют меньшее время полужизни, чем T_{CM} клетки, вектор, который постоянно презентует антигены в организме хозяина и может обеспечивать долгосрочное пополнение этих клеток, является идеальным. Главный шаг вперед с целью создания защитной вакцины от HIV был сделан в 2011 г. с результатом, что вакцина на основе RhCMV, кодирующая антигены вируса иммунодефицита обезьян (SIV), была способна защищать приблизительно 50 % макаков-резус (MR) от стойкой инфекции после повторной дозы мукозального воздействия высокопатогенного SIV_{mac239} (Hansen SG et al., *Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T cell vaccine*, *Nature* 2011;473(7348):523-7). Также было продемонстрировано, что RhCMV имел уникальное качество, состоящее в способности индуцировать и поддерживать популяции высокофункциональных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти. У животных, которые демонстрировали защиту от стимуляции SIV, жесткий иммунологический контроль достигался очень рано после начала инфекции и у подавляющего большинства приводил к полному вирусному клиренсу по определению как в долгосрочном последующем наблюдении, так и чувствительными лабораторными методами для выявления SIV в тканях. Ряд работ авторства Picker et al. подтвердил потенциал вакцины на основе CMV вызывать обширные и длительные клеточные ответы, способные жестко контролировать инфекцию SIV после воздействия. Последующая работа продемонстрировала воспроизводимость этого результата и выявила критическую важность эффекторных ответов нетрадиционно рестриктированных (ГКГС-Е и ГКГС-И) CD8⁺ Т-клеток как ключевого иммунологического механизма, связанного с защитой, в отличие от традиционных ГКГС-Ia рестриктированных CD8⁺ Т-клеток (Hansen SG et al., *Cytomegalovirus vectors violate CD8⁺ T cell epitope recognition paradigms*, *Science* 2013;340(6135):1237874; Marshall E et al, *Enhancing Safety of cytomegalovirus-based vaccine vectors by engaging host intrinsic immunity*, *Science Translational Medicine* 2019 Jul 17;11(501)). Эта концепция иммунного программирования, что генетическая манипуляция с CMV-векторами может преимущественно индуцировать нетрадиционно рестриктированные CD8⁺ Т-клетки, представляет новую парадигму в разработке вакцин.

В этом исследовании вакцину используют, чтобы определить, можно ли иммунное программирование, связанное с RhCMV-векторами обезьян, у MR повторить у людей. Вектор содержит антигенную кассету, кодирующую HIV gag, которая специально

разработана так, чтобы обеспечивать постоянную презентацию антигена, с целью оценить, смещен ли иммунный ответ, вызываемый этим HCMV-вектором, в направлении клеточного иммунного профиля, аналогичного тому, который связан с защитой от SIV у МР.

Это исследование будут проводить в 3 когортах с повышением дозы. Комитет по рассмотрению вопросов безопасности (КРВБ) будет проводить периодические проверки безопасности, реактогенности и переносимости на основании доступных данных исследования, собранных в течение исследования, с основной целью защиты безопасности субъектов, участвующих в клиническом исследовании. КРВБ будет проводить проверку данных по безопасности перед началом введения доз в следующей когорте.

Цели

Первичной целью исследования является оценка безопасности, реактогенности и переносимости вакцины по сравнению с плацебо при подкожном введении здоровым CMV-серопозитивным взрослым субъектам. Вторичной целью является оценка характеристик иммуногенности вакцины по данным измерения ответов Т-клеток и антител на полученный из вакцины HIV-1 Gag. Поисковые цели могут включать: (1) оценку дополнительных характеристик иммунных ответов на вакцину путем анализа типа молекул ГКГС для распознавания CD8⁺ Т-клетками полученного из вакцины HIV-1 Gag, репертуара Т-клеток, опосредующего это распознавание, способности индуцированных вакциной CD8⁺ Т-клеток отвечать на HIV-инфицированные клетки и других функциональных и фенотипических измерений Т-клеток; (2) идентификацию транскриптомного «сигнатурного» профиля в периферической цельной крови, обусловленного введением вакцины; (3) оценку характеристик иммуногенности вакцины по данным измерения ответов Т-клеток и антител на CMV.

Конечные точки

Первичными конечными точками этого исследования являются частота возникших в ходе лечения НЯ, СНЯ и ННХЗ; частота явлений реактогенности, в локальном участке или системных; и клинические оценки, включая, но не ограничиваясь этим, результаты лабораторных исследований, вирусемии CMV-вектора и выделение CMV-вектора. Вторичными конечными точками этого исследования являются оценка интенсивности, функции и фенотипического профиля ответов специфических к вставке CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по данным внутриклеточного окрашивания цитокинов и проточной цитометрии и измерение серологического титра HIV-1 Gag-специфических антител. Поисковые конечные точки этого исследования могут включать оценку ширины HIV Gag-специфических Т-клеточных эпитопов, генерируемых в ответ на вакцину, определение рестриктирования CD8⁺ Т-клеток, генерируемого в ответ на вакцину, функциональную возможность

опосредованного Т-клетками распознавания HIV-инфицированных клеток-мишеней в ответ на вакцину, характеристику HIV Gag-специфического репертуара Т-клеток, генерируемого вакциной, посредством клонотипирования TCR, изменения интенсивности и фенотипического профиля ответов CMV-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, изменения серологического титра CMV-специфических антител и индуцированную вакциной от HIV серопозитивность (VISP) в ответ на вакцину.

Активный агент и введение доз

Вакцина представляет собой вектор на основе живого аттенуированного CMV человека, экспрессирующий ген gag клады А HIV-1. Рекомбинантный HCMV-вектор получен из клинического изолята TR (Smith IL et al., High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis.* 1997;176(1):69-77). Чтобы создать вектор, TR генетически модифицировали, чтобы восстановить восприимчивость ганцикловира и ингибирующую активность ГКГС-I. В векторе удаляли ген UL82, кодирующий покровный белок pp71, и замещали антигенной кассетой, кодирующей трансген gag клады А HIV-I (Keefe MC et al. A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of a multigenic HIV-1 adenovirus subtype 35 vector vaccine in healthy uninfected adults, *PLoS ONE* 2012;7(8):e41936). Вектор включает стратегии множественного аттенуирования, включая делецию гена UL82 и делецию пентамерного комплекса компонентов UL128–130, которые контролируют тропизм клетки-хозяина. Делеция генов UL128–130 и UL146–147 может повлиять на характеристики ответа CD8⁺ Т-клеток хозяина.

Каждый одноразовый флакон содержит 0,5 мл вектора в буфере для составления TNS (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 10 % сахарозы). Каждую дозу будут вводить в виде 1 мл п/к инъекции в дельтовидную область плеча. Стартовая доза составляет 1×10^3 фокусообразующих единиц (ФОЕ). Субъекты, рандомизированные для получения плацебо, будут получать 1 мл буфера для составления TNS (носитель) путем п/к инъекции. Каждый одноразовый флакон содержит 0,5 мл буфера для составления TNS.

Всего будет включено до 26 субъектов в 3 когорты с возрастающей дозой для вакцинации, вводимой подкожно (смотрите таблицу 1 ниже и Фиг. 1). Когорта 1 будет состоять из 6 субъектов, рандомизованных в соотношении 4:2 для получения вакцины или плацебо. Когорта 2 будет состоять из 8 субъектов, рандомизованных в соотношении 6:2 для получения вакцины или плацебо. Когорта 3 будет состоять из 12 субъектов, рандомизованных в соотношении 10:2 для получения вакцины или плацебо. Начальная стартовая доза будет составлять 1×10^3 фокус-образующих единиц (ФОЕ). Дозу в последующих когортах будут повышать поэтапно с ~ 30-кратным приростом вплоть до $1 \times$

10^6 ФОЕ, что соответствует хорошо переносимому диапазону дозы без сигналов по безопасности в доклинических исследованиях токсикологии в рамках НЛП. За всеми субъектами будут проводить последующее наблюдение и тестировать, как изложено в графике оценок (ГО). Субъекты будут получать вторую подкожную дозу в день 57. Вторая доза будет составлять такой же уровень дозировки продукта, что и во время введения первой дозы.

Переход к следующей когорте будет происходить только после доступа к данным по безопасности в течение последнего визита субъекта на неделе 8 (включая нежелательные явления, показатели жизнедеятельности и результаты клинических лабораторных анализов), и оценки и одобрения SRC всех субъектов, которым вводили дозы ранее на предшествующем(их) уровне(ях) дозы. 8-недельный интервал был выбран на основании предыдущих исследований CMV-вакцины, которые продемонстрировали, что после 8 недель более не наблюдается никаких дополнительных иммунологических или системных эффектов от вакцины.

Таблица 1. Схема введения доз для каждой когорты

	Когорта	Дозировка, вводимая в день 1 и день 57	Рандомизация
Повышение дозы	1	1×10^3 ФОЕ	4 вакцина 2 плацебо
	2	3×10^4 ФОЕ	6 вакцина 2 плацебо
	3	1×10^6 ФОЕ	10 вакцина 2 плацебо
	Всего субъектов		26 (20 вакцина/6 плацебо)

Скрининг

Скрининг будет проводиться не более чем за 56 дней перед визитом в день 1 и будет включать письменное согласие, определение соответствия критериям включения, сбор данных по демографии и анамнезу, физикальный осмотр (включая показатели жизнедеятельности), лабораторные анализы и другие оценки. Нежелательные явления (НЯ), связанные с проведением скрининга, следует регистрировать, начиная со времени согласия; любые другие явления, возникающие во время периода скрининга, следует регистрировать как анамнез. Все серьезные нежелательные явления (СНЯ) следует регистрировать, начиная со времени согласия.

Критерии включения и исключения

Для того, чтобы подходить для включения в исследование, каждый субъект должен соответствовать всем из следующих критериев включения: (1) Здоровые мужчины или здоровые женщины, не способные к деторождению, в возрасте от 18 до 50 на момент скрининга. Трансгендерные индивиды могут быть включены, если они соответствуют требованиям неспособности к деторождению и лабораторных показателей на основании пола, указанного при рождении, за исключением индивидов на гормональной терапии; (2) позитивный серостатус CMV; (3) низкий риск инфекции HIV по оценке клиническим персоналом и согласие поддерживать поведение, согласующееся с низким риском воздействия HIV, до последнего запланированного протоколом визита; (4) согласие использовать презерватив во время полового акта до недели 36 или окончания исследования; (5) согласие проходить тестирование на HIV, консультации по снижению риска и получать результаты теста на HIV; (6) согласие на отказ от донорства крови, спермы или других тканей во время исследования; (7) по мнению исследователя центра субъект в целом имеет хорошее состояние здоровья по определению по анамнезу и отсутствие существенных отклонений в результатах физикального осмотра, признаках жизнедеятельности и лабораторных анализах; (8) согласие соблюдать требования протокола и быть доступными для последующего наблюдения в течение запланированной продолжительности исследования; и (9) способность предоставить письменное информированное согласие.

Низким риском инфекции HIV считается: отсутствие персональной истории употребления инъекционных наркотиков в течение 3 лет до скрининга и ни одно из следующего в течение 1 года перед исследованием: персональная история заболевания, передаваемого половым путем, секс с HIV-инфицированным индивидом, секс с активным потребителем инъекционных наркотиков, непостоянное использование презерватива, незащищенная сексуальная активность с неизвестным(и) партнером(ами) и предоставление сексуальных услуг в коммерческих целях.

В целях этого документа женщина считается способной к деторождению (ЖСД) после начала менструаций и до наступления менопаузы, если только она не является перманентно стерильной. Способы перманентной стерилизации включают гистерэктомию, двустороннюю сальпингэктомию и двустороннюю овариэктомию. Постменопаузальное состояние определяется как отсутствие менструаций в течение 12 месяцев без альтернативной медицинской причины. В целях этого документа мужчина считается фертильным после пубертата, если он не был перманентно стерилизован путем двусторонней орхиэктомии с задокументированной азооспермией.

Для того, чтобы подходить для включения в исследование, каждый субъект не должен соответствовать любому из следующих критериев исключения: (1) жить дома с ребенком возрастом меньше 6; (2) рутинное осуществление ухода за ребенком возрастом меньше 6; (3) наличие близкого контакта с индивидами с ослабленным иммунитетом; (4) наличие близкого контакта с беременными женщинами или наличие партнерши, планирующей беременность во время курса исследования; (5) лицо, предоставляющее медицинские услуги, которое обычно контактирует с пациентами с ослабленным иммунитетом или беременными женщинами; (6) субъект имеет ослабленный иммунитет; (7) субъект имеет аутоиммунное нарушение; (8) положительный результат теста на вирус иммунодефицита человека (HIV) во время скрининга; (9) рак или анамнез рака в течение последних 5 лет за исключением неинвазивных видов рака, разрешенных с помощью местной терапии, такой как удаленный безальбно-клеточный рак; (10) текущая активная или хроническая инфекция гепатита В или гепатита С по данным лабораторного анализа на момент скрининга; (11) эпилептическое расстройство с любыми приступами за последние 3 года; (12) любое клинически значимое хроническое медицинское состояние, которое по мнению главного исследователя делает добровольца неподходящим для участия в исследовании; (13) субъект имеет уровень аланинтрансаминазы (АЛТ) в 1,2x выше верхней границы нормы (ВГН), аспартаттрансаминазы в 1,2x выше ВГН, прямого или общего билирубина в 1,1x выше ВГН, щелочной фосфатазы в 1,1x выше ВГН, гамма-глутамилтрансферазы в 1,1x выше НГН, креатинина в 1,1x выше ВГН, уровни гемоглобина менее чем или равные 11,0 г/дл для тех, у кого при рождении был указан женский пол, уровни гемоглобина менее чем или равные 13,0 г/дл для тех, у кого при рождении был указан мужской пол, тромбоциты более чем на 20000 выше ВГН или ниже нижней границы нормы (НГН), белые кровяные тельца более чем на 1000 клеток/мл³ выше ВГН или ниже НГН; (14) плохой доступ к венам по оценке исследователя, (15) предыдущая тяжелая местная или системная реактогенность на вакцины; (16) любая клинически значимая острая инфекция или острая респираторная болезнь в течение 14 дней до введения первой дозы; (17) применение (вал)ацикловира, (вал)ганцикловира, летермовира, фоскарнета или другого противовирусного препарата с анти-СМV активностью в течение 30 дней перед первой дозой ИП и/или любое предполагаемое применение на основании анамнеза до недели 16 исследования (или по меньшей мере 8 недель после получения второй дозы); (18) получение любых живых аттенуированных вакцин в течение 30 дней перед первой дозой ИП и/или предполагаемое получение до недели 16 исследования (или по меньшей мере 8 недель после получения второй дозы); (19) получение любой мРНК-содержащей вакцины от коронавируса в течение 30 дней перед первой дозой ИП; (20) получение

инактивированной вакцины от гриппа или других инактивированных/субъединичных вакцин в течение первых 14 дней от первой дозы ИП; (21) туберкулиновая кожная проба или лечение аллергии инъекциями антигена в течение предшествующих 14 дней или запланированное получение в течение 14 дней после первой дозы ИП; (22) переливание крови или продуктов крови в течение предшествующих 6 месяцев или ожидаемое переливание продуктов крови во время периода исследования; (23) любое участие в другом клиническом исследовании ИП в течение предшествующих 3 месяцев или ожидаемое участие во время исследования (получение плацебо не является исключением); (24) получение другой исследовательской кандидатной вакцины от HIV или CMV; (25) запланированное применение любых запрещенных сопутствующих препаратов по определению выше; (26) предшествующее или текущее психиатрическое состояние, которое мешает соблюдению протокола; (27) чрезмерное употребление алкоголя или наркотических препаратов по мнению исследователя, которое мешает соблюдению протокола и/или ставит под угрозу безопасность субъекта; (28) положительный результат теста на наркотические вещества (т. е. кокаин, барбитураты, бензодиазепины или амфетамины) приведет к исключению субъектов, если только положительный результат не можно объяснить предписанным лечением.

Следующие лекарственные препараты и/или виды лечения запрещены до недели 36 исследования: (1) Иммуносупрессивные препараты, включая, но не ограничиваясь этим, кортикостероиды, ингибиторы кальциневрина, ингибиторы mTog, ингибиторы IMDH или иммуносупрессивные биологические препараты; (2) прием валацикловира, валганцикловира, летермовира, фоскарнета или другого противовирусного средства с анти-CMV активностью в течение 30 дней перед первой дозой ИП и до недели 16 исследования или по меньшей мере в течение 8 недель после получения второй дозы ИП; (3) получение инактивированной вакцины против гриппа или других инактивированных/субъединичных вакцин в течение 14 дней от первой или второй дозы ИП; (4) получение любой мРНК-содержащей вакцины от коронавируса в течение 30 дней перед первой дозой ИП; (5) получение любых живых аттенуированных вакцин в течение 30 дней перед первой дозой ИП и до недели 16 исследования или по меньшей мере в течение 8 недель после получения второй дозы ИП; (6) туберкулиновая кожная проба или лечение аллергии инъекциями антигена в течение предшествующих 14 дней или запланированное получение в течение 14 дней после первой или второй дозы ИП; (7) получение другой исследовательской кандидатной вакцины от HIV или CMV.

Допускаются содержащие кортикостероиды назальные спреи для аллергического ринита, местные кортикостероиды для легкого дерматита, не относящегося к месту

инъекции, пероральные/парентеральные кортикостероиды, применяемые для нехронических состояний, возобновление приема которых не планируется в течение продолжительности терапии 10 дней или менее и прием которых завершен по меньшей мере за 30 дней до включения. Если во время исследования рассматривается возможность одноразового лечения кортикостероидами острого состояния, необходима консультация со специализирующимся по вирусологии медицинским наблюдателем.

Женщины, способные к деторождению, могут быть не включены в исследование. Женщинам после менопаузы разрешено участие. Субъекты мужского пола с партнершами женского пола, способными к деторождению, должны дать согласие на соблюдение одного или более требований к контрацепции с момента введения исследуемого лечения и до последнего визита в рамках последующего наблюдения: (1) Презервативы со стороны мужчины и вазэктомия с задокументированной азооспермией или (2) презервативы со стороны мужчины и плюс использование партнершей дополнительного средства контрацепции. Если партнерша субъекта мужского пола беременеет с момента введения ИП и до 36 недель после последней дозы, субъект должен поставить исследователя в известность. Исследователь должен поставить спонсора или уполномоченного представителя в известность о беременности в течение 24 часов с момента уведомления о беременности. Партнершу субъекта мужского пола следует попросить о согласии на наблюдение до разрешения беременности и в течение до 1 года после рождения, если это допустимо.

Всем субъектам запрещено становиться донорами крови, спермы или других тканей во время исследования. В конце исследования на основании его результатов будут предоставлено клиническое руководство в отношении донорства.

Период лечения (от дня 1 до дня 57)

Пригодность для участия в исследовании, критерии, анамнез и скрининговые результаты лабораторных анализов будут рассматривать в день 1. Пригодных для участия субъектов будут рандомизировать для получения вакцины или соответствующего плацебо в течение 48 часов до введения исследуемого продукта (ИП) в день 1. Субъекты вернутся в клинический исследовательский центр в день 57 (неделя 8) для получения второй дозы того же ИП, что и доза, введенная в день 1. После инъекции ИП субъекты будут оставаться в клинике в течение по меньшей мере 30 минут наблюдения. Оценку реактогенности будут проводить через 30 минут (приемлемый диапазон 25–60 минут). Оценка реактогенности будет включать показатели жизнедеятельности и осмотр места инъекции, а также документацию признаков местной реакции. Субъекты получают дневник пациента для напоминания о ежедневной документации симптомов местной и системной реактогенности

в течение 14 дней после получения каждой дозы.

Период последующего наблюдения после получения дозы

Субъекты возвратятся в клинику для проведения персональных оценок в соответствии с РПО (смотрите Фиг. 2А–2F), включая, но не ограничиваясь этим, физикальный осмотр с показателями жизнедеятельности, лабораторными анализами для оценки безопасности и иммуногенности и обзора НЯ и сопутствующих препаратов.

НЯ и аномальные результаты клинических лабораторных анализов будут оценивать с использованием таблицы подразделения СПИДа (ПСПИД) для оценки тяжести нежелательных явлений у взрослых и детей.

В каждой когорте данные будут открывать после завершения последним пациентом в каждой когорте визита на неделе 36, чтобы оценить наличие текущего выделения вирусного вектора и индуцированной вакциной серопозитивности (VISP). Для участников, которые демонстрируют текущее выделение вирусного вектора в конце исследования, будут проводить оценку и наблюдение, как изложено в РПО. Для участников, у которых развилась VISP, будут проводить оценку и наблюдение.

Необязательное долгосрочное последующее наблюдение (НДПН)

Участникам будет предложено участие в 3-летнем НДПН. Участники, предоставляющие дополнительное согласие, будут осуществлять ежегодный клинический визит для получения образцов для отслеживания долгосрочной иммуногенности и общего состояния здоровья. Пригодность для продолжения участия в НДПН-части исследования может зависеть от того, демонстрирует ли участник выявляемый иммунный ответ на белок HIV Gag, кодируемый вакциной. С учетом времени до получения результатов оценки иммуногенности, предоставившие согласие пациенты могут начать оценки НДПН перед тем, как станут доступными подтверждающие результаты по иммуногенности. Пригодность для продолжения участия в НДПН будут подтверждать после того, как данные по иммуногенности станут доступными и открытыми.

Прекращение участия

За субъектами, которые преждевременно прекращают прием ИП, будут проводить наблюдение для оценки безопасности и иммуногенности, как изложено в РПО, и в некоторых случаях, субъектов, которые прекратили прием ИП в любой момент времени перед завершением лейкофереза, могут заменять. Если субъект прекращает участие в исследовании после получения второй дозы, но до завершения исследования на неделе 36, будет проводиться визит досрочного завершения (ДЗ).

Если субъект прекращает участие в исследовании, например, в результате НЯ, будут предприняты все попытки, чтобы оставить субъекта в исследовании и продолжить

проводить необходимые связанные с исследованием процедуры до стабилизации по решению исследователя. Если это невозможно или неприемлемо для субъекта или исследователя, субъект может быть исключен из исследования. Оценки, показывающие аномальные результаты, которые, как полагается, могут быть возможно или вероятно связанными с исследуемым лечением, на момент визита ДЗ, следует повторять еженедельно или так часто, как считает должным исследователь, до разрешения аномалии, возвращения к уровням на момент исходного визита или иного пояснения.

Если субъект прекращает участие в исследовании, оценки ДЗ и/или процедуры, изложенные в РПО, следует провести в течение 7 дней до того, как субъект навсегда выбывает из исследования.

Критерии прекращения

Включение будет приостановлено в случае соответствия одному или более из следующих критериев: (1) Если два или более субъектов испытывают одно и то же связанное с лечением нежелательное явление степени 3 или выше; если один субъект испытывает связанное с лечением СНЯ; если один субъект испытывает задокументированное органное заболевание, связанное с CMV-вектором, за исключением легкого самоограниченного синдрома типа мононуклеоза, определяемое по признакам, симптомам, результатам лабораторных анализов и выявлению вакцинного вектора в соответствующем(их) участке(ах).

При соответствии критериям прекращения в затронутой когорте более не будут проводить введение ИП на этом уровне дозы, а дополнительное повышение/увеличение дозы будет приостановлено. Будет проведено ситуативное заседание Комитета по рассмотрению вопросов безопасности для рассмотрения доступных данных по безопасности от всех когорт и для предоставления рекомендаций относительно продолжения введения доз.

Отдельные субъекты, которые получили одну дозу вакцины, не будут получать вторую дозу в случае соответствия одному или более из следующих критериев: (1) Интервальное развитие клинически значимого состояния; (2) наличие любого связанного с лечением нежелательного явления степени 3 или выше и/или реакции гиперчувствительности типа 1, связанных с вакциной; (3) неспособность получения дозы в рамках указанного периода для проведения предусмотренного исследованием визита.

Оценки и процедуры исследования

Расписание проведения оценок (РПО), используемое для клинической оценки, проиллюстрировано на Фиг. 2A–2F. На Фиг. 3 приведен перечень используемых лабораторных оценок, а на Фиг. 4 приведена градация тяжести нежелательных явлений

(НЯ) во время клинической оценки вакцины от HIV на основе HCMV.

Анамнез

Полные данные об анамнезе будут получать по всем субъектам во время скрининга и обновлять, при необходимости, перед введением доз и в течение исследования. Полные данные об анамнезе включают подробности в отношении анамнеза, болезней и аллергических реакциях, даты (дат) начала и того, является(ются) ли состояние(я) текущими на данный момент.

Образцы для поискового анализа

Будут получать образцы крови для поискового анализа, включая, но не ограничиваясь, характеристику иммунных ответов, направленных на HIV Gag и CMV, индукцию VISP и идентификацию транскриптомной сигнатуры в периферической цельной крови в ответ на вакцину.

Коммерческое диагностическое тестирование на HIV и оценки VISP

Тестирование на HIV с использованием коммерческого диагностического теста 4-го поколения будут проводить при скрининге и в течение исследования. Тест на HIV при скрининге будут использовать для определения пригодности для участия. Диагностический тест на HIV 4-го поколения будут использовать в несколько моментов времени на протяжении исследования для оценки новоприобретенной инфекции HIV. Приобретение инфекции HIV после введения первой дозы ИП будут регистрировать как нежелательное явление и свяжутся с субъектом после подтверждения инфекции. Положительный результат теста на HIV вследствие VISP не будут регистрировать как нежелательное явление.

Кроме того, на неделе 36 будут получать образец сыворотки для исчерпывающей оценки VISP с использованием нескольких вариантов коммерческого тестирования.

Физикальный осмотр

Полный физикальный осмотр будут проводить во время визитов скрининга, в день 1 и день 57. Он включает общий внешний вид, голову/шею, грудную клетку/дыхательный тракт, сердце/сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечный тракт/печень/селезенку, конечности, кожу и неврологические оценки, а также оценку места инъекции и регионарных лимфатических узлов. Направленный на симптомы физикальный осмотр будут проводить во время всех визитов в соответствии с расписанием проведения

оценок и решением исследователя.

Оценка реактогенности

Исследования для оценки реактогенности будут осуществлять во время визитов в центры согласно РПО. Телефонный звонок для оценки реактогенности будут проводить на неделе 6 для оценки системных признаков и симптомов реактогенности, таких как: лихорадка, озноб, головная боль, утомляемость, недомогание, тошнота, рвота, миалгия и артралгия. Субъекты, сообщающие о системных признаках и симптомах во время телефонного звонка для оценки реактогенности, придут в клинику с незапланированным визитом для оценки НЯ, прохождения полного физикального осмотра и клинических лабораторных анализов.

Рост и масса

Будут измерять рост и массу тела. Из роста и массы тела будут рассчитывать индекс массы тела.

Показатели жизнедеятельности

Измерения показателей жизнедеятельности включают кровяное давление, частоту пульса, температуру и частоту дыхания. Показатели жизнедеятельности следует измерять после того, как субъект отдохнет в комфортабельных условиях в течение приблизительно 10 минут. В случае, если они запланированы на один и тот же визит, оценку показателей жизнедеятельности следует проводить до физикального осмотра и получения образца крови.

Подтверждение неспособности к деторождению

Подтверждение статуса постменопаузы или документация хирургической стерилизации должны быть подтверждены для всех субъектов женского пола.

Оценки виремии и выделения вируса

Если при раскрытии данных на неделе 36 замечают выделение вирусного вектора, за участниками продолжают осуществлять наблюдение каждые 4 недели (+/- 1 неделя) до документации двух последовательных негативных результатов на выявление вируса. Если наблюдается тенденция к снижению, но так и не достигается нижний предел обнаружения, наблюдение следует продолжать до тех пор, пока результаты не продемонстрируют достижение плато как минимум в двух последовательных момента времени получения

образцов (с интервалом 4 недели +/- одна неделя), после чего можно рассмотреть время прекращения оценок выделения с одобрения спонсора.

Дневник участника

Субъекты будут проводить самостоятельную оценку симптомов, связанных с реакциями после каждой дозы ИП. Субъекты будут записывать оценку в отношении местных признаков и симптомов в месте инъекции, а также системные признаки и симптомы.

Лейкаферез

Лейкаферез будут проводить для всех субъектов между неделями 16 и 20. Эта процедура позволяет отделить белые кровяные клетки от крови, в частности МКПК, которые будут собирать для поискового иммунологического анализа.

Незапланированные визиты

Незапланированные визиты допускаются по решению исследователя, если это необходимо для оценки безопасности.

Нежелательные явления и серьезные нежелательные явления

Нежелательное явление представляет собой любое неблагоприятное медицинское явление у участвующего в клиническом исследовании субъекта, которому вводят исследуемый продукт, которое не обязательно имеет причинно-следственную связь с лечением. Следовательно, НЯ может представлять собой любые неблагоприятные и/или непредусмотренные признак, симптом или заболевание, связанные по времени с применением исследуемого продукта, независимо от того, считаются ли они связанными с исследуемым продуктом или нет. НЯ также могут включать осложнения до или после лечения, которые возникают в результате предусмотренных протоколом процедур, отсутствие эффективности, передозировку, сообщения о злоупотреблении наркотическими препаратами/нецелевом применении или профессиональное воздействие. Предсуществующие состояния, которые меняются по природе или тяжести, также считаются НЯ.

НЯ не включает следующее: (1) Медицинские или хирургические процедуры, такие как хирургическое вмешательство, эндоскопия, удаление зуба и переливание. Состояние, которое стало причиной процедуры, может представлять собой нежелательное явление и должно регистрироваться; (2) предсуществующие заболевания, состояния или аномальные

результаты лабораторных анализов, присутствующие или выявленные до скринингового визита, которые не ухудшаются; ситуации, когда неблагоприятное медицинское явление не произошло (например, госпитализация для планового хирургического вмешательства); (3) передозировка исследуемого продукта без клинических последствий; (4) любые медицинское состояние или клинически значимый аномальный результат лабораторного анализа с датой начала до подписания формы согласия и не относящиеся к связанной протоколом процедуре; (5) аномальные результаты лабораторных анализов, которые не связаны с признаками или симптомами; и (6) медицинские процедуры.

После начала приема исследуемого продукта все НЯ и новое начало хронических заболеваний (ННХЗ), независимо от причины или взаимосвязи, будут регистрировать до 36 недель после первого введения ИП. Во время НДПН будут регистрировать только НЯ, связанные с процедурами исследования, ННХЗ и СНЯ. Все СНЯ, независимо от причины или взаимосвязи, которые возникли после того, как субъект впервые согласился на участие в исследовании, и на протяжении исследования, следует регистрировать. В случае всех НЯ, СНЯ и ННХЗ следует проводить наблюдение до разрешения или стабилизации, если это возможно.

Серьезное нежелательное явление (СНЯ) представляет собой любое явление, которое приводит к следующему: (1) Смерть; (2) опасное для жизни состояние; (3) госпитализация или продление текущей госпитализации. НЯ, для которых необходима госпитализация, следует считать СНЯ. В общем случае госпитализация свидетельствует о том, что субъект был помещен (что обычно включает по меньшей мере одну ночевку) в больницу или отделение неотложной помощи для наблюдения и/или лечения, которое было бы ненадлежащим в амбулаторных условиях или в кабинете врача. В случае сомнений, оказалась или была ли «госпитализация» необходимой, НЯ следует считать СНЯ; (4) постоянная или значительная недееспособность/инвалидность; (5) врожденная аномалия/врожденный дефект у потомка субъекта, который получал вектор 1; (6) другие важные явления могут считаться СНЯ, когда, на основании соответствующего медицинского суждения, они могут подвергать субъекта опасности и могут требовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из результатов, перечисленных в этом определении.

Как отмечено выше, аномальные результаты лабораторных анализов без связанных НЯ (признаков или симптомов) и/или которые не требуют медицинского вмешательства, не регистрируют как НЯ или СНЯ. При этом аномальные результаты лабораторных анализов, которые требуют медицинского или хирургического вмешательства, необходимо регистрировать как НЯ или СНЯ, в зависимости от обстоятельств. Положительный

результат теста на HIV вследствие VISP не будут записывать как нежелательное явление, тогда как появление действительной инфекции HIV после введения первой дозы будут записывать как нежелательное явление. Тяжесть НЯ следует оценивать, используя скорректированную таблицу градации НЯ ПСПИД версии 2.1 (смотрите Фиг. 4). Помимо таблицы, все случаи смерти, связанные с НЯ, следует классифицировать как соответствующие степени 5.

ПРИМЕР 3: ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ СТОЙКОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА (HIV)

Две вакцины от HIV на основе HCMV, вектор 2 и вектор 3, будут оценивать в отношении безопасности, реактогенности, переносимости и иммуногенности в зонтичном исследовании фазы 1. Вакцины можно вводить для предотвращения стойкой инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека (HIV).

Клинический уровень техники

Наиболее эффективное нацеливание на патогены происходит посредством специализированного иммунного ответа, что подчеркивает важные нюансы и сложности иммунной системы. Доклинические исследования продемонстрировали, что делеции конкретных генов и/или нацеленные генетические модификации в векторной конструкции на основе цитомегаловируса резусов (RhCMV) часто являются необходимыми для управления защитным патоген-специфическим иммунным ответом против *in vivo* стимуляции релевантным инфекционным агентом. Модификации CMV также могут приводить к аттенуированию вируса за счет ограничения клеточного тропизма и/или механизмов антагонизации, которые вирус обычно использует для нарушения иммунных ответов хозяина (смотрите таблицу 2). Исследования фазы 1 на людях позволяют определить начальные безопасность, профиль выделения и клинически релевантную иммуногенность любого кандидатного продукта HCMV.

Таблица 2. Прогнозируемые эффекты основных генетических модификаций векторной вакцины на основе HCMV

Основная характеристика молекулы	Прогнозируемый эффект
ΔUL82	Снижение репликации вследствие нарушения способности преодолевать врожденную защиту клеток-хозяев
ΔUL78	Менее эффективное проникновение в эпителиальные клетки и изменение экспрессии хемокиновых рецепторов

ΔUL128-130	Ограничение проникновения в эпителиальные и эндотелиальные клетки Иммунное программирование антиген-специфических ГКГС-Е-рестриктированных CD8+ Т-клеток вместе с ΔUL146-147
ΔUL146-147	Иммунное программирование антиген-специфических ГКГС-Е-рестриктированных CD8+ Т-клеток вместе с ΔUL128-130
Интактный UL146-147	Иммунное программирование антиген-специфических HLA-1-рестриктированных CD8+ Т-клеток
ΔUL18	Повышенный ответ CD8+ Т-клеток на чужеродный антиген

Цитомегаловирус человека представляет собой широко распространенный вирус, который инфицирует население по всему миру. Уровень распространенности находится в диапазоне от 50 % до 99 % и варьируется в зависимости от страны и социально-экономического статуса, при этом среди людей из более бедных стран и имеющих более низкий социально-экономический статус уровень распространенности выше (Pass RF. Cytomegalovirus. В: Knipe DM, et al., eds. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2676-705 (2001); Staras SA, et al., Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. Clin Infect Dis. 43(9), 1143-51 (2006)). В США приблизительно 50 % всех индивидов являются CMV-серопозитивными к 30 годам, при этом среди взрослых уровень сероконверсии составляет приблизительно 2 % в год (Hyde TB, et al., Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. Rev Med Virol. 20(5), 311-26 (2010); Lamarre V, et al., Seroconversion for cytomegalovirus infection in a cohort of pregnant women in Quebec, 2010-2013. Epidemiol Infect. 144(8), 1701-9 (2016)). Первичная инфекция CMV в общем случае является бессимптомной, хотя может являться причиной самоограниченного синдрома типа мононуклеоза. Когда возникает более тяжелое заболевание, оно обычно поражает индивидов с незрелой или нарушенной иммунной защитой, которая наблюдается в случае врожденной инфекции и первичной или повторной инфекции индивидов с подавленным иммунитетом вследствие генетических дефектов, ятрогенных лекарственных препаратов или поздних стадий СПИДа. В целом, CMV демонстрирует очень низкую вирулентность, связанную с мощными барьерами со стороны организма-хозяина, которые допускают инфицирование, но ограничивают заболевание CMV после миллионов лет совместной эволюции вируса и его хозяина-человека. Кроме того, совместная эволюция сделала CMV в высокой степени специфическим в отношении вида, поэтому он вызывает инфекцию только у хозяев-людей.

Исследования фазы 1 с химерными штаммами Towne и Towne-Toledo как у серопозитивных, так и у серонегативных в отношении CMV индивидов продемонстрировали общую безопасность с отсутствием СНЯ, когда гены UL82 и UL78 были интактными, а пентамерные компоненты, UL128 или UL130, были разрушены. Кроме того, исследования стимуляции с использованием штамма CMV более дикого типа продемонстрировали отсутствие СНЯ, при этом все наблюдаемые клинические симптомы и аномальные результаты лабораторных анализов были легкими или умеренными, самоограничивающимися и не требовали лечения.

Предыдущий опыт с вакцинами от HCMV в клинических исследованиях на людях стал результатом попыток разработать вакцину для предотвращения заболевания CMV у беременных женщин и индивидов с ослабленным иммунитетом за последние 45 лет. На сегодня вакцины от HCMV состояли из аттенуированных штаммов, которые интенсивно пассировали в тканевой культуре (Neff BJ, et al., *Clinical and laboratory studies of live cytomegalovirus vaccine Ad-169*. Proc Soc Exp Biol Med. 160(1), 32-7 (1979); Plotkin SA, et al., *Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge*. J Infect Dis. 159(5), 860-5 (1989); Quinnan 1984), химер аттенуированных штаммов дикого типа (Heineman TC, et al., *A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines*. J Infect Dis. 193(10), 1350-60 (2006); Adler SP, et al., *A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus-Seronegative Men*. J Infect Dis. 214(9), 1341-8 (2016)) и дефицитного по репликации CMV (Adler SP, et al., V160-001 Study Group. *Phase 1 Clinical Trial of a Conditionally Replication-Defective Human Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in CMV-Seronegative Subjects*. J Infect Dis. 220(3), 411-419 (2019)). В исследованиях ранней клинической эффективности для оценки аттенуированной кандидатной вакцины Towne также использовали штамм Toledo низких пассажей в качестве суррогата для стимуляции CMV дикого типа. Вместе эти предыдущие клинические исследования обеспечивают широкие практические знания по безопасности в диапазоне аттенуированных штаммов CMV среди разных популяций, включая CMV-серопозитивные, CMV-серонегативные (мужчины, женщины и дети мужского пола) и реципиентов печени (Plotkin SA, et al., *Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants*. Lancet. 1(8376), 528-30 (1984)). Аналогично кандидатным вакцинам вектору 1, вектору 2 и вектору 3, штамм Towne и химеры Towne-Toledo содержат разрушение в одном или более генах, которые составляют пентамерный комплекс, который необходим для проникновения вируса в эпителиальные и эндотелиальные клетки, тем самым, ограничивая клеточный тропизм (Adler SP, et al., *A Phase 1 Study of 4 Live,*

Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus-Seronegative Men. *J Infect Dis.* 214(9), 1341-8 (2016); Suárez, N.M., et al., Genomic analysis of chimeric human cytomegalovirus vaccine candidates derived from strains Towne and Toledo. *Virus Genes* 53, 650–655 (2017)). Однако, в четырех химерах Towne-Toledo сохранялись гены UL82 и UL78, которые отсутствуют в векторах с CMV-остовом, в которых один или другой из промоторов используется для управления экспрессией антигена HIV (смотрите таблицу 2 и таблицу 3). Исследования по оценке штамма Towne и химерного штамма Towne-Toledo как у CMV-серопозитивных, так и у CMV-серонегативных индивидов продемонстрировали общую безопасность с отсутствием наблюдаемых СНЯ, отсутствием легких/умеренных клинических симптомов и редкими легкими или умеренными аномальными результатами лабораторных анализов. Эти исследования показывают, что аттенуирование HCMV наблюдалось, когда гены UL82 и UL78 были интактными, а пентамерные компоненты, UL128 или UL130, были разрушены. Ни один из четырех химерных вирусов не был выделен из крови, мочи или слюны (Adler SP, et al., A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus-Seronegative Men. *J Infect Dis.* 214(9), 1341-8 (2016)). Секвенирование стимулирующего штамма Toledo не проводили до тех пор, пока его не подвергли дополнительному пассированию в тканевой культуре, что могло привести к дополнительным мутациям, не присутствующим в использованном стимулирующем вирусе. Хотя он вызывал симптоматическую инфекцию у серопозитивных и серонегативных реципиентов, СНЯ отсутствовали, а все наблюдаемые клинические симптомы и аномальные результаты лабораторных анализов вследствие стимуляции этим штаммом Toledo более дикого типа были легкими или умеренными, самоограничивающимися и не требовали лечения. Вместе эти данные по предыдущим кандидатным HCMV-вакцинам и стимуляции штаммом Toledo свидетельствуют в пользу безопасного применения HCMV-векторов в исследованиях вакцин на людях.

HCMV-векторы

HCMV-вакцины, вектор 2 и вектор 3, содержат рекомбинантные HCMV-векторы, полученные из клинического изолята TR-HCMV, генетически модифицированного для создания остова трансгенного CMV-вектора. Остов CMV-вектора был сконструирован так, чтобы иметь уникальную способность как доставки антигена, так и иммунного программирования (ДАИП), и тем самым действовать как носитель для доставки иммуногенов, релевантных для терапевтического и/или профилактического показания. Разные молекулярные признаки вектора 2 и вектора 3 описаны в таблице 3.

Таблица 3: Признаки вектора 2 и вектора 3

Основные генетические модификации	Вектор 3	Вектор 2
Трансген	Консервативная эписенсусная слитая последовательность gag/nef/pol 1 HIV M	Консервативная эписенсусная слитая последовательность gag/nef/pol 1 HIV M
Остов вектора	Остов CMV-вектора	Остов CMV-вектора
Компоненты пентамерного комплекса	Δ UL128-130	Δ UL128-130
Положение трансгена	Δ UL78	Δ UL82
Потенциальное иммунное программирование (в комбинации с Δ UL128-130)	Δ UL146-147	Δ UL146-147
	Δ UL18	Δ UL18

Дизайн исследования

Это зонтичное исследование фазы 1 будет представлять собой слепое исследование с многократными возрастающими дозами, в котором два кандидатных вектора, вектор 2 и вектор 3, будут оценивать по отдельности как в CMV-серопозитивных, так и в CMV-серонегативных когортах участников. Начальная доза, диапазон доз и схема введения доз вектора 2 и вектора 3 в зонтичном исследовании фазы 1 будут основаны на существующих неклинических данных, полученных с помощью HCMV-векторной вакцинной платформы, помимо конкретных неклинических исследований вектора 2 и вектора 3, а также доступных данных по клинической безопасности и иммуногенности, полученных в текущем исследовании фазы 1 другой HCMV-вакцины от HIV, оцениваемой на CMV-серопозитивных пациентах.

Лекарственная форма, путь введения и схема введения доз

Вектор 2 и вектор 3 будут предоставлены в одноразовых стеклянных флаконах в гистидин-трегалозовом (ГТ) буфере (20 mM L-гистидина, 10 % масс./об. трегалозы, pH 7,2). Содержимое флакона будут разводить для доставки указанного количества и готовить для введения в виде ≤ 1 мл подкожной (п/к) инъекции в дельтовидный участок плеча. Схема введения доз вакцины будет состоять из двух доз, праймирующей и бустерной дозы.

Исследуемая популяция

Исследования с вектором 2 и вектором 3 будут проводить у CMV-серопозитивных

взрослых для включения мужчин, а также женщин, не способных к деторождению, при этом ключевые критерии включения/исключения разработаны так, чтобы минимизировать любой потенциальный риск для участников и их близких контактов.

Помимо CMV-серопозитивных индивидов в исследование будут включены группы исследования для оценки безопасности и иммуногенности вектора 2 и вектора 3 у CMV-серонегативных индивидов. Одной из целей включения серонегативных индивидов в это исследование является облегчение выбора однократной дозы, которая является как безопасной, так и иммуногенной среди всех индивидов вне зависимости от изначального CMV-статуса. В целом, CMV демонстрирует очень низкую вирулентность, связанную с мощными барьерами со стороны организма-хозяина, которые допускают инфицирование, но ограничивают заболевание CMV после миллионов лет совместного эволюционирования вируса и его хозяина-человека. Первичная инфекция CMV у здоровых индивидов является в большей степени бессимптомной, хотя также может являться причиной самоограниченного синдрома типа мононуклеоза. Предыдущие CMV-вакцины успешно исследовали у CMV-серонегативных участников, которые включали мужчин, женщин, детей мужского пола и реципиентов печени. Начальная доза для CMV-серонегативных участников будет составлять 5×10^4 ФОЕ, что в 20 раз меньше, чем доза 1×10^6 ФОЕ вектора 1, и будет включать запланированное повышение дозы на основании мониторинга безопасности, как более подробно изложено ниже.

Целью включения участников в исследование является гарантия безопасности участников и их близких контактов, в частности предотвращение потенциального заболевания CMV у подверженных высокому риску индивидов (беременные женщины и индивиды с ослабленным иммунитетом), посредством применения жестких критериев для включения в исследование. Критерии включения были модифицированы так, чтобы продолжать гарантировать безопасность участников и в то же время усовершенствовать критерии включения в случаях низкого риска. Передача CMV происходит через прямой контакт с инфицированными жидкостями организма, получение инфицированной крови/ткани или через вертикальную передачу от матери плоду. Для прямой передачи через жидкости организма необходим близкий контакт путем интимной близости, а не просто сближенности. Медицинский персонал (МП), практикующий универсальные меры предосторожности, не представляет риск передачи CMV пациентам при стандартных взаимодействиях с пациентами. Хотя воспитатели детского сада имеют больший риск заражения CMV от детей, они не представляют риск передачи вируса детям во время своей работы (Adler SP, Cytomegalovirus and Child Day Care. NEJM 321, 1290-1296 (1989)). Риск передачи в детском саду это от ребенка → ребенку, а также от ребенка → воспитателю. С

учетом вирусологии и эпидемиологии передачи CMV МП и воспитатели детского сада включены как пригодные для участия в исследованиях HCMV-вакцины, поскольку они не представляют дополнительный риск передачи другим. Более подробно, участники, которые имеют «интимный контакт» с беременными женщинами или индивидами с ослабленным иммунитетом, будут исключены, поскольку эти состояния могут привести к передаче CMV между взрослыми.

CMV обычно приобретается в детском возрасте и вызывает большей частью бессимптомную или, редко, слабую инфекцию. Помимо рождения и кормления грудью, приобретение CMV у детей наиболее часто происходит от других маленьких детей, в частности в детских садах/дошкольных заведениях. Серопреvalенность IgG CMV у детей в возрасте 1–5 лет составляла 28,2 % в 2017/2018 гг., до 20,7 % в 2011/2012 гг. (Petersen MR, et al., Changes in Cytomegalovirus Seroprevalance Among U.S. Children Aged 1-5 Years: The National Health and Nutrition Examination Surveys. Clin Infect Dis. 72(9), e408-e411 (2021)). Передача CMV между взрослым и ребенком теоретически может происходить посредством действий, которые подразумевают обмен слюной (например, поцелуи в рот, общие кухонные приборы или напитки, пережевывание пищи для грудных детей). Однако этот способ передачи не считается существенным источником первичной инфекции у детей, а скорее может быть способом передачи от ребенка взрослому. С учетом того, что в естественных условиях дети подвергаются воздействию CMV на ранних стадиях жизни и не представляют группу высокого риска после инфицирования, в исследование могут быть включены дети в возрасте менее 6 лет.

Схема повышения дозы у CMV-серонегативных участников

Оценка вектора 2 и вектора 3 у CMV-серонегативных участников будет основана на многократных возрастающих дозах, начиная с дозы 5×10^4 ФОЕ (Фиг. 5). Чтобы защитить безопасность добровольных участников в клиническом исследовании, КРВБ будет проводить рассмотрение данных по безопасности перед началом введения доз в новой когорте в соответствии с уставом КРВБ. Поэтапный переход к более высокому уровню дозы будут начинать после оценки КРВБ всех доступных данных по безопасности за 8 недель (включая нежелательные явления, показатели жизнедеятельности, результаты клинических лабораторных анализов и результаты анализа выявления вируса CMV) от по меньшей мере первых 6 участников в самой последней когорте и всех ранее получивших дозу участников при предшествующих более низких уровнях дозы. 8-недельный интервал был выбран на основании предыдущих исследований аттенуированных HCMV-вакцин, которые включали CMV-серонегативных участников, и того факта, что новые иммунологические и системные

эффекты вакцины предположительно не будут проявляться после 8 недель (Adler SP, et al., A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus-Seronegative Men. *J Infect Dis.* 214(9), 1341-8 (2016); Heineman TC, et al., A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis.* 193(10), 1350-60 (2006); Quinnan GV Jr, et al., Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Ann Intern Med.* 101(4), 478-83 (1984)). Помимо необходимых данных по безопасности от CMV-серонегативных участников, КРВБ также будет иметь общие данные по безопасности от CMV-серопозитивных участников, которые получали расширенный диапазон доз (5×10^4 ФОЕ, 5×10^5 ФОЕ или 5×10^6 ФОЕ) вектора 2 или вектора 3, как описано ниже (Фиг. 5). CMV-серопозитивных участников будут включать одновременно с момента времени получения наименьшей начальной дозы CMV-серонегативными субъектами, что обеспечит дополнительную информацию по безопасности для рассмотрения КРВБ. На основании этого рассмотрения данных по безопасности будут сделаны рекомендации в отношении того, начинать ли введение в следующей когорте или нет.

В отношении второй дозы (бустер) исследователь из центра будет рассматривать записи данных каждого участника и, если ни один из индивидов не соответствует критериям прекращения, участник получит вторую подкожную дозу в день 84 (неделя 12). Вторая доза будет представлять собой такой же продукт и уровень дозы, что и во время введения первой дозы.

КРВБ будет обеспечивать текущий контроль исследования в отношении потенциальных проблем безопасности или в случае достижения условия прекращения исследования. Условия прекращения когорты будут включать (1) ≥ 2 участников испытывают одно и то же связанное с лечением нежелательное явление степени 3 или выше, 2) любой участник испытывает связанное с лечением СНЯ или 3) любой субъект испытывает задокументированное органное заболевание, связанное с HCMV-вектором, за исключением легкого самоограниченного синдрома типа мононуклеоза, определяемое по признакам, симптомам, результатам лабораторных анализов и выявлению вакцинного вектора в соответствующем(их) участке(ах). Вектор 2 и вектор 3 также сохраняют восприимчивость к ганцикловиру.

Схема введения доз для параллельной оценки доз у CMV-серопозитивных участников

CMV-серопозитивных участников будут включать и рандомизировать отдельно для получения вектора 2 или вектора 3, при этом будут оценивать безопасность и

иммуногенность доз 5×10^4 ФОЕ, 5×10^5 ФОЕ или 5×10^6 ФОЕ (Фиг. 5). Когорты всех 3 доз будут инициировать одновременно у CMV-серопозитивных участников. Доступность данных по безопасности для этого расширенного диапазона доз также дает основание для повышения дозы в CMV-серонегативных когортах.

Первичные конечные точки исследования: Безопасность, реактогенность и переносимость

Оценки для двух кандидатных HCMV-вакцин, вектора 2 и вектора 3, будут включать общий клинический мониторинг 1) реактогенности вакцины, 2) признаков и симптомов заболевания CMV и 3) вирусологическое выявление HCMV-вектора. Оценки реактогенности вакцины будут включать как местные, так и системные параметры и будут проводиться путем непосредственных клинических оценок и с помощью дневников, которые ведут участники. Оценку возможного связанного с CMV заболевания будут проводить посредством клинических лабораторных анализов, физикального осмотра и направленного на симптомы расспроса. Вместе эти оценки позволят выявить как симптоматические, так и бессимптомные признаки/симптомы CMV-опосредованного заболевания у участников исследования.

Способность любого из кандидатных HCMV-векторов к выделению будут оценивать посредством анализов вирусологического выявления на основе ПЦР. Участники будут предоставлять образцы слюны и мочи при визитах в рамках исследования для оценки выделения вектора, а также образцы крови для оценки вируса в кровотоке. Исследования на основе ПЦР позволят отличить CMV дикого типа от вакцинных векторов, вектора 2 и вектора 3. Что важно, выявление нуклеиновой кислоты HCMV в анализе ПЦР не указывает на присутствие интактного или инфекционного вируса; однако это наиболее чувствительный и консервативный подход для оценки выделения вектора или CMV дикого типа. Кроме того, способность HCMV-вектора к выделению не равна трансмиссивности или способности вызывать заболевание при контакте. Оценку передачи вектора будут рассматривать в будущих исследованиях в случае выявления существенного выделения вакцинного вектора.

Вторичные и поисковые конечные точки: Характеристики иммунного ответа

Многие патогены, которые избегают естественных иммунных ответов могут быть восприимчивыми к контролю высокими частотами антиген-специфических Т-клеток, которые, как ожидается, будет вызывать вакцинация релевантным HCMV-вектором. Вне зависимости от экспрессируемого чужеродного антигена HCMV-векторы обладают

потенциалом генерировать функциональные эффектор-дифференцированные CD4⁺ Т-клетки памяти, а также CD8⁺ Т-клетки, способные распознавать опосредованную HLA-E, HLA класс 1 или HLA класс 2 антигенную презентацию. Предполагается, что иммунный ответ включает репертуар Т-клеток, охватывающий диапазон эпитопов, не наблюдаемый в случае традиционных живых аттенуированных или белковых/адьювантных вакцин, при этом ожидается, что эти антиген-специфические Т-клетки, будут сохраняться как в кровотоке, так и в тканях (Hansen SG, et al., A live-attenuated RhCMV/SIV vaccine shows long-term efficacy against heterologous SIV challenge. *Sci Transl Med.* 11(501), eaaw2607 (2019)).

Целью вторичных конечных точек является характеристика иммунного ответа, индуцированного вектором 2 и вектором 3, определяемого по ответам Т-клеток и антител на полученную из вакцины консервативную эписенсусную слитую последовательность gag/nef/pol 1 HIV-1 М (содержащую эпитопы из Gag, Pol и Nef). Интенсивность, функцию и фенотипический профиль ответов CD4 и CD8 Т-клеток на консервативную эписенсусную слитую последовательность gag/nef/pol 1 М будут оценивать посредством внутриклеточного окрашивания цитокинов (ВОЦ) и проточной цитометрии. Также будут оценивать серологический титр эпитоп-специфических связывающих антител к консервативной эписенсусной слитой последовательности gag/nef/pol 1 М.

Поисковые конечные точки предназначены для получения более полной характеристики природы генерируемого иммунного ответа и будут включать оценку диапазона Т-клеточных эпитопов, HLA-рестрикцию эпитопов, расширенные функциональные и фенотипические профили, а также транскриптомный профиль в периферической цельной крови для идентификации любых потенциальных иммунных сигнатур принимаемой вакцины. Кроме того, можно оценивать наличие, распределение и интенсивность CD4 и CD8 Т-клеток посредством биопсии слизистой оболочки и аспирации лимфатических узлов, чтобы понять, как антиген-специфические Т-клетки перемещаются в тканях в местах первичной инфекции и периферических иммунных тканях для усиления иммунного ответа.

Уровень техники в отношении химии, производства и контроля

Остов вектора

Штамм TR HCMV был выбран в качестве векторного остова, поскольку его геномная организация представляет типичный клинический изолят (Murphy E, et al., Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25), 14976-81 (2003)). Геном TR HCMV клонировали в бактериальную искусственную хромосому (BAC), чтобы обеспечить возможность модификации в *E.coli* (Фиг. 6А). В результате этого процесса была удалена геномная область US2-US6 (Фиг. 6В) (Murphy

2003). Чтобы восстановить область, удаленную во время клонирования ВАС, гены US2-US7 из штамма AD169 HCMV вставляли в HCMV TR-ВАС вместе с добавлением ЗФБ и сайтов LoxP, фланкирующих кассету ВАС (Фиг. 6C) (Lauron EJ, et al., Human cytomegalovirus infection of Langerhans-type dendritic cells does not require the presence of the gH/gL/UL128-131A complex and is blocked after nuclear deposition of viral genomes in immature cells. *J Virology* 88(1), 403-16 (2014)). Поскольку штамм TR HCMV был впервые выделен у пациентов со СПИДом на поздней стадии и был изначально резистентным к ганцикловиру вследствие мутации в гене киназы UL97 (Smith IL, et al., High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis.* 176(1), 69-77 (1997)), чувствительность к противовирусным эффектам ганцикловира восстанавливали путем замещения мутированного UL97 TR интактным UL97 из HCMV AD169 (Фиг. 6D) (Bradley AJ, et al., High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J Gen Vir.* 90(10), 2375-80 (2009)). Кроме того, удаляли ген ЗФБ и добавляли в кассету ВАС рекомбиназу Cre под управлением раннего промотора SV40, чтобы обеспечить ее самостоятельное существование в клетках млекопитающих (Фиг. 6D) (Caposio P, et al., Characterization of a live-attenuated HCMV-based vaccine platform. *Sci Rep* 9, 19236 (2019)). Полученный вектор представляет собой остов CMV-вектора (Фиг. 6E).

Конструирование и изучение характеристик вектора

ВАС-остов CMV-вектора был модифицирован для создания конечных вакцинных векторов HCMV-HIV, вектора 2 и вектора 3. Модификации CMV-вектора осуществляли с помощью последовательных этапов рекомбинации ВАС-остова CMV-вектора в *in E. coli*. Проводили стандартную рекомбинационную инженерию ВАС с использованием рекомбинации галактокиназы/канамицина (galK/Kan) (Warming S, et al., Simple and highly efficient ВАС recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* 33(4), e36 (2005)) для внесения делеций или замещений трансгена. Конечные ВАС-векторы секвенировали посредством секвенирования нового поколения (NGS), чтобы подтвердить предусмотренные модификации по сравнению с остовом CMV-вектора.

Клеточный субстрат

Вектор 2 и вектор 3 получали в человеческой диплоидной линии клеток фибробластов, MRC-5. Рабочий банк клеток (WCB) MRC-5 получали согласно cGMP и тестировали согласно руководствам Международного совета по гармонизации (ICH)/Управления по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств

США. Рекомбинантные вирусы выделяют из клеток Рабочего банка клеток (WCB), трансфицированных рекомбинантным вирусным геномом, клонированным в виде ВАС в *E. coli*.

Получение вектора 2 и вектора 3

Лекарственный продукт вектор 2/вектор 3 будут получать, используя Главный посевной вирусный материал (MVS) для каждого продукта, а Исследовательский посевной материал (RSS) представляет собой исходный материал для MVS. Чтобы начать производство RSS, ДНК ВАС вектора размножают в *E. coli* из исходного раствора глицерина, созданного во время финальных этапов рекомбинации ВАС-конструкции, описанных выше. ДНК ВАС выделяют и очищают от *E. coli*, используя стандартные протоколы рекомбинантных ДНК. Характеристики конечного RSS-продукта будут включать количественную оценку, рестрикционное расщепления для определения целостности и NGS для определения идентичности (смотрите таблицу 4).

Таблица 4: Этапы генерации RSS и тестирование

Этапы	Финальное тестирование
Получение ДНК ВАС вектора	Концентрирование ДНК для количественной оценки, рестрикционное расщепления для определения целостности и NGS для определения идентичности
↓	
Восстановление вируса в MRC-5 WCB P00161+/- UL82 мРНК -P0	ПА-ИФА для определения инфекционного титра, иммуноблоттинг антигена для определения функции и NGS для определения идентичности
↓	
Аmplification вируса в клетках MRC-5 в сосудах Hyperstack для генерации RSS – P1	ПА-ИФА для определения инфекционного титра, иммуноблоттинг антигена для определения функции, NGS для определения идентичности, анализы безопасности, включая микоплазму, вирусы крупного рогатого скота и стерильность

Процессы производства Главного посевного вирусного материала (MVS) и Материала клинического исследования (СТМ) для вектора 2 и вектора 3 представлены на Фиг. 7. Процесс производства для каждого MVS (т. Е. соответствующий каждому продукту) является идентичным процессу, используемому для получения СТМ, за исключение того, то MVS высевают с RSS.

Процесс производства cGMP состоит из восстановления и размножения вируса в клетках WCB для получения MVS. MVS дополнительно размножают путем инфицирования дополнительных клеток WCB для производства СТМ для каждого вакцинного продукта. Сбор, полученный из инфицированных производственных культур WCB, осветляют посредством микрофльтрации. Осветленный сбор концентрируют и очищают посредством двойной диафльтрации в конечный буфер для составления для получения промежуточного нерасфасованного продукта (т. е. нерасфасованного материала до фасовки/упаковки). После краткосрочного этапа выдержки промежуточный нерасфасованный продукт фасуют в одноразовые флаконы для получения лекарственного продукта (ЛП, также называемого СТМ).

Для производства MVS и СТМ вектора 2 и вектора 3 промежуточный нерасфасованный продукт держат в пакетах (заполненных на 30 % соотношения объема и размера пакета) и хранят при 2–8 °C в течение до 16 ч перед дальнейшей обработкой. Перед этапов фасовки/упаковки во флаконы пакет с нерасфасованным продуктом (содержащий нерасфасованный продукт) доводят до комнатной температуры (КТ) в течение ≥ 2 часов с постоянным перемешиванием путем встряхивания, а затем фасуют по флаконам, используя полностью автоматизированную установку для фасовки/упаковки.

Как MVS, так и СТМ фасуют по флаконам при объеме заполнения 0,7 мл (извлекаемом). Ожидается, что весь процесс фасовки/упаковки, включая проведение КК, займет < 12 часов. После завершения фасовки/упаковки флаконы хранят при ≤ -60 °C.

Промежуточное время выдержки

Для производства вектора 2 и вектора 3 (для проведения клинических исследований фазы 1) в качестве конечного состава используют ГТ-буфер (гистидин и трегалоза). Этот состав обеспечивает достаточную стабильность промежуточного нерасфасованного продукта, чтобы обеспечить возможность большего времени выдержки. Следовательно, этап выдержки осуществляли между последующим процессом (ПП) и фасовкой/упаковкой, чтобы обеспечить адекватную гибкость в рамках предусмотренного процесса производства GMP. Вышеупомянутые усовершенствования относительно более раннего процесса производства HCMV обобщены в таблице 5.

Таблица 5. Сравнение последующего процесса

Параметры/признаки	Более ранний HCMV-вектор	Вектор 2/вектор 3
Состав	Буфер TNS 50 mM Трис, 150 mM NaCl, 10 % сахарозы, pH 8,0	Буфер ГТ 20 mM L-гистидина, 10 % трегалозы, pH 7,2
Этап выдержки	Без выдержки	До 16 часов

Исследования времени выдержки

На данный момент были проведены различные исследования, которые свидетельствуют в пользу стабильности промежуточного нерасфасованного продукта HCMV в различных условиях выдержки (например, температуры и продолжительности). В этих исследованиях используется инфекционный титр как основной тестируемый признак, указывающий на стабильность, что дополнительно описано ниже.

Время выдержки в пакетах для биообработки

Проводили исследование, чтобы оценить эффект времени выдержки до 72 ч в пакетах для биообработки на инфекционный титр. В этом исследовании использовали два типа пакетов, CX5-14 Labtainer™ PE (полиэтилен) и Flexboy® EVA (этиленвинилацетат), которые исследовали при разных объемах наполнения и разной продолжительности выдержки.

Все пакеты заполняли репрезентативным нерасфасованным продуктом при 10 % и 75 % соотношении объема и размера пакета (чтобы охватить заполнение 30 % для получения GMP) и отбирали образцы после горизонтального хранения в течение 72-часовой выдержки при 2–8 °C. Образцы анализировали в отношении инфекционного титра посредством иммунофлуоресцентного анализа поздних антигенов (LA IFA), чтобы определить снижение титра относительно титра при T = 0, соответствующего началу исследования.

Как показано на Фиг. 8, результаты сравнимы между PE-пакетом (CX5-14 Labtainer™), используемым при производстве MVS и СТМ вектора 2 и вектора 3, и EVA-материалом (Flexboy®); время выдержки 72 часа при 2–8 °C приводит к максимальному снижению титра, составляющему 0,21 log, для инфекционного титра среди всех условий.

Кумулятивное исследование времени выдержки

Для стимуляции процесса производства GMP, в котом промежуточный нерасфасованный продукт выдерживают в пакетах для биообработки в течение ночи, а затем фасуют в флаконы при комнатной температуре, проводили кумулятивное исследование времени выдержки. Репрезентативный промежуточный продукт, составленный в ГТ-буфере, выдерживали в пакете Flexboy® EVA, наполненном до 30 % вместимости, в течение ночи («Т/Н») при 2–8 °С в течение 16 часов. После выдержки в течение ночи промежуточный продукт выдерживали в течение до 72 часов при КТ, после чего его фасовали в флаконы в объеме 0,7 мл и выдерживали еще в течение 48 часов при КТ для имитации наихудшего сценария для выдержки при КТ.

Как показано на Фиг. 9, при всех условиях сохранялось снижение титра менее 0,2 log, что находится в рамках вариабельности анализа ПА-ИФА. Хотя снижение титра немного меньше, чем результаты, полученные в исследовании времени выдержки, представленном в предыдущем разделе («Время выдержки в пакетах для биообработки»), все результаты находятся в рамках 0,5 log относительно $T = 0$ и, следовательно, не считаются аналитически значимыми на основании текущего понимания процесса и возможностей аналитического метода. Результаты обоих исследований времени выдержки демонстрируют, что на титр продукта не влияют «наихудшие» условия выдержки, которые превышают максимально допустимую продолжительность выдержки для получения GMP.

Помимо анализа инфекционного титра, условия, проиллюстрированные на Фиг. 8, исследовали в отношении рН и внешнего вида перед замораживанием. Характеристика рН оставалась в рамках спецификации (рН $7,2 \pm 0,5$, с учетом, что исходный рН промежуточного нерасфасованного продукта составлял 7,1), а содержимое всех образцов было прозрачным, что удовлетворяет критериям «от прозрачного до замутненного; могут присутствовать белые частицы». Все результаты по рН и внешнему виду представлены в таблице 6; в таблице также представлены результаты по титру (с Фиг. 8) в форме таблицы.

Таблица 6. Титры, рН и внешний вид промежуточного нерасфасованного продукта в кумулятивном исследовании времени выдержки

Описание	Сосуд	Условия хранения	Момент времени (ч)	Log-разница относительно $T = 0$	рН	Внешний вид
Критерии приемлемости				Н/П ¹	6,7–7,7	От прозрачного до

						замутненног о; могут присутствова ть белые частицы
Разморожен ная бутылка	бутыл ка	Н/П	T = 0 (З/Р)	0,000	7,1	Н/П
16 ч при	пакет	2–8 °С	T = 16	-0,03	7,1	Соответстvue т критериям допуска
24 ч при КТ	пакет	КТ	T = 24	-0,08	7,1	Соответстvue т критериям допуска
48 ч при КТ	пакет	КТ	T = 48	-0,15	7,0	Соответстvue т критериям допуска
72 ч при КТ	пакет	КТ	T = 72	-0,04	7,1	Соответстvue т критериям допуска
96 ч при КТ	флако н	КТ	T = 96	-0,05	7,1	Соответстvue т критериям допуска
120 ч при КТ	флако н	КТ	T = 120	-0,05	7,1	Соответстvue т критериям допуска

З/Р: замораживание/размораживание; Н/П: не применимо; Т/Н: в течение ночи; КТ: комнатная температура

¹ С учетом предполагаемых высоких титров для вектора 2 и вектора 3 и аналитической вариабельности метода ПА-ИФА (т.е. $\pm 0,2 \log$), снижение, составляющее менее $0,5 \log$, маловероятно будет влиять на качество продукта или нести риск для приготовления клинической дозы. Следовательно, критерий приемлемости не применяли.

Низкий уровень остаточной ДНК ВАС в материале клинического исследования

Как изложено в разделе «Уровень техники химии, производства и контроля», получение вирусного посевного материала начинается с роста бактериальной искусственной хромосомы (ВАС) в *E. coli*, которую очищают, а затем трансфицируют в

клетки MRC-5 для восстановления вируса. Эта ВАС кодирует полные вирусные геномы вектора 2/вектора 3 помимо самоуничтожающейся кассеты. Эта кассета содержит гены для поддержания ВАС в *E.coli* помимо гена рекомбиназы Cre под управлением эукариотического промотора. Экспрессию рекомбиназы Cre в клетках MRC-5 используют для вырезания кассеты ВАС, которая расположена между двумя сайтами LoxP, из вирусного генома (Фиг. 6А-6Е). Остаточная ДНК ВАС может присутствовать, поскольку самоуничтожение за счет рекомбиназы Cre не является на 100 % эффективным.

Низкие уровни остаточной ДНК ВАС были выявлены в MVS вектора 2/вектора 3. Исследование для изучения характеристик проводили, используя анализ кПЦР, для выявления небольшой области гена хлорамфеникола в ВАС, как описано в документации для ИПП вектора 1. С помощью этого анализа кПЦР для гена хлорамфеникола, копии ДНК ВАС, присутствующие в векторе 2/векторе 3, приведены в таблице 7 в дополнение к числу общих вирусных геномов, определенному посредством анализа кПЦР для вирусного гена UL79. Чтобы определить количество ДНК ВАС на дозу, использовали молекулярную массу полноразмерной ДНК ВАС (8222 п. о.) для преобразования числа копий/мл из анализа кПЦР хлорамфеникола в нг/доза, что отображает максимальное количество остаточной полноразмерной ДНК ВАС.

Таблица 7. Данные характеристик остаточной ДНК ВАС

Вектор	Материал	Число копий/мл ДНК ВАС	Число общих вирусных геномов/мл	Процент ДНК ВАС к вирусным геномам	ДНК ВАС нг/доза ^а
Вектор 2	MVS	91688	2,9E+09	0,0032 %	0,00038
Вектор 3	MVS	134026	3,6E+09	0,0037 %	0,00056

а) Число нг на дозу рассчитывали на основании конечного титра $1e+07$ ФОЕ/мл в лекарственном продукте и клинической дозы $5e+06$ ФОЕ

Чтобы определить, присутствовала ли полноразмерная ДНК ВАС, конструировали соединительные ПЦР-праймеры, которые амплифицировали среди вирусных/ВАС-соединений как в 5' (US7), так и в 3' (US8) областях (Фиг. 6А-6Е). Все исследуемые материалы привели к положительным соединительным ПЦР-реакциям, демонстрируя, что полноразмерная ДНК ВАС присутствует в некотором проценте вирусных геномов. Хотя фактический процент полноразмерной ВАС, присутствующей в вирусных геномах, неизвестен, наихудшие уровни являются очень низкими, как показано в таблице 7.

Данные по остаточной ДНК ВАС можно рассматривать в контексте руководств FDA/ВОЗ (и соответствующих ограничений) по остаточной ДНК клетки-хозяина. На основании этого руководства количество ДНК клетки-хозяина должно составлять менее чем 10 нг/доза и быть менее 200 п. о. в длину. Хотя размер фрагментов ДНК ВАС может быть намного больше, чем 200 п. о., оценочное количество ДНК ВАС на дозу вектора 2/вектора 3 находится намного ниже этого предела. Чтобы оценить риск от остаточной ДНК ВАС в терминах онкогенности, инфекционности и иммуногенности, гены в ДНК ВАС приведены ниже:

- Помимо гена резистентности к хлорамфениколу присутствуют бактериальные гены (*sopA*, *sopB*, *sopC*, *герE* и *resD*) под управлением бактериальных промоторов. Эти гены обеспечивают возможность поддержания ВАС при ее получении в *E.coli* во время производства.
- Ген рекомбиназы Cre под управлением промотора SV40, чья экспрессия обуславливает самоуничтожение кассеты ВАС между двумя сайтами LoxP, оставляя один сайт LoxP между генами HCMV US7 и US8.

Все гены под управлением бактериальных промоторов не смогут транскрибироваться и транслироваться в клетках человека и представлять риск для безопасности пациента. Ген рекомбиназы Cre потенциально может экспрессироваться в клетках человека с помощью эукариотического промотора SV40 и продолжить удалять ДНК ВАС между остаточными сайтами LoxP из векторного генома.

В отличие от ДНК хозяина, которая может содержать онкогенные последовательности ДНК и/или потенциально инфекционные вирусные последовательности ДНК из латентных вирусов, ДНК ВАС не содержит известные онкогены и/или инфекционные последовательности ДНК. В терминах иммуногенности ДНК ВАС обладает потенциалом инициировать природную защиту клетки-хозяина, а не антиген-специфические ответы, которые ожидаемо могут быть вызваны плазмидой, сконструированной для экспрессии белка для генной терапии или вакцинации.

На основании низкого уровня остаточной ДНК ВАС на дозу и с учетом известных характеристик ДНК ВАС, эта примесь не несет какого-либо риска в отношении безопасности для субъектов, участвующих в клиническом исследовании.

Перечень сокращений

Термин	Определение
Δ	делеция следующих указанных генов, например ΔUL82
ДАИП	Доставка антигена и иммунное программирование
ВАС	бактериальная искусственная хромосома

Термин	Определение
БАЛ	бронхоальвеолярный лаваж
КМ	костный мозг
CCR7	C-C хемокиновый рецептор 7
cGMP	текущая надлежащая производственная практика
СМС	химическое производство и контроль
СМV	цитомегаловирус
ЦПЭ	цитопатический эффект
CS-5	Слой Cellstack-5
СТМ	материал клинического исследования
DAXX	ассоциированный с доменом смерти белок или ассоциированный со смертью белок 6
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛП	лекарственный продукт
дпи	дни после инфекции
дпв	дни после вакцинации
ЕС ₅₀	полумаксимальная эффективная концентрация
ЛПР	лаборатория первоначальной разработки
FIN	впервые на людях
ФБС	фетальная бычья сыворотка
ФОЕ	фокусообразующие единицы
gag	ген, кодирующие специфический в отношении группы антиген HIV или SIV
Gag	специфический в отношении группы антиген HIV или SIV
gB	гликопротеин B
НЛП	надлежащая лабораторная практика
HCMV	цитомегаловирус человека
МП	медицинский персонал
HF10	HYPERFlask – 10 слоев
HIV	вирус иммунодефицита человека
HLA	лейкоцитарный антиген человека
HS12	HYPERStack – 12 слоев
HS36	HYPERStack – 36 слоев
ВОК	внутриклеточное окрашивание цитокинов

Термин	Определение
НР	немедленно-ранний иммунофлуоресцентный анализ
ИНП	исследуемый новый препарат
НПО	нижний предел обнаружения
ГКГС	главный комплекс гистосовместимости
МЗ	множественность заражения
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
MVS	главный посевной вирусный материал
NGS	секвенирование нового поколения
ОЧП	отличные от человека приматы
NZW	новозеландский белый кролик
OHSU	Орегонский университет науки и здоровья
OR	Орегон
МКПК	моноклеарные клетки периферической крови
ПЦР	полимеразная цепная реакция
PHSA	Закон о службе общественного здравоохранения
ПК	подтверждение концепции
pp71	фосфопротеин 71
pol	ген полимеразы SIV
кПЦР	количественная полимеразная цепная реакция
RhCMV	цитомегаловирус резуса
MP	макак-резус
РНК	рибонуклеиновая кислота
RSS	исследовательский посевной материал
п/к	подкожный
СНЯ	серьезное нежелательное явление
СПС	стандартная погрешность среднего
SIV	вирус иммунодефицита обезьян
миРНК	малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
SIV	вирус иммунодефицита обезьян
СЛ	стандартное лечение
КРВБ	комитет по рассмотрению вопросов безопасности
ТБ	туберкулез
Остов CMV-вектора	Рекомбинантный вектор на основе цитомегаловируса

Термин	Определение
	человека, содержащий интактные UL82, UL97, UL128-130 и UL146-147
WBC	число белых кровяных клеток
WCB	рабочий банк клеток
ДТ	дикий тип

Хотя были проиллюстрированы и описаны конкретные варианты осуществления, будет очевидно, что различные варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать с получением дополнительных вариантов осуществления, и различные варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать с получением дополнительных вариантов осуществления.

Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, зарубежные патенты, заявки на зарубежные патенты и непатентные публикации, цитируемые в данном тексте и/или перечисленные в информационном листке заявки, включая предварительные заявки на патенты №№ 63/239298, поданную 31 августа 2021 г., и 63/356386, поданную 28 июня 2022 г., в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки, если явно не указано иное. Аспекты вариантов осуществления можно модифицировать, если необходимо использовать концепцию различных патентов, заявок и публикаций для получения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения можно проводить в отношении вариантов осуществления в свете вышеприведенного подробного описания. В целом, в нижеприведенной формуле изобретения используемые термины не следует толковать как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, описанными в тексте и формуле изобретения, но следует толковать как включающие все возможные варианты осуществления наряду с полным объемом эквивалентов, обусловленных формулой изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий остов TR3 и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный антиген, при этом:

(a) (i) вектор не экспрессирует UL18, UL78, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL82 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78;

(b) (i) вектор не экспрессирует UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL18 или его ортолог, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82; или

(c) (i) вектор не экспрессирует UL18, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортологи; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

2. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 1, отличающийся тем, что:

(i) вектор не экспрессирует UL18, UL78, UL128, UL130, UL146 или UL147;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL82 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL78 и функционально связан с промотором UL78.

3. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 1, отличающийся тем, что:

(i) вектор не экспрессирует UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL18

или его ортолог, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

4. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 1, отличающийся тем, что:

(i) вектор не экспрессирует UL18, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147 или их ортологи;

(ii) вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую UL78 или его ортолог; и

(iii) гетерологичный антиген замещает весь или часть UL82 и функционально связан с промотором UL82.

5. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что не экспрессирует один или более из белка UL18, белка UL78, белка UL82, белка UL128, белка UL130, белка UL146 или белка UL147, получаемых в результате наличия одной или более мутаций в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL78, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147.

6. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 5, отличающийся тем, что мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей UL18, UL78, UL82, UL128, UL130, UL146 или UL147, представляет собой точечную мутацию, мутацию со сдвигом рамки, мутацию усечения или делецию всей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный белок.

7. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–6, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент распознавания микроРНК (миРНК) (ЭРМ), при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в эндотелиальных клетках.

8. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–7, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ЭРМ, при этом ЭРМ содержит целевой сайт для миРНК, экспрессируемой в миелоидных клетках.

9. Рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–8, отличающийся тем,

что гетерологичный антиген представляет собой патоген-специфический антиген, опухолевый антиген, тканеспецифический антиген или собственный антиген хозяина.

10. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 9, отличающийся тем, что патоген представляет собой вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус простого герпеса типа 1, вирус простого герпеса типа 2, вирус гепатита В, вирус гепатита С, папилломавирус, паразитов Plasmodium или Mycobacterium tuberculosis.

11. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 9, отличающийся тем, что патоген-специфический антиген содержит антиген HIV.

12. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 11, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий или состоящий из HIV Gag, а HIV Nef и HIV Pol, или иммуногенных фрагментов, или их комбинаций.

13. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 3.

14. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3.

15. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 3.

16. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или 100 %

идентичности с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 4.

17. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4.

18. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 12, отличающийся тем, что антиген HIV представляет собой слитый белок, состоящий из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 4.

19. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 9, отличающийся тем, что опухолевый антиген относится к острому миелогенному лейкозу, хроническому миелогенному лейкозу, миелодиспластическому синдрому, острому лимфобластному лейкозу, хроническому лимфобластному лейкозу, неходжкинской лимфоме, множественной миеломе, злокачественной меланоме, раку молочной железы, раку легкого, раку яичника, раку предстательной железы, раку поджелудочной железы, раку толстой кишки, почечно-клеточной карциноме (ПКК) или герминогенным опухолям.

20. Рекомбинантный HCMV-вектор по п. 9, отличающийся тем, что собственный антиген хозяина представляет собой антиген, полученный из вариабельной области Т-клеточного рецептора (TCR), или антиген, полученный из вариабельной области В-клеточного рецептора.

21. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

22. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

23. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

24. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность

нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

25. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

26. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

27. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

28. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

29. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

30. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

31. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

32. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

33. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 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 %, по меньшей мере 99 % или по меньшей мере 100 % идентичности с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

34. Рекомбинантный HCMV-вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

35. Рекомбинантный HCMV-вектор, состоящий из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–35 и фармацевтически приемлемый носитель.

37. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–35 и фармацевтически приемлемый носитель.

38. Способ генерации иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из пп. 1–37.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что иммунный ответ направлен на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

40. Применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из пп. 1–37 в производстве лекарственного средства для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

41. Рекомбинантный HCMV-вектор или композиция по любому из пп. 1–37 для применения в генерации иммунного ответа у субъекта.

42. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение

рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из пп. 1–37.

43. Способ лечения HIV у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7.

44. Способ лечения HIV у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9.

45. Способ лечения HIV у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5.

46. Способ лечения HIV у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6.

47. Способ лечения HIV у субъекта, включающий введение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8.

48. Применение рекомбинантного HCMV-вектора или композиции по любому из пп. 1–37 в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

49. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7, в производстве лекарственного средства для применения в лечении HIV у субъекта.

50. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9, в производстве лекарственного средства для применения в лечении HIV у субъекта.

51. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5, в производстве лекарственного средства для применения в лечении HIV у субъекта.

52. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6, в производстве лекарственного средства для применения в лечении HIV у субъекта.

53. Применение последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтической композиции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8, в производстве лекарственного средства для применения в лечении HIV у субъекта.

54. Рекомбинантный HCMV-вектор или композиция по любому из пп. 1–37 для применения в лечении заболевания у субъекта.

55. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 7, для применения в лечении заболевания у субъекта.

56. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 9, для применения в лечении заболевания у субъекта.

57. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 5, для применения в лечении заболевания у субъекта.

58. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 6, для применения в лечении заболевания у субъекта.

59. Последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8 или фармацевтическая композиция, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 8, для применения в лечении заболевания у субъекта.

60. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 38–59, отличающиеся тем, что субъект является серопозитивным в отношении HCMV.

61. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 38–59, отличающиеся тем, что субъект является серонегативным в отношении HCMV.

62. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 38–59, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве по меньшей мере 1×10^3 фокусообразующих единиц (ФОЕ).

63. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 62, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 5×10^4 ФОЕ.

64. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 62, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 5×10^5 ФОЕ.

65. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 62, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 5×10^6 ФОЕ.

66. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 62, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 1×10^3 ФОЕ.

67. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 62, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 3×10^4 ФОЕ.

68. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по п. 62, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV вводят в количестве около 1×10^6 ФОЕ.

69. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 38–68, отличающиеся тем, что рекомбинантный HCMV-вектор вводят в количестве, эффективном для того, чтобы вызвать ответ CD8+ Т-клеток на по меньшей мере один гетерологичный антиген.

70. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 38–69, отличающиеся тем, что гетерологичный антиген представляет собой или содержит антиген HIV, а заболевание представляет собой инфекцию HIV.

71. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 38–69, отличающиеся тем, что заболевание представляет собой патогенную инфекцию, опухоль или рак или аутоиммунное заболевание.

72. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 60–71, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Е или его ортологу.

73. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 69–72, отличающиеся тем, что 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 HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-Е или его ортологу.

74. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 69–73, отличающиеся тем, что по меньшей мере 10 % CD8+ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

75. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 69–74, отличающиеся тем, что 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 HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС-II или его ортологу.

76. Способ, применение в производстве или вектор или композиция для применения по любому из пп. 69–75, отличающиеся тем, что менее чем 10 %, менее чем 20 %, менее чем 30 %, менее чем 40 % или менее чем 50 % CD8⁺ Т-клеток, индуцированных рекомбинантным HCMV-вектором, рестриктированы по ГКГС класс Ia или его ортологу.

77. Способ генерации CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид, включающий:

(а) введение первому субъекту рекомбинантного HCMV-вектора по любому из пп. 1–35 в количестве, эффективном для генерации группы CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/полученный из гетерологичного антигена пептид;

(b) идентификацию первого CD8⁺ TCR из группы CD8⁺ Т-клеток, причем первый CD8⁺ TCR распознает комплекс ГКГС-Е/пептид;

(c) выделение одной или более CD8⁺ Т-клеток от второго субъекта; и

(d) трансфекцию одной или более CD8⁺ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8⁺ TCR, и промотор, функциональной связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8⁺ TCR, при этом второй CD8⁺ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8⁺ TCR, с генерацией, таким образом, одной или более CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид.

78. Способ генерации CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид, включающий:

(а) идентификацию первого CD8⁺ TCR из группы CD8⁺ Т-клеток, при этом группа CD8⁺ Т-клеток выделена от первого субъекта, которому ввели рекомбинантный HCMV-вектор по любому из пп. 1–35, и при этом первый CD8⁺ TCR распознает комплекс ГКГС-Е/полученный из гетерологичного антигена пептид;

(b) выделение одной или более CD8⁺ Т-клеток от второго субъекта; и

(с) трансфекцию одной или более CD8⁺ Т-клеток, выделенных от второго субъекта, экспрессионным вектором, при этом экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CD8⁺ TCR, и промотор, функциональной связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей второй CD8⁺ TCR, при этом второй CD8⁺ TCR содержит CDR3 α и CDR3 β первого CD8⁺ TCR, с генерацией, таким образом, одной или более TCR-трансгенных CD8⁺ Т-клеток, которые распознают комплексы ГКГС-Е/пептид.

79. Способ по п. 77 или 78, отличающийся тем, что первый CD8⁺ TCR идентифицируют путем секвенирования ДНК или РНК.

80. Способ по любому из пп. 77–79, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй CD8⁺ TCR, идентична последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый CD8⁺ TCR.

81. Способ по любому из пп. 77–80, отличающийся тем, что первый субъект представляет собой человека.

82. Способ по любому из пп. 77–81, отличающийся тем, что первый субъект является серопозитивным в отношении HCMV.

83. Способ по любому из пп. 77–81, отличающийся тем, что первый субъект является серонегативным в отношении HCMV.

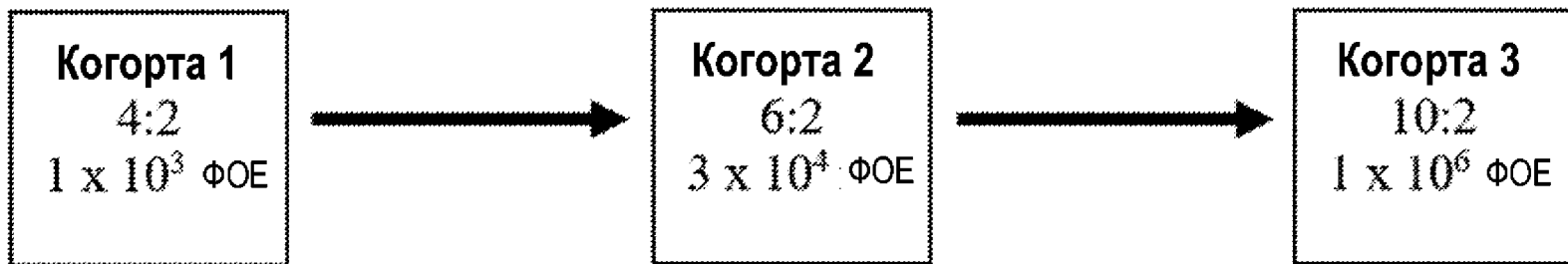
84. Способ по любому из пп. 77–83, отличающийся тем, что второй субъект представляет собой человека.

85. CD8⁺ Т-клетка, полученная способом по любому из пп. 77–84.

86. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту CD8⁺ Т-клетки по п. 85.

87. Применение CD8⁺ Т-клетки по п. 85 в производстве лекарственного средства для применения в лечении заболевания у субъекта.

88. CD8+ T-клетка по п. 85 для применения в лечении заболевания у субъекта.



Φιγ. 1

Неделя визита	Скрининг	Начальная доза	Период лечения						Период наблюдения после введения дозы						ДСПР ^g H52, 104, 156 после начальной дозы	
			H0,5	H1	H2	H4	H6	H8	H8,5	H9	H10	H12	H16	H20		H36/ ОЛ
День визита (Окно визита) ^b	от Д-56 до Д-1	Д1 ^a	Д4 (±2)	Д8 (±2)	Д15 (±2)	Д29 (±3)	Д43 (±3)	Д57 ^a (±5)	Д60 (±2)	Д64 (±2)	Д71 (±2)	Д85 (±3)	Д113 (±5)	Д141 (±7)	Д253 (±7)	(±30)
Информированное согласие	X															
Демография	X															
Анамнез ^c	X															
Критерии включения/ исключения	X	X														
Рандомизация ^d		X														
Полное физикальное исследование ^e	X	X						X								
Направленный на симптомы физикальный осмотр ^f			X	X	X	X			X	X	X	X	X	X		
Масса тела, рост и ИМТ	X															
Показатели жизнедеятельности ^g	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
Лабораторные исследования при скрининге (CMV/HSV/HSV) ^h	X															

Фиг. 2А

Неделя визита	Скрининг	Начальная доза	Период лечения						Период наблюдения после введения дозы							ДСПН ^Р Н52, 104, 156 после начальной дозы
			Н0,5	Н1	Н2	Н4	Н6	Н8	Н8,5	Н9	Н10	Н12	Н16	Н20	Н36/ ОЛ	
День визита (Окно визита) ^В	от Д-56 до Д-1	Д1 ^а	Д4 (±2)	Д8 (±2)	Д15 (±2)	Д29 (±3)	Д43 (±3)	Д57 ^а (±5)	Д60 (±2)	Д64 (±2)	Д71 (±2)	Д85 (±3)	Д113 (±5)	Д141 (±7)	Д253 (±7)	(±30)
Тест на HIV ^Г	X	X						X							X	X
Оценка ИВСП ^а															X	
Моча на препараты, вызывающие зависимость ^Г	X															
ФСГ	X															
Клинические лабораторные оценки ^к	X	X		X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	
Анализ мочи	X															
Кровь, моча, слюна на вирусмию/вирусовыделение ^Г		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
Образец крови для теста на HLA		X														
Образец крови для оценки иммуногенности (анализ внутриклеточного окрашивания цитокинов)		X			X	X		X			X	X	X	X	X	X
Образец сыворотки для оценки иммуногенности (тестирование на антитела)		X			X			X			X				X ¹	X

Фиг. 2В

Неделя визита	Скрининг	Начальная доза	Период лечения						Период наблюдения после введения дозы						ДСПН ^р H52, 104, 156 после начальной дозы	
			H0,5	H1	H2	H4	H6	H8	H8,5	H9	H10	H12	H16	H20		H36/ ОЛ
День визита (Окно визита) ^b	от Д-56 до Д-1	Д1 ^a	Д4 (±2)	Д8 (±2)	Д15 (±2)	Д29 (±3)	Д43 (±3)	Д57 ^a (±5)	Д60 (±2)	Д64 (±2)	Д71 (±2)	Д85 (±3)	Д113 (±5)	Д141 (±7)	Д253 (±7)	(±30)
Образец крови для транскриптомики		X	X	X				X	X	X					X	
Лейкаферез ^m														- X -		
в/в введение		X						X								
Оценки реактогенности ⁿ		X	X	X	X			X	X	X	X					
Телефонный звонок для оценки реактогенности ^o							X									
Обзор/запись НЯ/НЭХЗ		X							X						X ^t	
Обзор/запись сопутствующие препараты	X	X							X						X ^t	

Фиг. 2С

РАСШИФРОВКА

a	Оценки проводили перед введением дозы в день 1 и день 57. Оценки в день 1 считаются отдельными от скрининговых лабораторных оценок.
b	Интервалы между визитами в дни 4-43 рассчитывают после введения 1-ой дозы (день 1). Интервалы между визитами в дни 60-253 рассчитывают после введения 2-ой дозы (день 57). Недели 52, 104 и 156 отсчитывают от дня 1.
c	При скрининге будут собирать полные данные по анамнезу, и при этом любые изменения следует обновлять до введения доз.
d	Рандомизация может происходить в течение 48 часов до дня 1.
e	Полное физикальное исследование включает общий внешний вид, голову/шею, грудную клетку/дыхательный тракт, сердце/сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечный тракт/печень/селезенку, конечности, кожу, неврологические оценки, а также оценку места инъекции и регионарных лимфатических узлов.
f	Регионарное исследование будет основано на симптомах субъекта и будет включать место инъекции и регионарные лимфатические узлы.
g	Показатели жизнедеятельности (кровяное давление, частота пульса, частота дыхания и температура) следует измерять после того, как субъект отдохнет в комфортабельных условиях в течение приблизительно 10 минут. В дни введения доз показатели жизнедеятельности следует измерять и записывать в течение 30 минут (+/- 10 минут) до и после введения дозы. В дни всех остальных визитов показатели жизнедеятельности необходимо измерять и записывать только один раз.
h	HBV = тест на HbsAg
i	Будет предоставлена консультация по ВИЧ до и после тестирования. Учитывая потенциальную возможность ИВСП (т. е. перекрестной реактивности с антителами к Gag, индуцированными вакциной), любой положительный результат тестирования на антитела к ВИЧ, полученный после введения исследуемой дозы, будет сопровождаться тестированием на основании нуклеиновой кислоты, чтобы отличить ложноположительный результат (ИВСП) от действительной инфекции.

Фиг. 2D

РАСШИФРОВКА (продолжение)

j	Препараты, вызывающие зависимость, включенные в скрининг, описаны в критериях включения/исключения
k	Клинические лабораторные анализы для оценки безопасности будут включать общий анализ крови (ОАК) с дифференциалом и биохимическими показателями (АЛТ, АСТ, ГГТ, билирубин (прямой и общий), щелочная фосфатаза и креатинин).
l	Дополнительный образец на серопозитивные антитела, индуцированные вакциной, для оценки реактивности в коммерческих скрининговых тестах на ВИЧ будут брать на неделе 36 или на момент ОП.
m	Одну процедуру лейкафереза проведут между неделями 16 и 20.
n	Оценки реактогенности после введения дозы (доза 1: с дня 1 до дня 15 и доза 2: с дня 57 до дня 71); субъекты будут ежедневно записывать симптомы в месте инъекции (боль/болезненность, отек, покраснение и уплотнение), а также системные признаки и симптомы (лихорадка, головная боль, утомляемость, артралгия, миалгия, недомогание, тошнота, рвота или озноб). Кроме того, оценки реактогенности будут проводиться исследовательским персоналом в дни 1, 4, 8, 15, 57, 60, 64 и 71.
o	Телефонный звонок для оценки реактогенности на неделе 6 (день 43) для оценки системных признаков и симптомов (лихорадка, озноб, головная боль, утомляемость, недомогание, тошнота, рвота, миалгия, артралгия). Субъекты, сообщившие о системных признаках и симптомах во время телефонного звонка для оценки реактогенности, придут в клинику для внепланового визита для оценки НЯ, пройдут полное физикальное исследование с оценкой показателей жизнедеятельности и клинические лабораторные анализы для оценки безопасности, включая образцы крови, мочи и слюны для анализа на выявление вируса.

Фиг. 2Е

РАСШИФРОВКА (продолжение)

p	Визиты в клинику для субъектов, которые согласились на долгосрочное наблюдение для оценки иммуногенности и соответствуют критериям для продолжения участие в зависимости от демонстрации выявляемого иммунного ответа на белок Gag HIV, кодируемый в векторе 1.
q	Если будет замечено выделение вирусного вектора при раскрытии кода лечения на неделе 36, участники будут продолжать проходить наблюдение каждые 4 недели (+/- 1 неделя) до тех пор, пока не будут задокументированы 2 последовательных отрицательных результата анализа на выявление вируса. Если наблюдается тенденция к снижению, но так и не достигается нижний предел обнаружения, наблюдение следует продолжать до тех пор, пока результаты не продемонстрируют достижение плато как минимум в 2 последовательных момента времени получения образцов (с интервалом 4 недели +/- 1 неделя), после чего можно рассмотреть прекращение участия с одобрения Спонсора.
r	После визита последнего субъекта в когорте на неделе 36 для спонсора, исследователя и субъекта будет раскрыт код лечения. Будет проведен телефонный звонок или визит исследования, чтобы раскрыть для субъектов код лечения и обсудить любые последующие оценки, которые могут потребоваться для продолжения оценки выделения вектора и/или подтверждения ИВСП. В это время будут рассмотрены любые текущие ограничения исследования, возникающие в результате выделения вектора и/или ресурсов для ИВСП. Субъекты, демонстрирующие выявляемый иммунный ответ на белок Gag, кодируемый в векторе 1, также соответствуют критериям для продолжения мониторинга ДСПН.
s	Дополнительное тестирование для участниц женского пола для подтверждения статуса постменопаузы.
t	Во время ДСПН-части исследования следует фиксировать НЯ, связанные с процедурами исследования, возникающие дополнительные СНЯ и НЭХЗ, а также любые связанные с ними новые препараты. Применение сопутствующих препаратов, запрещенных до недели 36, также следует записывать.
u	Образец сыворотки будут получать на неделе 36 для комплексной оценки ИВСП с использованием нескольких коммерческих методов тестирования, описанных в Плане мониторинга ИВСП.

Фиг. 2F

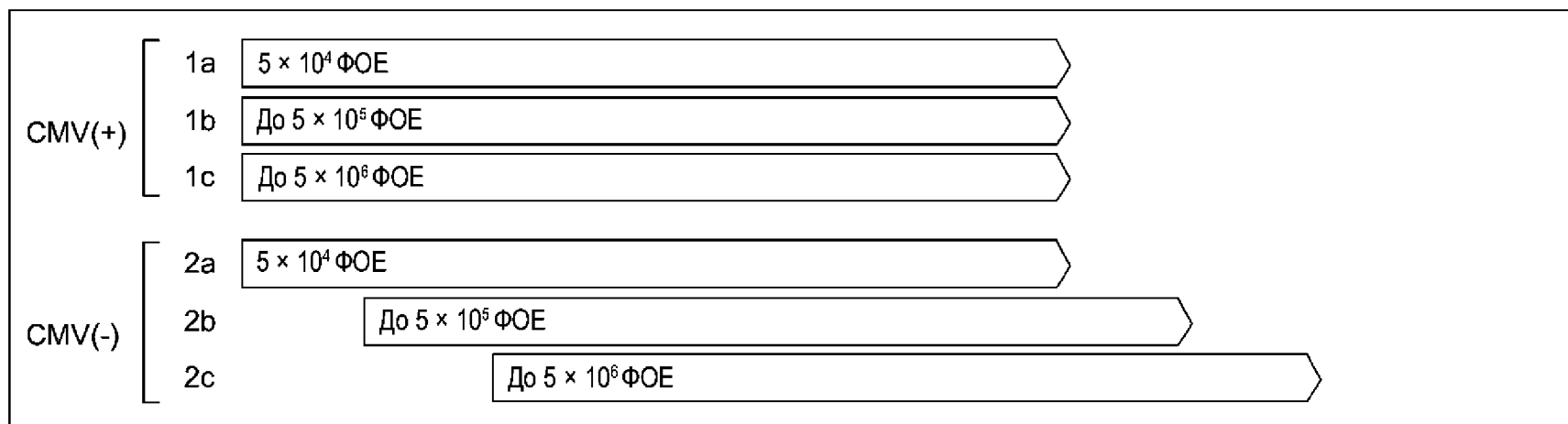
<p>Гематология Общий анализ крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, гематокрит, тромбоциты) с дифференциальным анализом (лимфоциты (в том числе атипичные), моноциты, сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы, базофилы)</p>
<p>Биохимия Сывороточный креатинин</p>
<p>Функциональные печеночные пробы Аспартатаминотрансфераза (АСТ) Аланинаминотрансфераза (АЛТ) Щелочная фосфатаза Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ) Билирубин (прямой и общий)</p>
<p>Анализ мочи (только при скрининге) Билирубин Белки Глюкоза Красные кровяные тельца (RBC) Кетоны Удельный вес Лейкоциты Уробилиноген Нитрит Визуальный осмотр в отношении внешнего вида и цвета. Микроскопия (при наличии клинических показаний) pH (тест-полоска) Препараты, вызывающие зависимость (кокаин, метадон, опиаты, бензодиазепины, барбитураты, амфетамин)</p>
<p>Иммунология Только при скрининге: Серология CMV (IgG) HBV (HBsAg) HCV (антитела к HCV) с рефлексивным тестированием РНК в случае положительного результата HIV (тестирование на антиген/антитела 4-го поколения) с рефлексивным тестированием РНК в случае положительного результата</p>

Фиг. 3

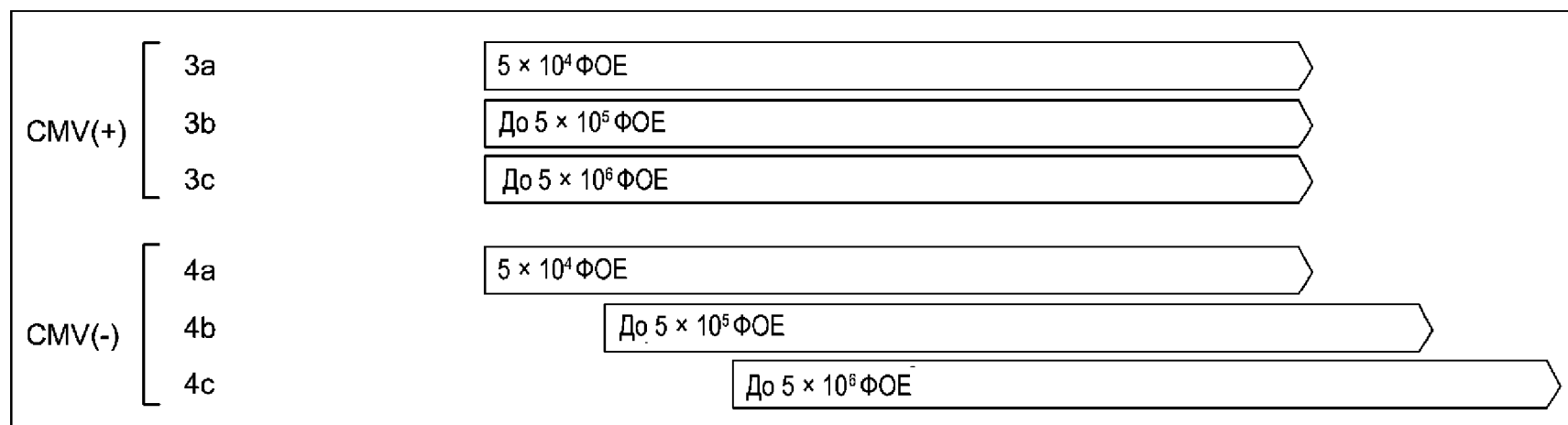
Тяжесть	Определение
Степень 1	Легкие симптомы, не влияющие или минимально влияющие на обычную социальную и функциональную деятельность, без показанного вмешательства.
Степень 2	Умеренные симптомы, оказывающие более чем минимальное влияние на обычную социальную и функциональную деятельность, с показанным вмешательством.
Степень 3	Тяжелые симптомы, вызывающие неспособность выполнять обычную социальную и функциональную деятельность, с показанным вмешательством или госпитализацией
Степень 4	Потенциально опасные для жизни симптомы, вызывающие неспособность выполнять основные функции по самообслуживанию, с показанным вмешательством для предотвращения перманентных нарушений, постоянной инвалидности или смерти.

Фиг. 4

Часть А: Вектор 3



Часть В: Вектор 2



Фиг. 5



Фиг. 6А



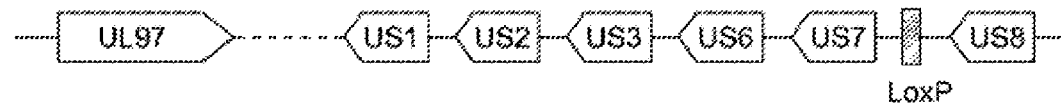
Фиг. 6В



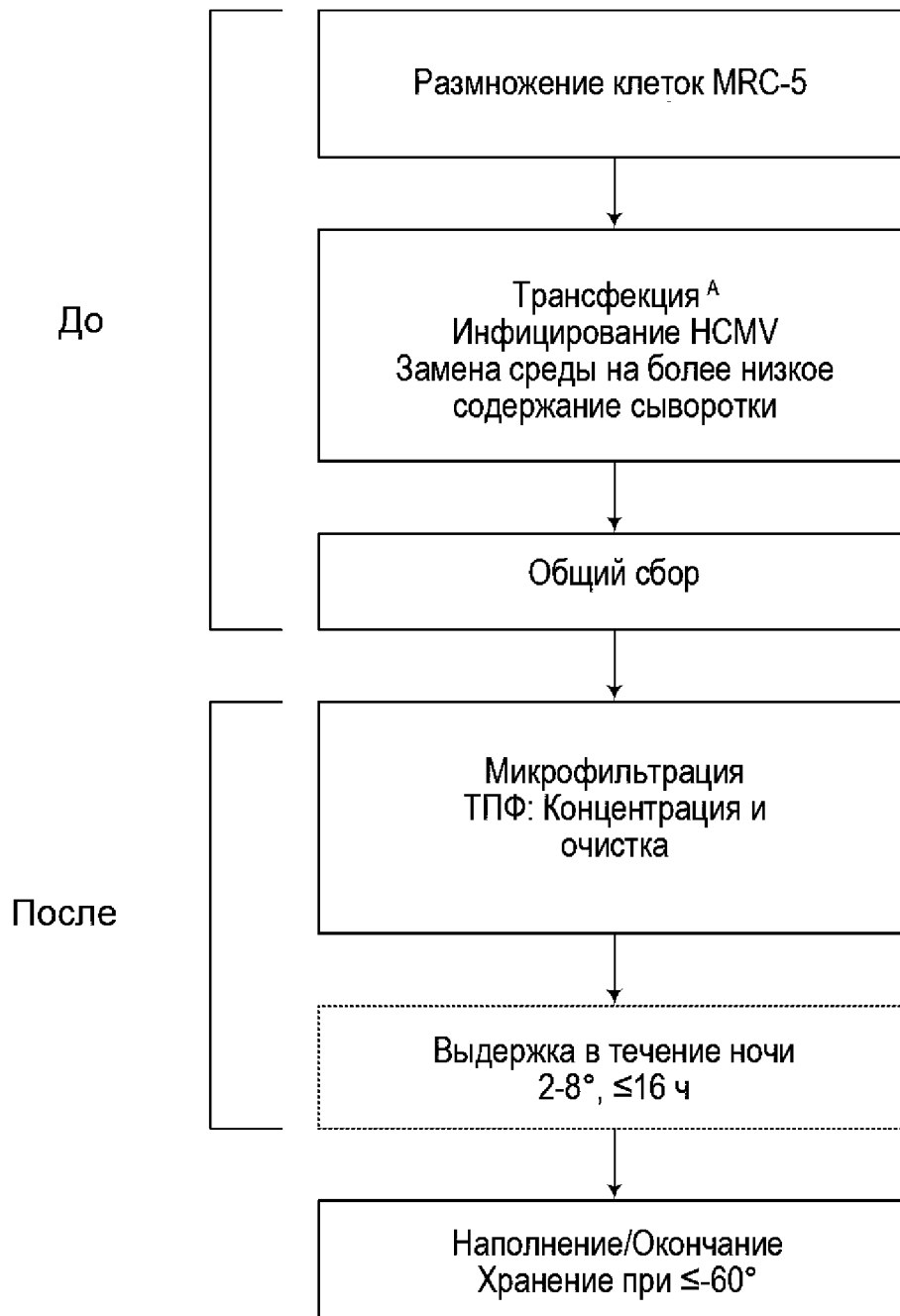
Фиг. 6С



Фиг. 6D

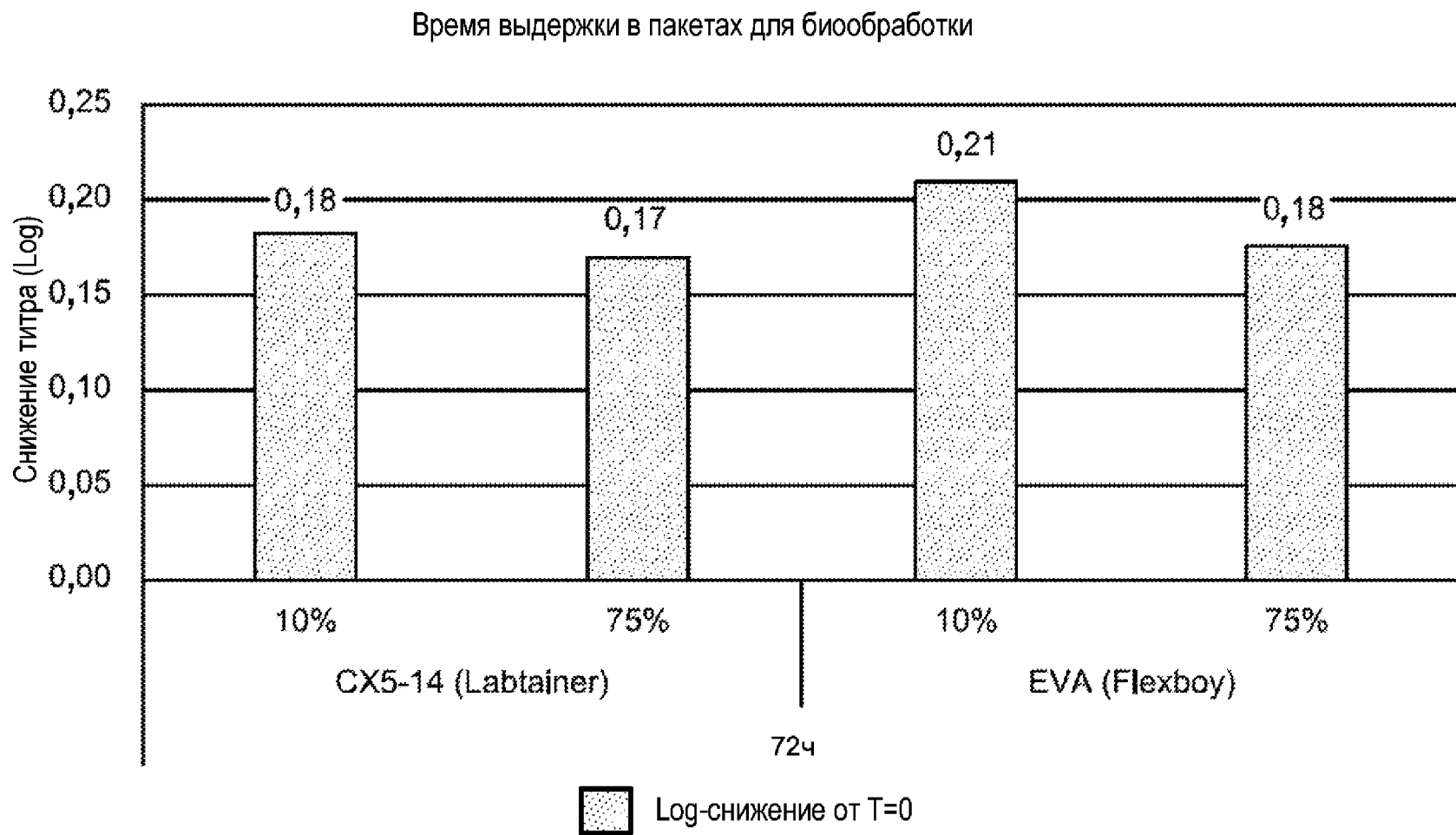


Фиг. 6Е

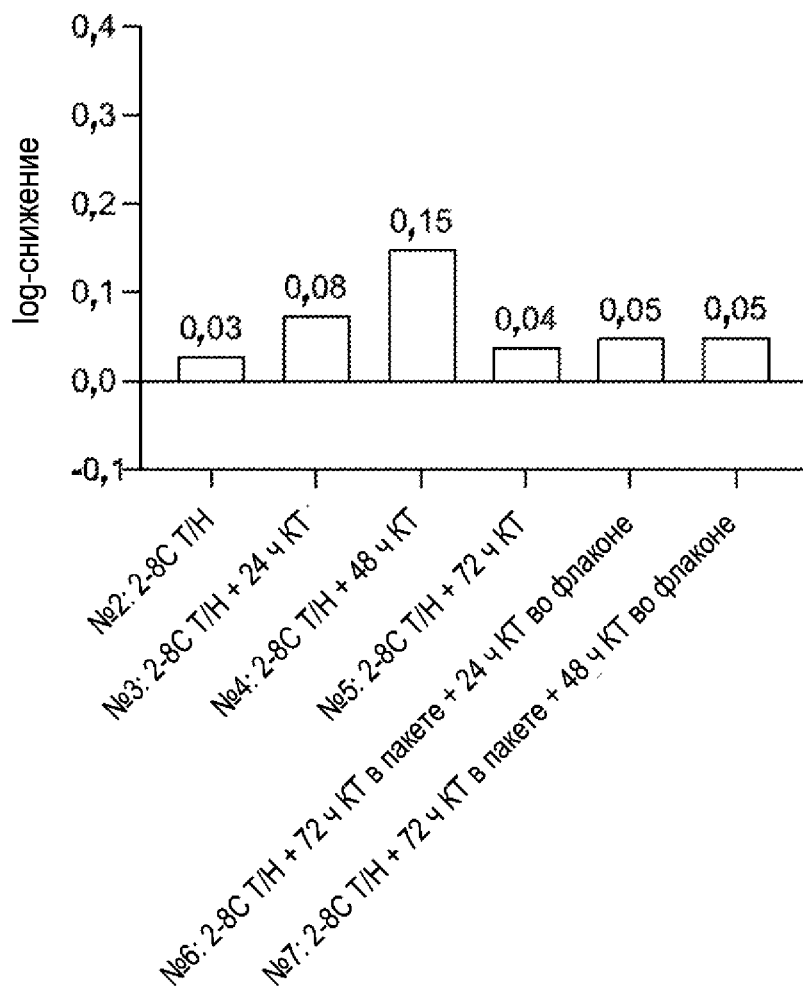


^Трансфекция является специфической для процесса, связанного с вектором 2 (для вектора 3 этап трансфекции отсутствует).

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9