



등록특허 10-2604486



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월22일
(11) 등록번호 10-2604486
(24) 등록일자 2023년11월16일

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

(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/21 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7013148

(22) 출원일자(국제) 2017년10월18일
심사청구일자 2020년10월07일

(85) 번역문제출일자 2019년05월07일

(65) 공개번호 10-2019-0064624

(43) 공개일자 2019년06월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/057106

(87) 국제공개번호 WO 2018/075591
국제공개일자 2018년04월26일

(30) 우선권주장
62/409,840 2016년10월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
W02011143653 A2*
W02016011293 A1*

Oncotarget, Vol.7, No.24,
pp.36614-36621(2016.06.14.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 15 항

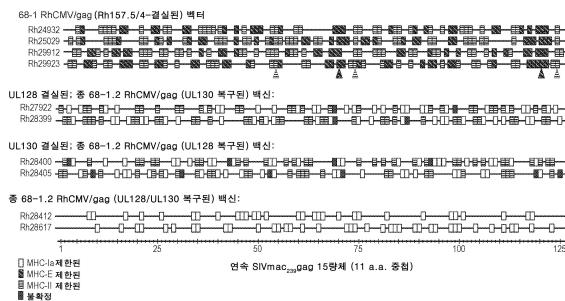
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 주요 조직적합성 복합체 분자에 의해 제한된 T 세포를 유발하는 사이토메갈로바이러스 벡터

(57) 요약

CMV의 발현을 제한하는 하나 이상의 마이크로RNA 조절 요소(MRE)를 또한 포함할 수 있는, 활성UL128, UL130, UL146 및 UL147 단백질이 없는 CMV 벡터가 기재되어 있다. 상기된 CMV 벡터를 사용한 면역화는 MHC-Ia, MHC-II, 또는 MHC-E에 의해 제한된 상이한 CD8+ T 세포 반응-CD8+ T 세포의 선택을 가능하게 한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 48/0008 (2013.01)
C12N 2710/16141 (2013.01)
C12N 2740/15034 (2013.01)

(72) 발명자

플루, 클라우스

미국, 오리건주 97229, 포틀랜드, 엔더블유 113 애비뉴 1980

말틀리, 다니엘

미국, 오리건주 97124, 힐스보로, 엔더블유 아다지오 웨이 2836

넬슨, 제이

미국, 오리건주 97239, 포틀랜드, 엔더블유 반크로프트 스트리트 0690

사샤, 조나

미국, 오리건주 97007, 비벌튼, 에스더블유 180 테라스 7381

헨콕, 메간

미국, 오리건주 97239, 포틀랜드, 에스더블유 반크로프트 스트리트 0690

명세서

청구범위

청구항 1

사이토메갈로바이러스 (CMV) 벡터로서,

(a) 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열; 및

(b) CMV 성장에 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된 제1 마이크로RNA 인지 요소 (MRE)를 포함하는 제2 핵산 서열을 포함하고,

상기 CMV 성장에 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자는 UL122(IE2) 또는 UL79이고, MRE가 miR-126-3p (서열번호 1)의 존재하에 UL122 (IE2) 또는 UL79의 발현을 사일런싱하고,

상기 벡터는 활성 UL128 단백질을 발현하지 않고; 활성 UL130 단백질을 발현하지 않고; 활성 UL146 단백질을 발현하지 않고; 활성 UL147 단백질을 발현하지 않는, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

CMV 성장에 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된 제2 MRE를 포함하고, 상기 MRE가 골수 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 제3 핵산 서열을 더 포함하는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제3 핵산 서열이 miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR146a, miR-132, miR-21, 및 miR-125 중 하나 이상의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는, CMV 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제3 핵산 서열이 miR-142-3p의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는, CMV 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 적어도 하나의 이종성 항원이 병원체-특이적 항원, 종양 항원, 조직-특이적 항원 또는 숙주 자가-항원을 포함하는, CMV 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

(a)상기 숙주 자가-항원이 T 세포 수용체 (TCR)의 가변 영역으로부터 유래된 항원 또는 B 세포 수용체의 가변 영역으로부터 유래된 항원;

(b) 상기 병원체 특이적 항원이 인간 면역결핍 바이러스, 원숭이 면역결핍 바이러스, 단순 헤르페스 1형 바이러스, 단순 헤르페스 2형 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 파필로마 바이러스, 열원충 (*Plasmodium*) 또는 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*); 또는

(c) 상기 종양 항원이 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 급성 림프모구 백혈병 (acute lymphoblastic leukemia), 만성 림프모구 백혈병(chronic lymphoblastic leukemia), 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종(multiple myeloma), 악성 흑색종, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 결장암, 신장 세포

암종 (RCC), 또는 생식 세포 종양과 관련된, CMV 벡터.

청구항 7

제1항에 있어서,

- (a) 상기 CMV 벡터가 활성 UL82 (pp71) 단백질을 발현하지 않고;
- (b) 상기 CMV 벡터가 활성 US11 단백질을 발현하지 않거나; 또는
- (c) 상기 CMV 벡터가 활성 UL82 (pp71) 단백질 또는 활성 US11 단백질을 발현하지 않는, CMV 벡터.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 CMV 벡터가 인간 CMV 벡터 (HCMV), 시노몰구스 CMV (cynomolgus CMV, CyCMV) 벡터, 또는 레서스 CMV (rhesus CMV, RhCMV) 벡터인, CMV 벡터.

청구항 9

대상체에서 암, 병원성 감염 또는 자가면역 질환 또는 장애의 치료에 사용하기 위한, 청구항 제1항의 CMV 벡터를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 대상체가 CMV에 이전에 노출되었던, 약제학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 대상체가 인간 또는 비인간 영장류인, 약제학적 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 CMV 벡터가 피하, 정맥내, 근육내, 복막내 또는 경구로 투여되도록 제형되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포를 시험관내 생성하는 방법으로서,

- (1) 청구항 1의 CMV 또는 HCMV 벡터가 투여된 대상체로부터 MHC-E/펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포 세트를 단리하는 단계;
- (2) CD8+ T 세포의 세트로부터 제1 CD8+ TCR을 동정하는 단계로서, 상기 제1 CD8+ TCR이 MHC-E/이종성 항원-유래된 펩타이드 복합체를 인지하는 단계;
- (3) 상기 대상체 또는 제2 대상체로부터 하나 이상의 CD8+ T 세포를 단리하는 단계; 및
- (4) 상기 대상체 또는 상기 제2 대상체로부터 단리된 하나 이상의 CD8+ T 세포를 발현 벡터로 형질감염시켜 MHC-E/이종성 항원-유래된 펩타이드 복합체를 인지하는 하나 이상의 형질감염된 CD8+ T 세포를 생성시키는 단계;를 포함하고,

여기서, 상기 발현 벡터는 제2 CD8+ TCR을 암호화하는 핵산 서열 및 제2 CD8+ TCR을 암호화하는 상기 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하고, 여기서, 제2 CD8+ TCR은 제1 CD8+ TCR의 CDR3 α 및 CDR3 β 를 포함하는, MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포를 시험관내 생성하는 방법.

청구항 14

청구항 제13항의 방법에 의해 생성된 CD8+T 세포.

청구항 15

청구항 제14항의 CD8+ T 세포를 포함하는 암, 병원성 감염 또는 자가면역 질환 또는 장애를 치료하기 위한 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 10월 18일 자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/409,840호의 우선일의 우선권을 주장하고 이의 개시내용은 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 기술분야

- [0004] 본 발명은 면역화에서 사이토메갈로바이러스 (CMV) 백터의 용도, 및 보다 구체적으로 MHC-E 제한을 특징으로 하는 T 세포 반응의 생성에 관한 것이다. 특정 구현예는 MHC-E에 의해 제한된 CD8+ T 세포의 생성에 관한 것이다.
- [0005] 정부 지원의 통지
- [0006] 본원의 개시내용은 국립보건원에 의해 수여된 승인 번호 P01 AI094417 및 R01 AI117802 하에 미국 정부의 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본원의 개시내용에 특정 권리를 갖는다.
- [0007] EFS-WEB을 통해 전자로 제출된 서열목록에 대한 참조
- [0008] 전자 제출된 서열 목록 (명칭: 3919.014PC01_ST25; 크기: 1,063 바이트; 및 생성 날짜: 2017년 10월 18일)의 내용은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

발명의 내용

- [0009] 유전자 변형된 CMV 백신 백터는 본원에 기재되어 있다. 유전자 변형된 CMV 백신 백터의 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 변형은 세포 표면 MHC-II 및 MHC-E 단백질에 의해 제한된 고유 에피토프를 인지하는 CD8+ T 세포 반응을 유발하는 능력을 포함하는, CMV 백신 백터에 의해 유발된 CD8+ T 세포 반응의 에피토프 표적화 및 주요 조직접합성 복합체(MHC) 제한을 변화시킨다. 본원에 기재된 CMV 백신에 의해 유발된 MHC-II 및 MHC-E-제한된 CD8+ T 세포 반응은 비통상적이고 감염성 제제에 대한 천연 면역 반응에서 드물게 관찰된다. 추가로, 본원에 기재된 CMV 백신 백터에 의해 유발된 MHC-II 및 MHC-E-제한된 CD8+ T 세포 반응의 폭 및 효능은 유전자 변형되지 않는 CMV 백신 백터를 사용해서는 관찰되지 않는다. 일부 구현예에서, 및 특정 이론에 국한되는 것 없이, 본원 발명자들은 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포가 MHC-E 제한된 면역 반응으로의 병원체 및 종양 면역 회피 적응의 부재를 활용할 수 있고, 우세하게 또는 독점적으로 상기 반응을 유발하는 본원에 기재된 유전자 변형된 CMV 백신 백터가 표적화된 병원체 및 종양에 대해 독특하게 강력한 백신에 대한 잠재력을 제공하는 것으로 믿는다. 상기 추정은 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포를 유발하는 백신 만이 AIDS에 대한 비-인간 영장류 모델에서 챠린지로부터 보호한다는 발견과 일치한다. 추가로, MHC-E는 제한된 다양성을 가진 MHC-E-제한된 에피토프를 표적화하는 보호 반응이 개체 들 간에 보존된다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유전자 변형된 CMV 백신 백터는 유전자적으로 다양한 개체 간에 공유되는 MHC-E 제한된 T 세포 반응을 유발한다.
- [0010] 본원에 기재된 것은 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열; 및 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 마이크로RNA 인지 요소 (MRE)를 포함하는 제2 핵산 서열을 포함하는 CMV 백터이다. MRE는 CMV 성장을 위해 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된다. 상기 백터는 다음을 발현하지 않는다: 활성 UL128 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오톨로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오톨로그.
- [0011] 또한 본원에 기재된 것은 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열; 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 제2 핵산 서열; 및 콜수 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 제3 핵산 서열을 포함하는 CMV 백터이다. MRE는 CMV 성장을 위해 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된다. 상기 백터는 다음을 발현하지 않는다: 활성 UL128 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오톨로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오톨로그.
- [0012] 또한 본원에 기재된 것은 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인간 사이토메갈로바이러스 (HCMV) 백터이다. 상기 백터는 다음을 발현하지 않는다: 활성 UL128 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오톨로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오톨로그.
- [0013] 또한, 본원에 기재된 것은 대상체에서 적어도 하나의 이종성 항원에 대해 면역 반응을 생성하는 방법이다. 상기 방법은 적어도 하나의 이종성 항원에 대한 CD8+ T 세포 반응을 유발하는 유효량으로 본원에 기재된 유형의 CMV 백터를 대상체에게 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 백터에 의해 유발되는 CD8+ T 세포의 적어도 10%는 MHC-E 또는 이의 오톨로그에 의해 제한된다. 추가의 구현예에서, 백터에 의해 유발되는 CD8+ T 세포의 10% 미만은 MHC-부류 Ia 또는 이의 오톨로그에 의해 제한된다. 대안적 구현예에서, 백터에 의해 유발되는 CD8+ T 세포의 적어도 50%는 MHC-Ia 또는 이의 오톨로그에 의해 제한된다. 여전히 다른 구현예에서, 백터에 의해 유발되는 CD8+ T 세포의 적어도 10%는 MHC-II 또는 이의 오톨로그에 의해 제한된다.

[0014]

본원에 기재된 CMV 벡터의 이종성 항원은 임의의 이종성 항원일 수 있고, 이는 예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 원숭인(simian) 면역결핍 바이러스 (SIV), 단순 헤르페스 1형 바이러스 (HSV-1), 단순 헤르페스 2형 바이러스 (HSV-2) B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 파필로마(유두종) 바이러스, 열원충 기생충 (Plasmodium) 및 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)로부터 유래된 병원체-특이적 항원을 포함한다. 다른 구현예에서, 이종성 항원은 종양 항원일 수 있고, 이는 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 급성 림프모구 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 만성 림프모구 백혈병(chronic lymphoblastic leukemia), 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종(multiple myeloma), 악성 흑색종, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 결장암, 신장 세포 암종, 및 생식 세포 종양과 관련된 종양 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 이종성 항원은 조직-특이적 항원 또는 숙주 자가-항원일 수 있고, 이는 예를 들어, T 세포 수용체의 가변 영역으로부터 유래된 항원 또는 B 세포 수용체의 가변 영역으로부터 유래된 항원을 포함한다.

[0015]

또한 본원에 기재된 것은 MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포를 생성하는 방법이다. 상기 방법은 MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포 세트를 생성하기 위한 유효량으로 CMV 벡터를 제1 대상체에게 투여함을 포함한다. 상기 CMV 벡터는 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하고 활성 UL128 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오톨로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오톨로그를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CMV 벡터는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함한다. 이종성 항원은 병원체 특이적 항원, 종양 항원, 자가-항원 또는 조직-특이적 항원을 포함하는 임의의 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 CD8+ T 세포의 세트로부터 제1 CD8+ T 세포 수용체를 동정함을 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 상기 제1 CD8+ T 세포 수용체 (TCR)는 MHC-E/이종성 항원-유래된 펩타이드 복합체를 인지한다. 일부 구현예에서, 제1 CD8+ T 세포 수용체는 DNA 또는 RNA 서열분석에 의해 동정된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 제1 대상체 또는 제2 대상체로부터 단리된 하나 이상의 T 세포를 발현 벡터로 형질감염시켜 MHC-E/이종성 항원-유래된 펩타이드 복합체를 인지하는 하나 이상의 형질감염된 CD8+ T 세포를 생성시킴을 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 상기 발현 벡터는 제2 CD8+ T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 제2 CD8+ T 세포 수용체는 제1 CD8+ T 세포 수용체의 CDR3 α 및 CDR3 β 를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 형질감염된 CD8+ T 세포를, 암, 병원성 감염 또는 자가면역 질환 또는 장애와 같은 질환을 치료하기 위해 제1 또는 제2 대상체에 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 형질감염된 CD8+ T 세포를, 자가-항원 또는 조직-특이적 항원에 대한 자가면역 반응을 유도하기 위해 제1 또는 제2 대상체에 투여함을 추가로 포함할 수 있다.

[0016]

또한 본원에 기재된 것은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 CD8+ T 세포이고: (1) MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포 세트를 생성하는 유효량으로 CMV 벡터를 제1 대상체에게 투여하는 단계, (2) CD8+ T 세포 세트로부터 제1 CD8+ T 세포 수용체를 동정하는 단계로서, 상기 제1 CD8+ T 세포 수용체가 MHC-E/이종성 항원-유래된 복합체를 인지하는, 단계; (3) 제1 대상체 또는 제2 대상체로부터 하나 이상의 CD8+ T 세포를 단리하는 단계; 및 (4) 제1 또는 제2 대상체로부터 단리된 하나 이상의 CD8+ T 세포를 발현 벡터로 형질감염시켜 MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 T 세포를 생성하는 단계. 상기 CMV 벡터는 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하고 활성 UL128 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오톨로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오톨로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오톨로그를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CMV 벡터는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함한다. 상기 발현 벡터는 제2 CD8+ T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 제2 CD8+ T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하고, 여기서, 상기 제2 CD8+ T 세포 수용체는 제1 CD8+ T 세포 수용체의 CDR3 α 및 CDR3 β 를 포함한다. 이종성 항원은 병원체 특이적 항원, 종양 항원, 자가-항원 또는 조직-특이적 항원을 포함하는 임의의 항원일 수 있다. 또한 본원에 기재된 것은 암, 병원성 감염 또는 자가면역 질환 또는 장애와 같은 질환을 치료하는 방법이고, 상기 방법은 MHC-E-펩타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 CD8+ T 세포를 상기 제1 또는 제2 대상체에게 투여함을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0017]

구현예는 첨부된 도면과 연계하여 하기의 상세한 설명에 의해 용이하게 이해된다. 구현예는 예시적으로 도해되고 첨부된 도면의 구성으로 제한되지 않는다.

도 1은 차동적으로 프로그램화된 RhCMV/SIVgag 벡터에 의해 유발된 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 에피토프 표적

화 및 MHC 제한을 보여준다. 지정된 RhCMV 백터에 의해 유발된 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포 반응은 125개 연속 15량체 gag 웹타이드 (11개 아미노산 중첩을 갖는)의 인지를 검출하기 위해 유동 세포측정 세포내 사이토킨 염색 (ICS)을 사용하여 에피토프 맵핑한다. 특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 개별 웹타이드는 박스로 지적하고, 상기 박스의 패턴은 MHC 제한을 지적하고, 이는 항-범(pan)-MHC-I mAb W6/32 (이는 비-다형성 MHC-E 및 다형성 MHC-Ia 분자 둘 다의 인지를 차단하는), 상기 MHC-E 차단 웹타이드 VL9, 및 MHC-II 차단 웹타이드 CLIP로 차단시킴에 의해 측정된다. MHC-Ia-, MHC-E-, 및 MHC-II-제한은 각각 단독의 W6/32 (음영이 아닌), 단독의 VL9 (대각선 해치 마크), 및 단독의 CLIP(수평 해치 마크)에 의한 >90% 반응 차단을 기준으로 하고, 이들 기준을 충족하지 않는 반응은 불확정으로 표지(음영)하였다. 화살표는 MHC-II 슈퍼토프 (수평 해치 마크) 및 MHC-E 슈퍼토프 MHC-E 슈퍼토프 (대각선 해치 마크)를 지적한다.

도 2는 백신접종되지 않은 상태로 있거나 (n=15; 하부 패널) 균주 68-1 RhCMV/SIV 백터 (n = 15; 상부 좌측 패널); 균주 68-1.2 RhCMV 백터 (n = 15; 상부 중앙 패널); 또는 UL128-결실된 (Δ UL128) 68-1.2 RhCMV 백터 (n = 14; 상부 우측 패널)로 백신접종된 레서스 봉기 (RM)의 반복, 제한 용량, 직장내 SIVmac239 챠린지의 결과를 보여준다. 모든 백터는 동일한 SIV Gag, Ret anef (Rev/Nef/Tat 융합체) 및 5'-Pol 삽입체를 발현하였다.

도 3은 CyCMV 작제물에 대한 서열분석 커버리지 맵을 보여준다. CyCMV-BAC의 차세대 서열분석시, 모든 서열분석 판독 통과 품질 제어는 CyCMV-BAC의 드 노보 어셈블리된 컨센서스 서열에 할당하였다. 작제물 각각에 대한 컨센서스 서열의 ORF 맵을 보여준다. 상부 막대는 소정의 BAC와 모 BAC 서열 사이의 뉴클레오타이드 동일성의 퍼센트를 지적하고 암 회색은 100% 동일하다. Cy13.1 ORF를 대체하는 SIVgag 서열 및 HCMV UL128, UL130, UL146 및 UL147의 CyCMV 동족체는 상부 막대에서 밝은 회색으로 도시한다. 모 BAC와 CyCMVRL13/Gag 간의 유일한 서열 차이는 R113의 CyCMV 동족체의 SIVgag로의 대체이다. CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130은 추가로 UL128 및 UL130의 동족체가 없는 반면, HCMV UL146 및 UL147의 6개 동족체는 CyCMVRL13/Gag Δ UL128-130 Δ UL146-147에서 추가로 결실되어 있다. 원치 않는 재조합 또는 거짓된 돌연변이가 주요 서열에 존재하지 않는다.

도 4는 세균 인공 염색체 (31908)로 클로닝함에 의해 생성되고, 단독으로 또는 HCMV UL146 및 UL147 (Δ UL128-UL130 + Δ UL146/7 패밀리)와 상동성인 6개 유전자 패밀리와 조합된 HCMV UL128 및 UL130 (Δ UL128-UL130)에 상동성인 유전자들에 대해 결실된 CyCMV 작제물의 도식을 보여준다.

도 5a-5c는 CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 백터-백신접종된 시노몰구스 마카쿠에스 (cynomolgus macaques)로부터의 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 도 5a는 4개의 아미노산 (GAG ORF)까지 중첩하는 15량체 SIVgag 웹타이드로 자극되거나, MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프에 상응하는 지적된 SIVgag 웹타이드 (Gag53 = SIVmac239의 gag 단백질에서 아미노산 서열 211-222에 상응하는 웹타이드; Gag73 = AA 290-301, Gag69 = AA 276-284, Gag120 = AA 482-490)로 자극된 CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 백터-백신접종된 시노몰구스 마카쿠에스로부터의 PBMC의 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 도 5b는 범-MHC-I 차단 mAb W6/32 (MHC-E 및 MHC-Ia 둘 다를 차단하는 항-MHC-I)의 존재하의 비-슈퍼토프 MHC-II 또는 MHC-Ia-제한된 웹타이드 (SIVmac239gag에서 Gag12= AA 45-59, Gag33= 132-140 AA), MHC-II 결합 CLIP 웹타이드 (항-MHC-II), 또는 MHC-E 결합 VL9 웹타이드 (항-MHC-E)로 항온처리 후 대표적인 CD8+ T 세포의 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 도 5c는 125개 연속 15량체 gag 웹타이드(11개 아미노산 중첩을 갖는)의 인지를 검출하기 위해 유동 세포측정 ICS를 사용한 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 에피토프 표적화 및 MHC 제한을 보여준다. 특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 개별 웹타이드는 박스로 지적하고, 상기 박스의 패턴은 MHC 제한을 지적하고, 이는 항-범(pan)-MHC-I mAb W6/32, 상기 MHC-E 차단 웹타이드 VL9, 및 MHC-II 차단 웹타이드 CLIP로 차단시킴에 의해 측정된다. MHC-Ia-, MHC-E-, 및 MHC-II-제한은 단독의 W6/32 (하부 좌측 코너로부터 상부 우측 코너로 지시된 해치 마크), 단독의 VL9 (하부 우측 코너로부터 상부 좌측 코너로 지시된 해치 마크: 수평 해치 마크), 및 단독의 CLIP (음영) 각각에 의한 >90% 반응 차단을 기준으로 하고 이들 기준을 충족하지 않는 반응은 불확정으로 표지하였다 (음영이 아닌).

도 6a-6c는 CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 Δ UL146-147 백터-백신접종된 시노몰구스 마카쿠에스로부터 PBMC의 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 도 6a는 4개의 아미노산 (GAG ORF)까지 중첩된 15량체 SIVgag 웹타이드 또는 MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프에 상응하는 지정된 SIVgag 웹타이드로 자극된 CyCMV Δ RL13/Gag Δ UL128-130 Δ UL146-147 백터-백신접종된 시노몰구스 마카쿠에스로부터의 PBMC의 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 도 6b는 범-MHC-I 차단 mAb W6/32 (항-MHC-I)의 존재하에 슈퍼토프 MHC-II- 또는 MHC-E-제한된 웹타이드, MHC-II 결합 CLIP 웹타이드 (항-MHC-II), 또는 MHC-E 결합 VL9 웹타이드 (항-MHC-E)로 항온처리 후 CD8+ T 세포의 대표적인 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 도 6c는 125개 연속 15량체 웹타이드(11개 아미노산 중첩을 갖는)의 인지를 검출하기 위해 유동 세포측정 ICS를 사용한 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 에피토프 표적화 및 MHC 제한을 보여

준다. 특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 개별 웨타이드는 박스로 지적하고, 상기 박스의 패턴은 MHC 제한을 지적하고, 이는 항-범(pan)-MHC-I mAb W6/32, 상기 MHC-E 차단 웨타이드 VL9, 및 MHC-II 차단 웨타이드 CLIP로 차단시킴에 의해 측정된다. MHC-Ia-, MHC-E-, 및 MHC-II-제한은 단독의 W6/32 (하부 좌측 코너로부터 상부 우측 코너로 지시된 해치 마크), 단독의 VL9 (하부 우측 코너로부터 상부 좌측 코너로 지시된 해치 마크: 수평 해치 마크), 및 단독의 CLIP (음영) 각각에 의한 >90% 반응 차단을 기준으로 하고 이를 기준을 충족하지 않는 반응은 불확정으로 표지하였다 (음영이 아닌).

도 7은 야생형 전장 게놈 (FL)으로의 68-1의 유전학적 가공에 의해 생성된 RhCMV 단리풀 68-1 및 RhCMV 작제물의 도식을 보여준다. FL의 특정 작제물은 단독으로 또는 HCMV UL146 및 UL147 (Δ UL128-UL130 + Δ UL146/7 패밀리)와 상동성인 6개 RhCMV 유전자 패밀리와 조합된 HCMV UL128 및 UL130 (Δ UL128-UL130)에 상동성인 RhCMV 유전자들에 대해 결실되었다.

도 8a-8d는 지적된 작제물이 접종된 레서스 몽키에서 전체 SIVgag (중첩 웨타이드를 사용한) 또는 지적된 MHC-E 또는 MHC-II 제한된 "슈퍼토프" 웨타이드에 대한 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. T 세포 반응은 지적된 접종 후 일자에서 PBMC에서 ICS를 통해 측정하였다. 도 8a는 FL-RhCMV Δ RL13gag로 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 8b는 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-UL130이 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 8c는 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-UL130 Δ UL146(3)이 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 8d는 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-UL130 Δ UL147(6)이 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다.

도 9a-9c는 지적된 작제물이 접종된 레서스 몽키에서 전체 SIVgag (중첩 웨타이드를 사용한) 또는 지적된 MHC-E 또는 MHC-II 제한된 "슈퍼토프" 웨타이드에 대한 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. T 세포 반응은 지적된 접종 후 일자에서 PBMC에서 ICS를 통해 측정하였다. 도 9a는 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-UL130HCMVUL146-UL147이 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 9b는 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-UL130HCMVUL146이 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 9c는 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-UL130HCMVUL147이 접종된 레서스 몽키의 CD8+ T 세포 반응을 보여준다.

도 10은 galK 재조합을 통한 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126-3p 돌연변이체 바이러스의 생성의 도식을 보여준다. Rh156 및 Rh108은 필수 HCMV 유전자들 UL122 (IE2) 및 UL79 각각의 RhCMV 동족체이다.

도 11은 지적된 세포 유형 (레서스 폐 섬유아세포, 레서스 제대 정맥 내피 세포, PBMC로부터 수득된 CD14+ 단핵 구로부터 유래된 레서스 대식세포 및 10일 동안 m-CSF의 존재하에 배양됨)에서 miR-126-3p 발현을 보여주는 막대 그래프이다. MiR 발현은 RNA 10 ng으로부터 qPCR에 의해 측정하였다. 카피수는 표준 곡선에 의해 결정하였다.

도 12는 miR-126-3p 모사체 ("+ miR-126") 또는 대조군 miRNA ("+ Neg")로 형질감염된 레서스 섬유아세포에서 RhCMV 68-1 RTN Rh156/Rh108 miR-126-3p ("68-1 miR-126") 바이러스 또는 RhCMV 68-1 RTN Rh156/Rh108 miR-126 돌연변이체 ("68-1 miR-126mut") 바이러스를 사용한 다단계 성장 곡선을 지적하는 2개 플롯 세트를 보여준다. 균주 68-1 RhCMV는 UL146 및 UL147 뿐만 아니라 HCMV UL128 및 UL130의 동족체가 없다. RTN = EF1a 프로모터를 통해 발현되고 RhCMV 유전자 Rh211로 삽입된 SIVmac239의 rev, tat 및 nef 단백질의 융합 단백질. 상기 바이러스는 Rh156 및 Rh108의 3'-비해독 영역에서 mir126-3p에 대한 4개의 표적화 서열을 함유한다.

도 13은 내피 세포에서 RhCMV 68-1.2 Rh156/Rh108 miR-126-3p ("68-1.2 miR-126") 바이러스 또는 RhCMV 68-1 Rh156/Rh108 miR-126 돌연변이체 ("68-1.2 miR-126mut") 바이러스를 사용한 다단계 성장 곡선을 지적하는 2개 플롯 세트를 보여준다. 균주 68-1.2는 상이한 RhCMV 균주의 UL128 및 UL130 동족체를 함유하고 UL146 및 UL147의 동족체가 결실되어 있다. 상기 바이러스는 각각 Rh156 및 Rh108의 3'-비해독 영역에서 mir126-3p에 대한 4개의 표적화 서열을 함유한다.

도 14는 68-1 RhCMVmiR126/SIVgag가 접종된 레서스 몽키 (RM)에서 SIVgag-특이적 T 세포 빈도 및 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 연합된 에피토프 표적화 및 MHC 제한을 보여준다. 균주 68-1 RhCMV는 UL146 및 UL147 뿐만 아니라 HCMV UL128 및 UL130의 동족체가 없다. SIV mac239의 SIVgag는 EF1a 프로모터를 통해 발현되고 RhCMV 유전자 Rh211에 삽입된다. 상기 바이러스는 각각 Rh156 및 Rh108의 3'-비해독 영역에서 mir126-3p에 대한 4개의 표적화 서열을 함유한다.

도 14의 상부 패널은 68-1 RhCMVmiR126/SIVgag이 접종된 2 RM에서 시간 경과에 따라 측정된 SIVgag-특이적 T 세포 빈도를 보여준다. 상부 좌측 패널은 4개 아미노산까지 중첩하고 전체 SIVgag 단백질을 포괄하는 125개 중

첨 15량체 웹타이드의 풀에 대한 각각의 RM에서 SIVgag에 대한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 상부 중앙 패널은 MHC-E에 의해 제공되는 2개의 SIVgag 슈퍼토프 웹타이드 Gag69 및 Gag120에 대한 각각의 RM에서 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 상부 우측 패널은 MHC-II에 의해 제공되는 2개의 SIVgag 슈퍼토프 웹타이드 Gag53 및 Gag73에 대한 각각의 RM에서 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 14의 하부 패널은 박스로 지적된 특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 개별 웹타이드를 사용한 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 에피토프 표적화 및 MHC 제한을 보여준다. 상기 박스의 패턴은 MHC 제한을 지적하고, 이는 항-범(pan)-MHC-I mAb W6/32, 상기 MHC-E 차단 웹타이드 VL9, 및 MHC-II 차단 웹타이드 CLIP로 차단시킴에 의해 측정된다. MHC-Ia-, MHC-E-, 및 MHC-II-제한은 각각 단독의 W6/32 (음영), 단독의 W6/32 및 VL9 (중간 정도의 음영), 및 단독의 CLIP(약간의 음영)에 의한 >90% 반응 차단을 기반으로 하고, 이들 기준을 충족하지 않는 반응은 불확정으로 표지(음영이 아닌)하였다.

도 15는 4개의 아미노산 (SIVgag ORF)까지 중첩된 15량체 SIVgag 웹타이드 또는 MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프에 상응하는 지정된 SIVgag 웹타이드로 자극된 균주 RhCMV 68-1miR126/gag 벡터-백신 접종된 레서스 마카우에스로 부터의 PBMC를 보여주는 유동 세포측정 플롯 세트이다. MHC-E 또는 MHC-II-결합된 SIVgag 웹타이드에 응답하는 CD8+ T 세포는 CD69 및 TNF- α 발현을 통해 동정하였다.

도 16은 galK 재조합을 통한 RhCMV Rh156/Rh108-126-Rh108/miR-126-3p/miR-142-3p 돌연변이체 바이러스 생성의 도식을 보여준다. Rh156 및 Rh108은 필수 HCMV 유전자들 UL122 (IE2) 및 UL79 각각의 RhCMV 동족체이다.

도 17은 68-1 RhCMVmir126mir142/SIVgag가 접종된 레서스 몽키 (RM)에서 SIVgag-특이적 T 세포 빈도 및 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 연합된 에피토프 표적화 및 MHC 제한을 보여준다. 균주 68-1 RhCMV는 UL146 및 UL147 뿐만 아니라 HCMV UL128 및 UL130의 동족체가 없다. SIVmac239의 SIVgag는 EF1a 프로모터를 통해 발현되고 RhCMV 유전자 Rh211에 삽입된다. 상기 바이러스는 각각의 Rh156 및 Rh108의 3'-비해독 영역에서 mir126-3p에 대해 2개의 표적화 서열 및 골수-특이적 mir142-3p의 2개의 표적화 서열을 함유한다.

도 17의 상부 패널은 68-1 RhCMVmir126mir142/SIVgag이 접종된 하나의 RM에서 시간 경과에 따라 측정된 SIVgag-특이적 T 세포 빈도를 보여준다. 도 17의 상부 좌측 패널은 4개 아미노산까지 중첩하고 전체 SIVgag 단백질을 포괄하는 125개 중첩 15량체 웹타이드의 풀에 대한 각각의 RM에서 SIVgag에 대한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 17의 상부 중앙 패널은 MHC-E에 의해 제공된 2개의 통상의 SIVgag 웹타이드에 대한 각각의 RM에서 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 17의 상부 우측 패널은 MHC-II에 의해 제공된 2개의 통상의 SIVgag 웹타이드에 대한 각각의 RM에서 CD8+ T 세포 반응을 보여준다. 도 17의 하부 패널은 박스로 지적된 특이적 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 개별 웹타이드를 사용한 SIVgag-특이적 CD8+ T 세포의 에피토프 표적화 및 MHC 제한을 보여준다. 상기 박스의 패턴은 MHC 제한을 지적하고, 이는 항-범(pan)-MHC-I mAb W6/32, 상기 MHC-E 차단 웹타이드 VL9, 및 MHC-II 차단 웹타이드 CLIP로 차단시킴에 의해 측정된다. MHC-Ia-, MHC-E-, 및 MHC-II-제한은 각각 단독의 W6/32 (음영이 아닌), 단독의 W6/32 및 VL9 (대각선 해치 마크), 및 단독의 CLIP (수평 해치 마크)에 의한 >90% 반응 차단을 기반으로 하고, 이들 기준을 충족하지 않는 반응은 불확정으로 표지 (음영)하였다. 이들 결과는 68-1 RhCMV (= UL128, UL130, UL146, UL147의 동족체에 대해 결실된) mir126mir142/SIVgag가 MHC-Ia-제한된 CD8+ T 세포만을 유발함을 지적한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

하기의 상세한 설명에서, 이의 일부를 형성하는 첨부된 도면을 참조하고 여기서, 실행될 수 있는 예시 구현예를 통해 나타낸다. 다른 구현예가 사용될 수 있고 구조적 또는 논리적 변화가 본원의 개시내용의 범위로부터 벗어나는 것 없이 만들어질 수 있는 것으로 이해되어야만 한다. 따라서, 하기의 상세한 설명은 예시적 의미에서 취해지는 것이 아니고 구현예의 범위는 첨부된 청구항 및 이들의 등가물에 의해 한정된다.

[0019]

다양한 작동은 다중 개별 작동으로 순서대로, 구현예를 이해하는데 도움이 될 수 있는 방식으로 기재될 수 있지만, 기재 순서는 이들 작동이 순서에 의존함을 의미하는 것으로 해석되지 말아야 한다.

[0020]

상기 기재는 상향/하향, 전방/후방 및 상부/하부와 같은 시점-기반 기재를 사용할 수 있다. 상기 기재는 단지 논의를 촉진시키기 위해 사용되고 기재된 구현예의 적용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0021]

용어 "커플링된" 및 "연결된"은 이들의 변형어와 함께 사용될 수 있다. 이를 용어는 서로 동의어로서 의도되지 않는 것으로 이해되어야만 한다. 차라리, 특정 구현예에서, "연결된"은 2개 이상의 요소들이 서로 직접적인 물리적 또는 전기적 접촉하에 있음을 지적하기 위해 사용될 수 있다. "커플링된"은 2개 이상의 요소들이 직접적인 물리적 또는 전기적 접촉에 있음을 의미할 수 있다. 그러나, "커플링된"은 또한 2개 이상의 요소들이 서로

직접적인 접촉에 있지 않지만 여전히 서로 협력하거나 상호작용함을 의미할 수 있다.

[0022] 기재의 목적을 위해, 형태 "A/B"에서, 또는 형태 "A 및/또는 B"에서의 문장은 (A), (B), 또는 (A 및 B)를 의미한다. 기재의 목적을 위해, 형태 "A, B, 및 C 중 적어도 하나"에서의 문장은 (A), (B), (C), (A 및 B), (A 및 C), (B 및 C), 또는 (A, B 및 C)를 의미한다. 기재의 목적을 위해, 형태 "(A)B"에서의 문장은 (B) 또는 (AB)를 의미하고, 이는 A가 임의의 요소라는 것이다.

[0023] 기재사항은 용어 "구현예" 또는 "구현예들"을 사용할 수 있고, 이는 각각 동일하거나 상이한 구현예들 중 하나 이상을 언급할 수 있다. 추가로, 용어 "포함하는", "함유하는", "갖는" 등은 구현예와 관련하여 사용되고, 동의어이다.

[0024] 본원의 구현예는 적어도 하나의 이종성 단백질 항원을 암호화하는 핵산, 및 CMV 성장을 위해 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA에 대해 특이적인 적어도 하나의 마이크로RNA 인지 요소를 포함하는 재조합 CMV 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않는 재조합 CMV 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 다음을 발현하지 않는다: 활성 UL128 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL146/147 단백질 또는 이의 오툴로그. 또한 본원에서는 적어도 하나의 이종성 단백질 항원을 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 HCMV 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않는 활성 UL128 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오툴로그; 또는 화령 UL146/147 단백질 또는 이의 오툴로그를 발현하지 않는 인간 사이토메갈로바이러스 (HCMV) 벡터가 제공된다. 대상체에서 이종성 항원에 대한 면역 반응을 생성시키는 방법과 같은, 신규한 재조합 CMV 벡터를 사용하는 방법이 추가로 기재된다.

I. 용어

[0025] 달리 주지되지 않는 경우, 기술적 용어는 통상적인 용법에 따라 사용된다.

[0026] 본원에 인용된, 모든 공보, 특히 출원, 인터넷 사이트, 및 승인 번호/데이터베이스 서열 (폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열 둘 다를 포함하는)은 각각의 개별 공보, 특히 출원, 인터넷 사이트 또는 승인 번호/데이터베이스 서열이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 인용되기 위해 지적되는 동일한 정도로 모든 목적을 위해 이들의 전문이 참조로 인용된다.

[0027] 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료는 본 발명의 수행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 하기에 기재된다. 추가로, 재료, 방법 및 예는 단지 설명을 위한 것이고 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원의 개시내용의 다양한 구현예의 검토를 촉진시키기 위해, 특정 용어의 하기의 설명이 제공된다:

[0028] **항원**: 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원" 또는 "면역원"은 대상체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 물질, 전형적으로 단백질을 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 대상체에 투여되면 (직접적으로 또는 상기 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 벡터를 대상체에게 투여함에 의해) 단백질이 상기 단백질에 대하여 지시된 체액성 및/또는 세포성 유형의 면역 반응을 유발할 수 있는 의미에서 면역학적으로 활성인 단백질을 언급한다.

[0029] **투여**: 본원에 사용된 바와 같은 용어 "투여"는 임의의 효과적인 경로에 의해 외인성 항원을 포함하는 유효량의 CMV 벡터를 포함하는 조성물과 같은 제제를 대상체에게 제공하거나 부여함을 의미한다. 예시적 투여 경로는 주사 (예를 들어, 피하, 근육내, 피내, 복막내 및 정맥내), 경구, 설하, 직장, 경피, 비강내, 질 및 흡입 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0030] **유효량**: 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유효량"은 목적하는 반응을 생성하는, 즉, 병태 또는 질환의 징후 또는 증상을 감소시키거나 제거하거나, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 것과 같은 목적하는 반응을 생성하기에 충분한, 이종성 항원을 포함하는 CMV 벡터 또는 MHC-E/이종성 항원-유래된 웨بت아이드 복합체를 인지하는 형질감염된 CD8+ T 세포와 같은 제제의 양을 언급한다. 일부 예에서, "유효량"은 하나 이상의 증상, 및/또는 장애 또는 질환 중 어느 하나의 근본 원인을 치료하는 (예방을 포함하는) 양이다. 유효량은 치료학적 유효량일 수 있고, 이는 감염성 질환, 암 또는 자가면역 질환과 관련된 하나 이상의 징후 또는 증상과 같은 특정 질환 또는 병태의 하나 이상의 징후 또는 증상이 발병하는 것을 예방하는 양을 포함한다.

[0031] **마이크로RNA**: 본원에 사용된 바와 같은 용어 "마이크로RNA" 또는 "miRNA"는 유전자 발현 조절에 관여하는 주요 부류의 생분자를 언급한다. 예를 들어, 인간 심장, 간 또는 뇌에서, miRNA는 조직 구체화 또는 세포 계통 결정에서의 역할을 수행한다. 추가로, miRNA는 조기 발병, 세포 사멸 및 아폽토시스 및 지방 대사를 포함하는 다양

한 과정에 영향을 미친다. 대다수의 miRNA 유전자들, 다양한 발현 패턴 및 잠재적 miRNA 표적의 풍부함은 mRNA가 유전자 다양성의 상당한 공급원일 수 있음을 시사한다.

[0033] 성숙한 miRNA는 전형적으로 miRNA에 상보적인 서열을 포함하는 mRNA의 발현을 조절하는 18-25개 뉴클레오타이드 비-암호화 RNA이다. 이들 작은 RNA 분자는 mRNA의 안정성 및/또는 해독을 조절함에 의해 유전자 발현을 제어하는 것으로 공지되어 있다. 예를 들어, miRNA는 표적 mRNA의 3' UTR에 결합하고 해독을 억제한다. MiRNA는 또한 표적 mRNA에 결합하고 RNAi 경로를 통해 유전자 사일런싱을 매개할 수 있다. MiRNA는 또한 염색질 응축을 유발함에 의해 유전자 발현을 조절할 수 있다.

[0034] miRNA는 mRNA 전사체 상에 어딘가의 miRNA와 직접 염기쌍을 형성하고 이와 상호작용하는 임의의 서열로서 한정된, miRNA 인지 요소 (MRE)에 결합함에 의해 하나 이상의 특이적 mRNA 분자의 해독을 사일런싱한다. 흔히, MRE는 mRNA의 3' 비해독 영역 (UTR)에 존재하지만 이것은 또한 암호화 서열 또는 5' UTR에 존재할 수 있다. MRE는 일반적으로 miRNA에 단지 몇개 염기쌍의 상보성을 갖고 흔히 상보성의 상기 염기 내 하나 이상의 미스매치를 함유하는, miRNA에 대해 필수적으로 완벽한 상보체는 아니다. MRE는 MRE가 작동적으로 연결된 유전자 (생체내 성장을 위해 필수적이거나 증가시키는 CMV 유전자와 같은)의 해독이 RISC와 같은 miRNA 사일런싱 기작에 의해 억제되기에 충분히 miRNA에 의해 결합될 수 있는 임의의 서열일 수 있다.

[0035] **돌연변이:** 본원에 사용된 바와 같은 용어 "돌연변이"는 정상, 컨센서스 또는 "야생형" 서열과의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열에서 임의의 차이를 언급한다. 돌연변이체는 돌연변이를 포함하는 임의의 단백질 또는 핵산 서열이다. 추가로, 돌연변이를 갖는 세포 또는 유기체는 또한 돌연변이체로서 언급될 수 있다.

[0036] 임의의 유형의 암호화 서열 돌연변이는 점 돌연변이 (개별 뉴클레오타이드 또는 아미노산에서의 차이); 사일런트 돌연변이 (아미노산 변화를 유발하지 않는 뉴클레오타이드에서의 차이); 결실 (하나 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산이 유전자의 전체 암호화 서열의 결실까지 및 이를 포함하는, 소실된 차이); 프레임전환 돌연변이 (3개까지 개별적일 수 있는 뉴클레오타이드 수의 결실이 아미노산 서열의 변형을 유도하는 차이)를 포함한다. 아미노산에서의 차이를 유도하는 돌연변이는 또한 아미노산 치환 돌연변이로 불리울 수 있다. 아미노산 치환 돌연변이는 아미노산 서열 내 특정 위치에서 야생형과 대비하여 아미노산 변화로 기재될 수 있다.

[0037] **뉴클레오타이드 서열 또는 핵산 서열:** 용어 "뉴클레오타이드 서열" 및 "핵산 서열"은 제한 없이 전령 RNA (mRNA), DNA/RNA 하이브리드, 또는 합성 핵산을 포함하는, 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 서열을 언급한다. 핵산은 단일 가닥, 또는 부분적으로 또는 완전히 이중 가닥 (듀플렉스)일 수 있다. 듀플렉스 핵산은 호모듀플렉스 또는 헤테로듀플렉스일 수 있다.

[0038] **작동적으로 연결된:** 용어 "작동적으로 연결된"이 본원에 사용된 바와 같이, 제1 핵산 서열은 이것이 제2 핵산 서열 상에 효과를 갖도록 하는 방식으로 위치되는 경우 제2 핵산 서열과 작동적으로 연결되어 있다. 예를 들어, MRE는 miRNA의 MRE로의 결합이 암호화 서열의 발현을 사일런싱하는 경우 이것이 사일런싱하는 암호화 서열에 작동적으로 연결되어 있다. 작동적으로 연결된 DNA 서열은 연속성일 수 있거나 이들은 일정 거리에서 작동할 수 있다.

[0039] **프로모터:** 본원에 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 핵산의 전사를 지시하는 임의의 다수의 핵산 제어 서열을 언급할 수 있다. 전형적으로, 진핵 세포 프로모터는 폴리미라제 II형 프로모터의 경우에서와 같이 전사의 개시 부위 근처 필요한 핵산 서열, TATA 요소 또는 하나 이상의 전사 인자에 의해 인지되는 임의의 다른 특이적 DNA 서열을 포함한다. 프로모터에 의한 서열은 추가로 인핸서 또는 리프레서 요소에 의해 조절될 수 있다. 프로모터의 수많은 예는 가용하고 당업자에게 널리 공지되어 있다. 특정 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 핵산은 발현 벡터로 호칭될 수 있다.

[0040] **재조합체:** 본원에 사용된 바와 같이, 핵산 또는 폴리펩타이드와 관련하여 용어 "재조합체"는 천연적으로 존재하지 않거나 2개 이상의 다른 분리된 서열 절편의 인공 조합에 의해 만들어지는 서열을 갖는 것, 예를 들어, 이종성 항원을 포함하고/하거나, 생체내 성장을 위해 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된 miRNA 반응 요소의 첨가에 의해 복제 결립이 된 CMV 벡터를 언급한다. 상기 인공 조합은 흔히 화학적 합성에 의해 또는 보다 통상적으로 핵산의 단리된 절편의 인공 조작에 의해, 예를 들어, 유전학적 가공 기술에 의해 성취된다. 재조합 폴리펩타이드는 또한 폴리펩타이드의 천연 공급원이 아닌 숙주 유기체로 전달되는 재조합 핵산 재조합 핵산 (예를 들어, 이종성 항원을 포함하는 CMV 벡터를 형성하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산)을 포함하는, 재조합 핵산을 사용하여 만들어진 폴리펩타이드를 언급할 수 있다.

[0041] **복제-결핍:** 본원에 사용된 바와 같은 "복제 결핍" CMV는 일단 숙주 세포에서 바이러스 복제를 진행할 수 없고,

이의 계놈을 복제하여 비리온을 생성하는 능력이 상당히 제한되어 확산-결핍 또는 확장-결핍인 바이러스이다. 예를 들어, 확산-결핍인 복제-결핍 바이러스는 이들의 계놈을 복제할 수 있지만 바이러스 입자가 감염된 세포로부터 방출되지 않기 때문에 또는 비-감염성 바이러스 입자가 방출되기 때문에 또 다른 세포를 감염시킬 수 없다. 또 다른 예에서, 확장-결핍인 복제-결핍 바이러스는 이들의 계놈을 복제할 수 있고 또 다른 세포를 감염시킬 수 있지만 감염된 숙주로부터 분비되지 않고 따라서 숙주에서 숙주로 확장할 수 없다. 일부 구현예에서, 복제-결핍 CMV는 바이러스 복제에 필수적인 하나 이상의 유전자 ("필수 유전자") 또는 최적의 복제를 위해 요구되는 하나 이상의 유전자 ("증가시키는 유전자") 발현의 부재를 유도하는 돌연변이를 포함하는 CMV이다. CMV 성장에 필수적이고 증가시키는 유전자는 당업계에 기재되어 있고 (특히, US 2013/0136768, 이는 본원에 참조로 인용됨) 본원에 기재되어 있다.

[0042] 약제학적으로 허용되는 담체: 본원에 사용된 바와 같은, 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 통상적이다. 문헌(참조: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th Edition, 1995)은 본원에 기재된 조성물의 약제학적 전달을 위해 적합한 조성물 및 제형을 기재하고 있다. 일반적으로, 담체의 특성은 사용되는 특정 투여 방식에 의존한다. 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 비히클로서 물, 생리학적 식염수, 균염 용액, 수성 텍스트로스, 글리세롤 등과 같은 약제학적으로 및 생리학적으로 허용되는 유체를 포함하는 주사가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물 (예를 들어, 산제, 환제, 정제 또는 캡슐 형태)에 대해, 통상적인 비-독성 고체 담체는 예를 들어, 약제학적 등급의 만니톨, 락토스 또는 마그네슘 스테아레이트를 포함할 수 있다. 생물학적 중성 담체에 추가로, 투여될 약제학적 조성물은 소량의 비-독성 보조 물질, 예를 들어, 습윤화제 또는 유화제, 방부제 및 pH 완충제 등, 예를 들어, 나트륨 아세테이트 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.

[0043] 폴리뉴클레오타이드: 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 중합체를 언급한다. 폴리뉴클레오타이드는 4개의 염기로 구성된다; 아데닌, 시토신, 구아닌, 및 티민/우라실(우라실이 RNA에 사용된다). 핵산으로부터의 암호화 서열은 핵산에 의해 암호화된 단백질의 서열을 지적한다.

[0044] 폴리펩타이드: 용어 "단백질", "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "아미노산 서열"은 본원에서 임의의 길이의 아미노산 잔기의 중합체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 중합체는 선형이거나 측쇄형일 수 있고 이것은 변형된 아미노산 또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있고 이것은 아미노산 이외의 다른 화학적 모이어티에 의해 차단될 수 있다. 용어는 또한 천연적으로 변형되거나 개입, 예를 들어, 디설파이드 결합 형성, 당화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 라벨링 또는 생활성 성분과의 접합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변형에 의해 변형된 아미노산 폴리머를 포함한다.

[0045] 서열 동일성/유사성: 본원에 사용된 바와 같은 2개 이상의 핵산 서열, 또는 2개 이상의 아미노산 서열 간의 동일성/유사성은 서열 간의 동일성 또는 유사성 측면에서 표현된다. 서열 동일성은 퍼센트 동일성으로 측정될 수 있고; 퍼센트가 높을 수록 서열은 보다 동일하다. 서열 유사성은 퍼센트 동일성 또는 유사성 측면에서 측정될 수 있고 (이는 보존적 아미노산 치환을 고려한다); 퍼센트가 높을 수록 서열은 보다 유사하다. 상당량의 서열 동일성을 갖고 또한 서로에 대해 동일하거나 유사하게 기능하는 폴리펩타이드 또는 이의 단백질 도메인 (예를 들어, 상이한 종 또는 단백질의 기능 또는 이의 정도를 변화시키지 않는, 단백질의 돌연변이 형태에서 동일한 기능을 하는 단백질)은 "동족체"로 호칭될 수 있다

[0046] 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리듬은 하기 문헌에 기재되어 있다: Smith & Waterman, *Adv Appl Math* 2, 482 (1981); Needleman & Wunsch, *J Mol Biol* 48, 443 (1970); Pearson & Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2444 (1988); Higgins & Sharp, *Gene* 73, 237-244 (1988); Higgins & Sharp, *CABIOS* 5, 151-153 (1989); Corpet *et al*, *Nuc Acids Res* 16, 10881-10890 (1988); Huang *et al*, *Computer App Biosci* 8, 155-165 (1992); and Pearson *et al*, *Meth Mol Bio* 24, 307-331 (1994). 추가로, 문헌(참조: Altschul *et al*, *J Mol Biol* 215, 403-410 (1990))은 서열 정렬 방법 및 상동성 계산의 상세한 고려를 제공한다.

[0047] NCBI 기본 국소 정렬 검색 도구 (BLAST) (Altschul *et al*. (1990), 상기 참조)는 여러 공급원으로부터 가용하고, 상기 공급원은 공급원 (National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894)을 포함하고 서열 분석 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 연계하여 사용하기 위해 인터넷 상에서 가용하다. 추가의 정보는 NCBI 웹 사이트에서 발견될 수 있다.

- [0048] BLASTN은 핵산 서열을 비교하기 위해 사용되고, BLASTP는 아미노산 서열을 비교하기 위해 사용된다. 2개의 비교된 서열이 상동성을 공유하는 경우, 이어서 상기 지적된 아웃풋 파일은 정렬된 서열과의 상기 상동성 영역을 제공한다. 2개의 비교된 서열이 상동성을 공유하지 않는 경우, 이어서 상기 지적된 아웃풋 파일은 정렬된 서열을 제공하지 않는다.
- [0049] 일단 정렬되면, 매칭 수는 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 서열 둘 다에 제공된 경우의 위치의 수를 계수함에 의해 결정된다. 퍼센트 서열 동일성은 매칭 수를 동정된 서열에 제시된 서열의 길이로 또는 연속된 길이 (예를 들어, 동정된 서열에 제시된 서열로부터 100개 연속 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기)로 나누고 이어서 수득한 값에 100을 곱하여 결정된다. 예를 들어, 1154개 뉴클레오타이드를 갖는 시험 서열과 정렬되는 경우 1166개 매칭을 갖는 핵산 서열은 시험 서열과 75.0 퍼센트 동일하다 ($1166 \div 1554 \times 100 = 75.0$). 퍼센트 서열 동일성 값은 최근접 10분의 1로 한다. 예를 들어, 75.11, 75.12, 75.13, 및 75.14는 75.1로 하고, 75.15, 75.16, 75.17, 75.18, 및 75.19는 75.2로 한다. 길이 값은 항상 정수이다. 또 다른 예에서, 다음과 같이 동정된 서열로부터 20개 연속 뉴클레오타이드와 정렬하는 20개 뉴클레오타이드 영역을 함유하는 표적 서열은 상기 동정된 서열과 75퍼센트 서열 동일성을 공유하는 영역 (즉, $15 \div 20 \times 100 = 75$)을 함유한다.
- [0050] 약 30개 초과의 아미노산의 아미노산 서열의 비교를 위해, Blast 2 서열 기능은 디폴트 파라미터로의 디폴트 BLOSUM62 매트릭스 세트를 사용하여 사용된다 (11의 캡 존재 코스트, 및 1의 잔기당 캡 코스트). 동족체는 전형적으로 nr 데이터베이스, 스위스프로트 데이터베이스 및 특허된 서열 데이터베이스와 같은 데이터베이스와 함께 NCBI 기본 Blast 2.0, 캡핑 blastp를 사용하는 아미노산 서열과의 전장 정렬 상에서 계수된 적어도 70% 서열 동일성을 가짐을 특징으로 한다. blastn 프로그램으로 검색된 의문은 DUST (Hancock & Armstrong, *Comput Appl Biosci* 10, 67-70 (1994.))로 필터링한다 다른 프로그램은 SEG를 사용한다. 추가로, 수동 정렬을 수행할 수 있다. 심지어 보다 큰 유사성을 갖는 단백질은 상기 방법에 의해 평가되는 경우 증가하는 퍼센트 동일성, 예를 들어, 단백질에 대해 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 보여준다.
- [0051] 짧은 웹타이드 (약 30개 미만의 아미노산)을 정렬하는 경우, 상기 정렬은 디폴트 파라미터 (개방 캡 9, 연장 캡 1 폐널티)로의 PAM30 매트릭스 세트를 사용하는, Blast 2 서열 기능을 사용하여 수행된다. 참조 서열과 심지어 보다 큰 유사성을 갖는 단백질은 상기 방법에 의해 평가되는 경우 증가하는 퍼센트 동일성, 예를 들어, 단백질에 대해 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 보여준다. 전체 미만의 서열이 서열 동일성을 위해 비교되는 경우, 동족체는 전형적으로 10 내지 20개 아미노산의 짧은 윈도우에 걸쳐 적어도 75% 서열 동일성을 갖고, 표준 서열과 이들의 동일성에 의존하여 적어도 85%, 90%, 95% 또는 98%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 상기 짧은 윈도우 상에서 서열 동일성을 결정하기 위한 방법은 NCBI 웹 사이트에 기재되어 있다.
- [0052] 2개의 핵산 문자가 밀접하게 관련되어 있다는 하나의 지적은 2개의 문자가 상기된 바와 같이 염증 조건하에서 서로 하이브리드화한다는 것이다. 고도의 동일성을 보여주지 않는 핵산 서열은 그럼에도 불구하고, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 동일하기 유사한 (보존된) 아미노산 서열을 암호화할 수 있다. 핵산 서열에서의 변화는 상기 축퇴성을 사용하여 실질적으로 동일한 모든 단백질을 암호화하는 다중 핵산 문자를 생성하기 위해 만들어질 수 있다. 상기 상동성 핵산 서열은 예를 들어, 단백질을 암호화하는 핵산과 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0053] **대상체:** 본원에 사용된 바와 같은 용어 대상체는 인간 및 비-인간 포유동물 둘 다를 포함하는 카테고리인 생존 다중-세포 척추동물 유기체를 언급한다.
- [0054] **슈퍼토프:** 본원에 사용된 바와 같은 용어 "슈퍼토프" 또는 "슈퍼토프 웹타이드"는 MHC 반수체형과 상관없이, 즉, 소정의 MHC-I 또는 MHC-II 대립유전자의 존재 또는 부재하에 90% 초과의 집단에서 T 세포에 의해 인지되는 에피토프 또는 웹타이드를 언급한다.
- [0055] **치료:** 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료"는 질환 또는 병리학적 병태의 징후 또는 증상을 완화시키는 중재를 언급한다. 질환, 병리학적 병태 또는 증상과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료", "치료한다" 및 "치료하는"은 또한 치료의 임의의 관찰 가능한 이로운 효과를 언급한다. 이로운 효과는 예를 들어, 민감할 수 있는 대상체에서 질환의 임상적 증상의 자연 발병, 질환의 일부 또는 모든 임상 증상의 중증도에서 감소, 질환의 보다 느린 진행, 질환의 재발 횟수의 감소, 대상체의 전체 건강 또는 웰빙에서의 개선에 의해 또는 특정 질환에 특이적인 당업계에 널리 공지된 다른 파라미터에 의해 입증될 수 있다. 예방적 치료는 병 위험을 감소시킬 목적으로, 질환의 징후를 나타내지 않거나, 단지 초기 징후를 나타내는 대상체에게 적용되는 치료이다. 치

료학적 치료는 질환의 정후 및 증상이 발병된 후 대상체에게 적용되는 치료이다.

II. 재조합 CMV 백터 및 이를 사용하는 방법

본원에 기재된 것은 유기체를 반복적으로 감염시킬 수 있는 인간 또는 동물 사이토메갈로바이러스 (CMV) 백터이다. CMV 백터는 이종성 단백질 항원을 암호화하고 활성 UL128, UL130, UL146 및 UL147 단백질의 발현이 부재인 핵산 서열을 포함한다. 상기 백터는 활성 UL40, US27 및 US28 유전자를 함유한다. 일부 구현예에서, CMV 백터는 인간 CMV (HCMV) 백터, 시노몰구스 CMV (CyCMV) 백터, 또는 레서스 CMV (RhCMV) 백터이다.

또한 본원에 기재된 것은 상기 변형 모두를 포함하고 추가로 내피 세포에 의해 발현되는 miRNA의 존재에서 발현을 사일런싱하는 miRNA 반응 요소 (MRE)로서 작용하는 핵산 서열을 포함하는 CMV 백터이다. 내피 세포에 의해 발현되는 상기 miRNA의 예는 miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296 및 miR-328을 포함한다(문헌참조: Wu F, Yang Z, Li G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2009;386(4):549. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.075.); 본원에 참조로 인용됨). MRE는 생체내 CMV 성장을 위해 필수적이거나 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된다. 상기 유전자의 예는 IE2 및 UL79, 또는 이의 오톨로그를 포함한다. 1개, 2개, 3개 이상의 CMV 유전자는 각각 백터 내 1개, 2개, 3개 이상의 MRE에 작동적으로 연결될 수 있다.

일부 구현예에서, MRE는 내피 세포에 의해 발현되는 miRNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 임의의 miRNA 인지 요소일 수 있다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296, 및 miR-328 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 miR-126-3p (서열번호 1)의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 서열번호 2의 서열을 포함한다.

일부 구현예에서, 본원에 기재된 CMV 백터는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 제1 MRE 및 골수 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 제2 MRE를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 MRE는 miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296, 및 miR-328 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 제1 MRE는 miR-126-3p (서열번호 1)의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 백터의 제1 MRE는 서열번호 2의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 MRE는 miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR146a, miR-132, miR-21, 및 miR-125 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 제2 MRE는 miR-142-3p (서열번호 3)의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 백터의 제2 MRE는 서열번호 4의 서열을 포함한다. miR-142-3p의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 CMV 백터는 예를 들어, 이의 전문이 본원에 참조로 인용되는 문헌(참조: WO 2017/087921)에 기재되어 있다.

상기 MRE는 miRNA의 정확한 상보체일 수 있다. 대안적으로, 다른 서열은 소정의 miRNA에 대해 MRE로서 사용될 수 있다. 예를 들어, MRE는 서열로 부터 예측될 수 있다. 하나의 예에서, 상기 miRNA는 웹사이트 마이크로 RNA.org (www.microrna.org) 상에서 검색될 수 있다. 이어서, miRNA의 mRNA 표적 목록이 열거된다. 예를 들어, 하기의 페이지(<http://www.microrna.org/microrna/getTargets.do?matureName=hsa-miR-142-3p&organism=9606, last accessed 06 Oct 2015>)는 miR-142-3p의 추정 mRNA 표적을 열거한다. 상기 페이지 상에 각각 열거된 표적에 대해, '할당 세부사항'이 평가될 수 있고 추정 MRE가 평가된다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296, 및 miR-328 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 miR-126-3p (서열번호 1)의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 miR-142-3p (서열번호 3)의 존재하에 발현을 사일런싱할 수 있다. 일부 구현예에서, 백터의 MRE는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 추가의 구현예에서, 백터의 MRE는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

당업자는 내피 세포 또는 대식세포와 같은 골수 세포에서 발현된 miRNA의 존재하에 사일런싱을 유도할 것으로 예측되는 문헌으로부터 확증된, 추정 또는 돌연변이된 MRE 서열을 선택할 수 있다. 하나의 예는 상기 언급된 웹사이트를 포함한다. 당업자는 이어서 발현 작제물을 수득할 수 있고 이에 의해 리포터 유전자 (예를 들어, 형광성 단백질, 효소 또는 다른 리포터 유전자)는 항상성 활성 프로모터 또는 세포-특이적 프로모터와 같은 프로모터에 의해 구동된 발현을 갖는다. 이어서 MRE 서열은 발현 작제물에 도입될 수 있다. 발현 작제물로 적당한 세포를 형질감염시킬 수 있고 목적하는 miRNA를 세포에 형질감염시킬 수 있다. 리포터 유전자의 발현 부재는 MRE가 miRNA의 존재하에 유전자 발현을 사일런싱함을 지적한다.

[0063]

병원체 특이적 항원은 임의의 인간 또는 동물 병원체로부터 유래할 수 있다. 병원체는 바이러스 병원체일 수 있고 상기 항원은 바이러스 병원체로부터 유래된 단백질일 수 있다. 바이러스는 아데노바이러스, 쿠삭키에바이러스(coxsackievirus), A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스, 리노바이러스, 단순 헤르페스 1형 바이러스, 단순 헤르페스 2형 바이러스, 바리셀라-조스터 바이러스, 엡슈타인-바르 바이러스, 카포시 육종 헤르페스바이러스, 인간 사이토메갈로바이러스, 인간 헤르페스 바이러스, 8형, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 황열 바이러스, 뎅귀열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 멘즈 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 신시티알 바이러스, 인간 메타뉴노모바이러스, 인간 파필로마(유두종) 바이러스, 랍비 바이러스, 루멜라 바이러스, 인간 보카바이러스 및 파르보바이러스 B19를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0064]

병원체는 세균 병원체일 수 있고 상기 항원은 세균 병원체로부터 유래된 단백질일 수 있다. 병원성 세균은 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis), 보렐리아 부르그도르페리(Borrelia burgdorferi), 브루셀라 아보투스(Brucella abortus), 브루셀라 카니스(Brucella canis), 브루셀라 멜리텐시스(Brucella melitensis), 브루셀라 수이스(Brucella suis), 캄필로박ter 제주니(Campylobacter jejuni), 클라미디아 뉴모니아(Chlamydia pneumoniae), 클라미디아 트라코마티스(Chlamydia trachomatis), 클라미도필라 프시타시(Chlamydophila psittaci), 클로스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum), 클로스트리디움 디피실(Clostridium difficile), 클로스트리디움 퍼프린겐스(Clostridium perfringens), 클로스트리디움 테타니(Clostridium tetani), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diphtheriae), 엔테로코커스 패칼리스(Enterococcus faecalis), 엔테로코커스 과에시움(Enterococcus faecium), 에스케리치아 콜라이(Escherichia coli), 프란시셀라 툴라렌시스(Francisella tularensis), 해모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae), 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 렘토스피라 인터로간스(Leptospira interrogans), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 레프라에(Mycobacterium leprae), 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 울서란스(Mycobacterium ulcerans), 마이코플라스마 뉴모니아(Mycoplasma pneumoniae), 나이세리아 고노로에아(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메닌기티디스(Neisseria meningitidis), 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 리케치아 리케치(Rickettsia rickettsii), 살모넬라 타이피(Salmonella typhi), 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium), 쉬겔라 소네이(Shigella sonnei), 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 스타필로코커스 에피데미디스(Staphylococcus epidermidis), 스타필로코커스 사프로피티쿠스(Staphylococcus saprophyticus), 스트렙토코커스 아갈락티아(Streptococcus agalactiae), 스트렙토코커스 뉴모니아(Streptococcus pneumoniae), 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes), 트레포네마 팔리듐(Treponema pallidum), 비브리오 콜레라(Vibrio cholera) 및 예르시니아 페스티스(Yersinia pestis)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0065]

병원체는 기생충일 수 있고 상기 항원은 기생충 병원체로부터 유래된 단백질일 수 있다. 기생충은 원생동물 유기체 또는 이에 제한되지 않지만 아칸타모에바(Acanthamoeba), 바베시오시스(Babesiosis), 발란티디아시스(Balantidiasis), 블라스토시스토시스(Blastocystosis), 쿡시디아(Coccidia), 디엔타모에비아시스(Dientamoebiasis), 아모에비아시스(Amoebiasis), 기아디아(Giardia), 이소스포리아시스(Isosporiasis), 레이슈마니아시스(Leishmaniasis), 1차 아모에빅 메니고엔세팔리티스(Primary amoebic meningoencephalitis) (PAM), 말라리아(Malaria), 리노스포리디오시스(Rhinosporidiosis), 톡소플라스모시스(Toxoplasmosis)--기생충 뉴모니아(Parasitic pneumonia), 트리코모니아시스(Trichomoniasis), 수면병 및 샤가스(Chagas) 질환과 같은 질환을 유발하는 원생동물 유기체일 수 있다. 기생충은 유충 유기체 또는 벌레일 수 있거나 유충 유기체에 의해 유발된 질환은 예를 들어 이에 제한되지 않지만 십이지장충/구충, 고래회충증, 회충--기생충 폐렴, 회충--아메리카나구리회충증, 촌충--촌충 감염, 간흡충증, 신충 감염(Dioctophyme renalis infection), 열두조충증(Diphyllobothriasis)--촌충, 기니 벌레(Guinea worm)--메디나충증(Dracunculiasis), 포충증(Echinococcosis)--촌충, 요충--요충증(Enterobiasis), 간질증(Liver fluke)--간질증(Fascioliosis), 비대흡충증(Fasciolopsiasis)--창자 흡충(intestinal fluke), 악구충증(Gnathostomiasis), 왜소조충증(Hymenolepiasis), 로아 이오아 필라리아시스(Loa loa filariasis), 칼라바르종창(Calabar swellings), 만소넬라증(Mansonelliasis), 필라리아증(Filariasis), 요코가와흡충증--장흡충(ntestinal fluke), 사상충증(River blindness), 중국 사상충증(Chinese Liver Fluke), 폐흡충증(Paragonimiasis), 폐흡충, 주혈흡충증(Schistosomiasis)--빌하르쯔주혈흡충(bilharzia), 주혈흡충증(bilharziosis) 또는 스네일 피버(snail fever) (모든 유형), 장 주혈흡충증, 뇨 주혈흡충증, 시스토소마 자포니쿰(Schistosoma japonicum)에 의한 주혈흡충증, 아시아 장 주혈흡충증, 스파르가눔증(Sparganosis), 분선충증(Strongyloidiasis)--기생충 폐렴, 소 촌충, 돼지

촌충, 개회충증(Toxocariasis), 선모충증, 물놀이 가려움증(Swimmer's itch), 편충(Whipworm) 및 상피병 림프구 필라리아증(Elephantiasis Lymphatic filariasis)이다. 기생충은 유기체일 수 있고 유기체에 의해 유발되는 질환은 이에 제한되지 않지만 예를 들어, 기생충 별례, 간질인두염 증후군(Halzoun Syndrome), 구더기증 (Myiasis), 모래벼룩, 인간 쇠파리 및 흡혈메기에 의해 유발된다. 기생충은 체외기생충일 수 있거나 외부기생충에 의해 유발된 질환은 이에 제한되지 않지만 예를 들어, 빈대(Bedbug), 머릿니--슬증(Pediculosis), 봄이--슬증(Pediculosis), 사면벌니(Crab louse)--슬증(Pediculosis), 모낭충(Demodex)--모낭충증, 옴(Scabies), 나선구더기(Screwworm) 및 코클리오미아증(Cochliomyia)이다.

[0066]

항원은 암으로부터 유래된 단백질일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 암은 백혈병, 림프종, 육종 및 고형 종양으로부터 유래된 것들을 포함한다. 암은 급성 림프모구 백혈병; 급성 골수 백혈병; 부신피질 암종; AIDS-관련 암; AIDS-관련 림프종; 항문암; 맹장암; 성상세포종, 어린이 소뇌 또는 대뇌암; 기저 세포 암종; 담관암, 간외; 방광암; 골암, 골육종/악성 섬유 조직구종; 뇌줄기 신경교종; 뇌 종양; 뇌 종양, 소뇌 성상세포종; 뇌 종양, 대뇌 성상세포종/악성 신경교종; 뇌 종양, 뇌식막세포종; 뇌 종양, 수모세포종; 뇌 종양, 천막상위경막 원시 신경외배엽 종양; 뇌 종양, 가시 경로 및 시상하부 신경교종; 유방암; 기관지 선암종/카르티노이드; 베켓 림프종; 카르시노이드 종양, 어린이; 카르시노이드 종양, 위장; 미지의 주요 암종; 중추 신경계 림프종, 1차; 소뇌 성상세포종, 어린이; 대뇌 성상세포종/악성 신경교종, 어린이; 자궁경관암; 어린이 암; 만성 림프구 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수증식성 장애; 결장암; 피부 T-세포 림프종; 결합조직성 소원형세포 종양; 자궁내막암; 뇌실막세포종; 식도암; 종양의 어왕 계열에서 어왕 육종; 두개외 생식 세포 종양, 어린이; 곤달외 생식 세포 종양(Extragonadal Germ cell tumor); 간외 담관암; 눈암, 안내 흑색종; 눈암, 망막모세포종; 단낭암; 위(위(Stomach)) 암; 위장 카르시노이드 종양; 위장 기질 종양(GIST); 생식 세포 종양: 두개외, 생식선외, 또는 난소; 임신융모 종양; 뇌줄기의 신경교종; 신경교종, 어린이 대뇌 성상세포종; 신경교종, 어린이 가시 경로 및 시상하부; 위 카르시노이드; 모발 세포 백혈병; 두경부암; 심장암; 간세포 (간) 암; 호지킨 림프종; 하인두암; 시상하부 및 가시 경로 신경교종, 어린이; 안내 흑색종; 섬 세포 암종(내분비 췌장); 카포시 육종; 콩팥암(신장 세포암); 후두암; 백혈병; 백혈병, 급성 림프모구(또한 급성 림프구 백혈병으로 불리움); 백혈병, 급성 골수(또한 급성 골수성 백혈병으로 불리움); 백혈병, 만성 림프구(또한 만성 림프구 백혈병으로 불리움); 백혈병, 만성 골수성(또한 만성 골수 백혈병으로 불리움); 백혈병, 모발 세포; 입술 및 구강암; 간암(1차); 폐암, 비-소세포; 폐암, 소세포; 림프종; 림프종, AIDS-관련; 림프종, 베켓(Burkitt); 림프종, 피부 T-세포; 림프종, 호지킨; 림프종, 비-호지킨 (호지킨을 제외한 모든 림프종의 구부류); 림프종, 1차 중추 신경계; 마커스 위틀(Marcus Whittle), 치명적 질환; 거대글로불린혈증, 월덴스트림(Waldenström); 골의 악성 섬유 조직구종/골육종; 수모세포종, 어린이; 흑색종; 흑색종, 안내 (눈); 메르켈 세포 암종; 중피종, 성인 악성; 중피종, 어린이; 잠복 원발을 갖는 전이성 비늘모양 경부암; 구강암; 다발성 내분비 신생물 증구훈, 어린이; 다발성 골수종/혈장 세포 신생물; 균상식육종; 골수형성이상증후군; 골수형성이상/골수증식성 질환; 골수성 백혈병, 만성; 골수 백혈병, 성인 급성; 골수 백혈병, 어린이 급성; 골수종, 다발성 (골수암); 골수증식성 장애, 만성; 비강 및 부비강 암; 비인두 암종; 신경모세포종; 비-호지킨 림프종; 비-소 세포 폐암; 경구암; 구강인두암; 골육종/골의 악성 섬유 조직구종; 난소암; 난소 상피 암(표면 상피-기질 종양); 난소 생식 세포 종양; 난소 낫은 악성 잠재성 종양; 췌장암; 췌장암, 섬 세포; 부비강 및 비강 암; 부갑상선암; 음경암; 인두암; 갈색세포종; 송과체 성상세포종; 송과체 배아세포종; 송과체모세포종 및 근원 양성 원시 신경외배엽 종양(supratentorial primitive neuroectodermal tumors), 어린이; 뇌하수체 선종; 혈장 세포 신생물/다발성 골수종; 흉막폐 모세포종(Pleuropulmonary blastoma); 1차 중추 신경계 림프종; 전립선암; 직장암; 신장 세포 암종(콩팥암); 신장 골반 및 요관, 이행 세포암; 망막모세포종; 횡문근육종, 어린이; 침샘암; 육종, 종양의 어왕 계열; 육종, 카포시; 육종, 연조직; 육종, 자궁; 시자리 증후군(Sezary syndrome); 피부암 (비흑색종); 피부암 (흑색종); 피부 암종, 메르켈 세포(Merkel cell); 소 세포 폐암; 소장암; 연조직 육종; 비늘모양 암종--피부암 (비흑색종 침조); 잠복 원발을 갖는 비늘모양 경부암, 전이성; 위암; 근원 양성 원시 신경외배엽 종양, 어린이; T-세포 림프종, 피부 (균상식육종 및 시자리 증후군); 고환 암; 인후암; 흉선종, 어린이; 흉선종 및 흉선 암종; 갑상선암; 갑상선암, 어린이; 신우 및 요관의 이행 세포 암; 영양막 종양, 임신; 미지의 원발성 부위, 이의 암, 성인; 미지의 원발성 부위, 이의 암, 어린이; 요관 및 신우, 이행 세포암; 요도암; 자궁암, 자궁내막; 자궁 육종; 질 암; 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 어린이; 외음부암; 월덴스트림 거대글로불린혈증 및 빌름스 종양(콩팥암)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0067]

상기 벡터는 UL128, UL130, UL146, 또는 UL147을 암호화하는 핵산 서열 또는 이의 동족체 또는 이의 오톨로그 (다른 종을 감염시키는 CMV의 상동성유전자)에서 돌연변이의 존재로 인한 활성 UL128, UL130, U146, UL147 단백질을 발현하지 않는다. 돌연변이는 활성 단백질의 발현의 부재를 유도하는 임의의 돌연변이일 수 있다. 상기

돌연변이는 점 돌연변이, 프레임전환 돌연변이, 단백질을 암호화하는 모든 핵산 서열 미만의 결실 (절단 돌연변이), 또는 단백질을 암호화하는 모든 핵산 서열의 결실, 또는 임의의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0068] 추가의 예에서, 벡터는 UL128, UL130, 또는 UL146, 또는 UL147 단백질의 발현을 저해하는 안티센스 또는 RNAi 서열 (siRNA 또는 miRNA)을 포함하는 벡터 내 핵산 서열의 존재로 인해 활성 UL128, UL130, UL146 또는 UL147 단백질을 발현하지 않는다. 돌연변이 및/또는 안티센스 및/또는 RNAi는 임의의 조합으로 사용하여 활성 UL128, UL130, UL146 또는 UL147이 부재인 CMV 벡터를 생성시킬 수 있다.

[0069] CMV 벡터는 당업계에 공지된 추가의 불활성화 돌연변이를 포함하여 불활성화 US11 돌연변이 또는 불활성화 UL82 (pp71) 돌연변이, 또는 임의의 다른 불활성화 돌연변이와 같은 상이한 면역 반응을 제공할 수 있다. CMV 벡터는 또한 생체내 바이러스 확산 (즉, 세포에서 세포로의 확장)을 위해 필수적이거나 증가시키기 위해 당업계에 공지된 바이러스 단백질을 암호화하는 하나 이상의 바이러스 유전자에서 적어도 하나의 불활성화 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 불활성화 돌연변이는 점 돌연변이, 프레임전환 돌연변이, 절단 돌연변이, 또는 상기 바이러스 단백질을 암호화하는 모든 핵산 서열의 결실로부터 비롯될 수 있다. 불활성화 돌연변이는 최종적으로 바이러스 단백질의 감소된 기능 또는 완전한 상실을 유도하는 바이러스 유전자내 임의의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, CMV 벡터는 활성 UL82 (pp71) 단백질 또는 이의 오툴로그를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CMV 벡터는 활성 US11 단백질 또는 이의 오툴로그를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CMV 벡터는 활성 UL82 (pp71) 단백질 또는 활성 US11 단백질, 또는 이의 오툴로그를 발현하지 않는다.

[0070] 또한, 본원에 기재된 것은 대상체에서 이종성 항원에 대해 MHC-E 제한된 CD8⁺ T 세포 반응을 생성하는 방법이다. 상기 방법은 유효량의 CMV 벡터를 대상체에게 투여함을 포함한다. 하나의 구현예에서, CMV 벡터는 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 핵산 서열 및 활성 UL128, UL130, UL146, 또는 UL147 단백질을 발현하지 않는 핵산 서열을 가짐을 특징으로 한다. 상기 벡터에 의해 유발된 CD8⁺ T 세포 반응은 MHC-E에 의해 제공된 에피토프에 대해 지시된 CD8⁺ T 세포 중 적어도 10%를 가짐을 특징으로 한다. 추가의 예에서, CD8⁺ T 세포 중 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 95%는 MHC-E에 의해 제한된다. 일부 구현예에서, MHC-E에 의해 제한된 CD8⁺ T 세포는 벡터로 면역화된 다른 대상체의 적어도 90%가 공유하는 웨타이드를 인지한다. 일부 구현예에서, CD8⁺ T 세포는 MHC-E에 의해 제공된 슈퍼토프에 대해 지시된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 또한 부류 II MHC에 의해 제한된 CD8⁺ T 세포를 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터에 의해 유발되는 CD8⁺ T 세포의 적어도 10%는 부류 II MHC 또는 이의 오툴로그에 의해 제한된다. 일부 구현예에서, 벡터에 의해 유발되는 CD8⁺ T 세포 중 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 또는 적어도 75%는 부류 II MHC 또는 이의 오툴로그에 의해 제한된다. 일부 구현예에서, 부류 II MHC에 의해 제한된 CD8⁺ T 세포는 벡터로 면역화된 다른 대상체의 적어도 90%가 공유하는 웨타이드를 인지한다. 일부 구현예에서, CD8⁺ T II 세포는 부류 II MHC에 의해 제공된 슈퍼토프에 대해 지시된다.

[0071] 제2 구현예에서, CMV 벡터는 필수 CMV 유전자 IE2, 및 UL79 또는 이의 오툴로그에 작동적으로 연결된 miRNA 반응 요소 (MRE)로서 작용하는 핵산 서열을 가짐을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, MRE는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, MRE는 miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296, 및 miR-328 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, MRE는 miR-126-3p의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 벡터는 또한 적어도 하나의 이종성 항원을 함유하고 활성 UL128, UL130, UL146, 또는 UL147 단백질을 발현하지 않는다. 상기 벡터는 또한 활성 UL40, US28 및 US27을 함유한다. 상기 벡터에 의해 유발된 CD8⁺ T 세포 반응은 MHC-E에 의해 제공된 에피토프에 대해 지시된 CD8⁺ T 세포 중 적어도 10%를 가짐을 특징으로 한다. 추가의 예에서, CD8⁺ T 세포 중 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 또는 적어도 75%는 MHC-E에 의해 제한된다. 일부 구현예에서, MHC-E에 의해 제한된 CD8⁺ T 세포의 일부는 벡터로 면역화된 다른 대상체의 적어도 90%가 공유하는 웨타이드를 인지한다.

[0072] 일부 구현예에서, 상기 방법은 CMV 벡터에 의해 유발된 CD8⁺ T 세포로부터 CD8⁺ T 세포 수용체를 동정함을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD8⁺ T 세포 수용체는 MHC-E/이종성 항원-유래된 웨타이드 복합체를 인지한다. 일부 구현예에서, CD8⁺ T 세포 수용체는 DNA 또는 RNA 서열분석에 의해 동정된다.

[0073] 제3 구현예에서, CMV 벡터는 필수 CMV 유전자 IE2, 및 UL79 또는 이의 오툴로그에 작동적으로 연결된 MRE로서 작용하는 2개의 핵산 서열을 가짐을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 제1 MRE는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하고 제2 MRE는 골수 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA

의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 제1 MRE는 miR-126-3p, miR-130a, miR-210, miR-221/222, miR-378, miR-296, 및 miR-328 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 제1 MRE는 miR-126-3p의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 제2 MRE는 miR-142-3p, miR-223, miR-27a, miR-652, miR-155, miR146a, miR-132, miR-21, 및 miR-125 중 하나 이상의 존재에서 발현을 사일런싱한다. 일부 구현예에서, 제2 MRE는 miR-142-3p의 존재하에 발현을 사일런싱한다. 백터는 또한 적어도 하나의 이종성 항원을 함유하고 활성 UL128, UL130, UL146, 또는 UL147 단백질을 발현하지 않는다. 상기 백터는 또한 활성 UL40, US28 및 US27을 함유한다. 상기 백터에 의해 유발된 CD8+ T 세포 반응은 MHC 부류 Ia 의해 제공된 에피토프에 대해 지시된 CD8+ T 세포 중 적어도 50%를 가짐을 특징으로 한다.

[0074] 일부 구현예에서, 상기 방법은 CMV 백터에 의해 유발된 CD8+ T 세포로부터 CD8+ T 세포 수용체를 동정함을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD8+ T 세포 수용체는 MHC-부류 I/이종성 항원-유래된 웨타이드 복합체를 인지한다. 일부 구현예에서, CD8+ T 세포 수용체는 DNA 또는 RNA 서열분석에 의해 동정된다.

[0075] 또한 본원에 기재된 것은 MHC-E-웨타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포를 생성하는 방법이다. 상기 방법은 MHC-E/웨타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포 세트를 생성하기 위한 유효량으로 CMV 백터를 제1 대상체(또는 동물)에게 투여함을 포함한다. 상기 CMV 백터는 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하고 활성 UL128 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오툴로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오툴로그를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CMV 백터는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함한다. 이종성 항원은 병원체 특이적 항원, 종양 항원, 조직-특이적 항원 또는 숙주 자가-항원을 포함하는 임의의 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 자가-항원은 T 세포 수용체 또는 B 세포 수용체의 가변 영역으로부터 유래된 항원이다. 상기 방법은 CD8+ T 세포의 세트로부터 제1 CD8+ T 세포 수용체를 동정함을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제1 CD8+ T 세포 수용체는 MHC-E/이종성 항원-유래된 웨타이드 복합체를 인지한다. 일부 구현예에서, 제1 CD8+ T 세포 수용체는 DNA 또는 RNA 서열분석에 의해 동정된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 CD8+ T 세포를 발현 백터로 형질감염시켜 MHC-E/이종성 항원-유래된 웨타이드 복합체를 인지하는 하나 이상의 형질감염된 CD8+ T 세포를 생성시킴을 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 상기 발현 백터는 제2 CD8+ T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 T 세포 수용체를 암호화하는 상기 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하고, 여기서, 제2 CD8+ T 세포 수용체는 제1 CD8+ T 세포 수용체의 CDR3 α 및 CDR3 β 를 포함한다. 발현 백터로 형질감염시키기 위한 하나 이상의 CD8+ T 세포는 제1 대상체 또는 제2 대상체로부터 단리될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 형질감염된 T 세포를, 암, 병원성 감염 또는 자가면역 질환 또는 장애와 같은 질환을 치료하기 위해 제1 또는 제2 대상체에 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 형질감염된 T 세포를, 조직-특이적 항원 또는 숙주 자가-항원에 대해 자동면역 반응을 유도하기 위해 제1 또는 제2 대상체에 투여함을 추가로 포함할 수 있다.

[0076] 또한 기재된 것은 하기의 단계를 포함하는 공정에 의해 제조된 MHC-E-웨타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 CD8 $^+$ T 세포이다: (1) MHC-E/웨타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포 세트를 생성하는 유효량으로 CMV 백터를 제1 대상체에게 투여하는 단계, (2) CD8+ T 세포 세트로부터 제1 CD8+ T 세포 수용체를 동정하는 단계로서, 상기 제1 CD8+ T 세포 수용체가 MHC-E/이종성 항원-유래된 복합체를 인지하는, 단계; (3) 제1 대상체 또는 제2 대상체로부터 하나 이상의 CD8+ T 세포를 단리하는 단계; 및 (4) 제1 또는 제2 대상체로부터 단리된 하나 이상의 CD8+ T 세포를 발현 백터로 형질감염시켜 MHC-E-웨타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 T 세포를 생성하는 단계. 상기 CMV 백터는 적어도 하나의 이종성 항원을 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하고 활성 UL128 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL130 단백질 또는 이의 오툴로그; 활성 UL146 단백질 또는 이의 오툴로그; 또는 활성 UL147 단백질 또는 이의 오툴로그를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, CMV 백터는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함한다. 상기 발현 백터는 제2 CD8+ T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 제2 CD8+ T 세포 수용체를 암호화하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하고, 여기서, 상기 제2 CD8+ T 세포 수용체는 제1 CD8+ T 세포 수용체의 CDR3 α 및 CDR3 β 를 포함한다. 이종성 항원은 병원체 특이적 항원, 조직-특이적 항원 또는 숙주 자가-항원 또는 종양 항원을 포함하는 임의의 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 CD8+ T 세포 수용체는 DNA 또는 RNA 서열분석에 의해 동정된다. 또한 본원에 기재된 것은 암, 병원성 감염 또는 자가면역 질환 또는 장애와 같은 질환을 치료하는 방법이고, 상기 방법은 MHC-E-웨타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 T 세포를 상기 제1 또는 제2 대상체에게 투여함을 포함한다. 또한 본원에 기재된 것은 숙주 자가-항원 또는 조직-특이적 항원에 대한 면역반응을 유도하는 방법이고, 상기 방법은 MHC-E-웨타이드 복합체를 인지하는 형질감염된 T 세포를 상기

제1 또는 제2 대상체에게 투여함을 포함한다.

[0077] 추가의 예에서, 상기 방법은 유효량의 제2 CMV 백터를 대상체에 투여함을 포함하고 상기 제2 CMV 백터는 제2 이종성 항원을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 상기 제2 백터는 임의의 CMV 백터일 수 있고, 이는 활성 UL128 또는 UL130 단백질 및/또는 활성 UL146 또는 147 단백질을 갖는 CMV 백터를 포함한다. 제2 CMV 백터는 제2 이종성 항원을 포함할 수 있다. 제2 이종성 항원은 임의의 이종성 항원일 수 있고 이는 제1 CMV 백터 내 이종성 항원과 동일한 이종성 항원을 포함한다. 제2 CMV 백터는 제1 CMV 백터의 투여 전, 이와 동시에 또는 투여 후를 포함하는 제1 CMV 백터의 투여에 상대적인 임의의 시점에 투여될 수 있다. 이것은 제1 백터 전 후 임의의 수개월, 수일, 수시간, 수분 또는 수초에 제2 백터의 투여를 포함한다.

[0078] 발현 백터로서 사용되는 경우 인간 또는 동물 CMV 백터는 인간과 같은 선택된 대상체에서 선천적으로 비-병원성이다. 일부 구현예에서, CMV 백터는 선택된 대상체에서 이들이 비병원성(숙주에서 숙주로 확장할 수 없는)이 되도록 변형되었다.

[0079] 이종성 항원은 CMV로부터 유래하지 않는 임의의 단백질 또는 이의 단편일 수 있고, 이는 암 항원, 병원체 특이적 항원, 모델 항원(예를 들어, 리소자임 KLH, 또는 난알부민), 조직-특이적 항원, 숙주 자가-항원 또는 임의의 다른 항원을 포함한다.

[0080] 병원체 특이적 항원은 임의의 인간 또는 동물 병원체로부터 유래할 수 있다. 병원체는 바이러스 병원체, 세균 병원체 또는 기생충일 수 있고 상기 항원은 바이러스 병원체, 세균 병원체 또는 기생충으로부터 유래된 단백질일 수 있다. 기생충은 유기체일 수 있거나 질환을 유발하는 유기체일 수 있다. 예를 들어, 기생충은 원생동물 유기체, 질환 유발 원생동물 유기체, 유충 유기체 또는 벌레, 질환 유발 유충 유기체, 외부기생충 또는 질환 유발 외부 기생충일 수 있다.

[0081] 항원은 암으로부터 유래된 단백질일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 암은 백혈병 또는 림프종이다. 특정 구현예에서, 상기 암은 고형 종양으로부터 유래한다. 특정 구현예에서, 암은 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 급성 림프모구 백혈병, 만성 림프모구 백혈병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 악성 흑색종, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 결장암, 신장 세포 암종, 및 생식 세포 종양을 포함한다.

[0082] 항원은 숙주 자가-항원일 수 있다. 숙주 자가-항원은 T 세포 수용체의 가변 영역으로부터 또는 B 세포 수용체의 가변 영역으로부터 유래된 항원을 포함하지만 이제 제한되지 않는다. 항원은 조직-특이적 항원일 수 있다. 조직-특이적 항원은 정자 항원 또는 에그(egg) 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0083] 본원에 기재된 CMV 백터는 재조합 CMV 바이러스 또는 백터, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 면역원성, 면역학적 또는 백신 조성물로서 사용될 수 있다. 재조합 CMV 바이러스 또는 백터(또는 이의 발현 생성물)을 포함하는 면역학적 조성물은 국소 또는 전신 면역학적 반응을 유발한다. 상기 반응은 보호성일 수 있지만 보호성일 필요는 없다. 재조합 CMV 바이러스 또는 백터(또는 이의 발현 생성물)를 함유하는 면역원성 조성물은 또한 보호성일 수 있지만 보호성일 필요가 없는 국소 또는 전신 면역학적 반응을 유발한다. 백신 조성물은 국소 또는 전신 보호성 반응을 유발한다. 따라서, 용어 "면역학적 조성물" 및 "면역원성 조성물"은 "백신 조성물"을 포함한다(상기 2개의 전자 용어들은 보호성 조성물일 수 있다).

[0084] 본원에 기재된 CMV 백터는 재조합 CMV 바이러스 또는 백터, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 면역원성, 면역학적 또는 백신 조성물을 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체에서 면역학적 반응을 유도하는 방법에 사용될 수 있다. 상기 특정 사항의 목적을 위해, 용어 "대상체"는 모든 동물을 포함하고, 이는 비-인간 영장류 및 인간을 포함하고, "동물"은 인간을 제외한 모든 척추동물 종을 포함하고; "척추동물"은 동물("동물"이 본원에 사용됨) 및 인간을 포함한다. 그리고 물론, "동물"의 서브세트는 상기 특정 사항의 목적을 위해 인간을 제외한 모든 포유동물을 포함하는 "포유동물"이다.

[0085] 본원에 기재된 CMV 백터는 재조합 CMV 바이러스 또는 백터, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 치료학적 조성물에 사용될 수 있다. 본원에 기재된 CMV 백터는 이종성 항원을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA를 CMV 계놈의 필수 또는 비-필수 항원으로 삽입함에 의해 제조될 수 있다. 상기 방법은 추가로 CMV 계놈으로부터 하나 이상의 영역을 결실시킴을 포함할 수 있다. 상기 방법은 생체내 재조합을 포함할 수 있다. 따라서, 상기 방법은 CMV 계놈의 일부와 상동성인 DNA 서열에 의해 플랜킹된 이종성 DNA를 포함하는 공여자 DNA의 존재하에 세포-상용성 배지에서 CMV DNA로 세포를 형질감염시켜 상기 이종성 DNA가 CMV의 계놈으로 도입되도록 하고 이어서 임의로 생체내 재조합에 의해 변형된 CMV를 회수함을 포함할 수 있다. 상기 방법은 또한 CMV DNA

를 절단하여 절단된 CMV DNA를 수득하고, 이종성 DNA를 상기 절단된 CMV DNA에 연결하여 하이브리드 CMV-이종성 DNA를 수득하고, 세포를 하이브리드 CMV-이종성 DNA로 형질감염시킴에 이어서 임의로 이종성 DNA의 존재에 의해 변형된 CMV를 회수함을 포함할 수 있다. 생체내 재조합이 이해되고 있기 때문에, 상기 방법은 따라서 또한, CMV 외래의 폴리펩타이드를 암호화하는 CMV에 천연적으로 존재하지 않는 공여자 DNA를 포함하는 플라스미드를 제공하고, 상기 공여자 DNA는 CMV 게놈의 필수 또는 비-필수 영역과 동시 선형이어서 CMV의 필수 또는 비필수 영역으로부터의 DNA가 공여자 DNA를 플랭킹하도록 CMV DNA 분절 내에 있다. 이종성 DNA는 CMV로 삽입하여 상기 DNA의 안정한 통합, 및 경우에 따라 이의 발현을 생성시키는 임의의 배향으로 재조합 CMV를 생성시킬 수 있다.

[0086] 재조합 CMV 벡터 내 이종성 항원을 암호화하는 DNA는 또한 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 내인성 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 예를 들어, 인간 CMV (HCMV), 레서스 마카쿠 CMV (RhCMV), 뮤린, 또는 다른 CMV 프로모터를 포함하는, 헤르페스 바이러스와 같은 임의의 공급원으로부터 기원할 수 있다. 상기 프로모터는 또한 EF1 α 프로모터와 같은 비-바이러스 프로모터일 수 있다. 상기 프로모터는 절단된 전사 활성 프로모터일 수 있고 이는 바이러스에 의해 제공되는 트랜스활성화 단백질로 트랜스활성화된 영역 및 잘단된 전사 활성 프로모터가 유래하는 전장 프로모터의 최소 프로모터 영역을 포함한다. 상기 프로모터는 최소 프로모터 및 업스트림 조절 서열에 상응하는 DNA 서열의 연합으로 구성될 수 있다. 최소 프로모터는 CAP 부위 + TATA 박스 (전사의 기본 수준을 위한 최소 소열; 전사의 비조절된 수준)로 구성되고; "업스트림 조절 서열"은 업스트림 요소(들) 및 인핸서 서열(들)로 구성된다. 추가로, 용어 "절단된"은 전장 프로모터가 완전하게 존재하지 않고, 즉, 전장 프로모터의 일부가 제거된 것을 지적한다. 그리고, 절단된 프로모터는 MCMV 또는 HCMV와 같은 헤르페스 바이러스로부터 유래할 수 있고, 예를 들어, HCMVIE 또는 MCMVIE이다. 염기쌍을 기준으로 전장 프로모터로부터 크기가 40%까지 및 심지어 90%까지 감소한 것일 수 있다. 상기 프로모터는 또한 변형된 비-바이러스 프로모터일 수 있다. HCMV 프로모터에 관하여, 미국 특허 제5,168,062호 및 제5,385,839호를 참조한다. 세포를 이로부터의 발현을 위한 플라스미드 DNA로 형질감염시키는 것에 관하여, 문헌(Felgner *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561)을 참조한다. 그리고, 다양한 감염성 질환에 대한 백신접종의 단순하고 효과적인 방법으로서 플라스미드 DNA의 직접적인 주사에 관하여, 문헌(Science, 259:1745-49, 1993)을 참조한다. 따라서 벡터가 벡터 DNA의 직접적인 주사에 의해 사용될 수 있다는 것은 본원의 개시내용의 범위내에 있다.

[0087] 또한, 절단된 전사 활성 프로모터를 포함하는 재조합 바이러스 또는 플라스미드에 삽입될 수 있는 발현 카세트가 기재되어 있다. 발현 카세트는 추가로 기능성 절단된 폴리아데닐화 신호, 예를 들어, 절단되었지만 아직 기능성인 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 자연이 보다 큰 신호를 제공함을 고려할 때, 절단된 폴리아데닐화 신호가 기능한다는 것은 실제로 놀라운 일이다. 절단된 폴리아데닐화 신호는 CMV와 같은 재조합 바이러스의 삽입 크기 제한 문제를 해결한다. 발현 카세트는 또한 이것이 삽입되는 바이러스 또는 시스템과 관련하여 이종성 DNA를 포함할 수 있고 상기 DNA는 본원에 기재된 바와 같이 이종성 DNA일 수 있다.

[0088] 백신 또는 면역학적 조성물에 사용하기 위한 항원에 관하여 또한 문헌 (*Stedman's Medical Dictionary* (24th edition, 1982, *e.g.*, definition of vaccine (for a list of antigens used in vaccine formulations))을 참조하고; 상기 항원 또는 상기 항원으로부터의 목적하는 에피토프가 사용될 수 있다. 이종성 항원에 관하여, 당업자는 과도한 실험 없이, 특정 아미노산의 특성 (예를 들어, 크기, 하전 등) 및 코돈 딕셔너리로부터 뿐만 아니라 웨პ타이드 또는 폴리웨პ타이드의 아미노산 및 상응하는 DNA 서열에 대한 지식으로부터 이종성 항원 및 이에 대한 암호화 DNA를 선택할 수 있다.

[0089] 항원의 T 에피토프를 결정하는 한가지 방법은 에피토프 맵핑을 포함한다. 이종성 항원의 중첩 웨პ타이드는 올리고-웨პ타이드 합성에 의해 생성한다. 개별 웨პ타이드는 본래의 단백질에 의해 유발된 항체에 결합하거나 T 세포 또는 B 세포 활성화를 유도하는 능력에 대해 시험된다. 상기 방법은 특히 상기 T 세포가 MHC 분자와 복합체화된 짧은 선형 웨პ타이드를 인지하기 때문에 T-세포 에피토프를 맵핑하는데 유용하였다.

[0090] 이종성 항원에 대한 면역 반응은 일반적으로 다음과 같이 생성된다: T 세포는 단백질이 보다 작은 웨პ타이드로 절단되고, 또 다른 세포의 표면 상에 위치되는 "주요 조직적합성 복합체 (MHC)"로 불리우는 복합체로 제공되는 경우에만 단백질을 인지한다. MHC 복합체--부류 I 및 부류 II의 2개 부류가 있고, 각각의 부류는 많은 상이한 대립유전자들로 구성된다. 상이한 종 및 개별 대상체는 상이한 유형의 MHC 복합체 대립유전자를 갖고; 이들은 상이한 MHC 유형을 갖는 것으로 일컬어진다. MHC 부류 I 분자의 한가지 유형은 MHC-E로 불리운다(인간에서 HLA-E, RM에서 Mamu-E, 마우스에서 Qa-1b).

[0091] 이종성 항원을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA는 그 자체가 CMV 벡터에서 발현을 구동하기 위한 프로모터를 포함할 수 있고 DNA는 이종성 항원의 암호화 DNA로 제한될 수 있는 것으로 주지된다. 상기 작제물은 이것이 프로

모터에 작동적으로 연결되고 이에 의해 발현되도록, 내인성 CMV 프로모터에 상대적인 배향으로 위치할 수 있다. 추가로, 이종성 항원을 암호화하는 DNA의 다중 카피물 또는 강하거나 어얼리 프로모터 또는 어얼리 및 레이트 프로모터, 또는 이의 조합의 사용은 발현을 증폭시키거나 증가시키기 위해 수행될 수 있다. 따라서, 이종성 항원을 암호화하는 DNA는 CMV-내인성 프로모터와 관련하여 적합하게 위치할 수 있거나 상기 프로모터는 상기 이종성 항원을 암호화하는 DNA와 함께 또 다른 위치에 삽입되도록 전위될 수 있다. 하나 초과의 이종성 항원을 암호화하는 핵산은 CMV 벡터에 팩키징될 수 있다.

[0092] 추가로, 기재된 CMV 벡터를 함유하는 약제학적 조성물 및 기타 조성물이 기재된다. 상기 약제학적 조성물 및 기타 조성물은 당업계에 공지된 투여 절차에 사용되도록 제형화될 수 있다. 상기 약제학적 조성물은 비경구 경로(피내, 근육내, 피하, 정맥내 또는 기타)를 통해 투여될 수 있다. 상기 투여는 또한 점막 경로, 예를 들어, 경구, 비강, 생식기를 통한 것일 수 있다.

[0093] 상기된 약제학적 조성물은 약제학적 분야의 기술자에게 널리 공지된 표준 기술에 따라 제조될 수 있다. 상기 조성물은 특정 환자의 품종 또는 종, 나이, 성별, 체중 및 병태, 및 투여 경로를 고려하여 의학 분야의 기술자에게 널리 공지된 용량 및 기술에 의해 투여될 수 있다. 조성물은 단독으로 투여될 수 있거나 다른 CMV 벡터 또는 다른 면역학적, 항원성 또는 백신 또는 치료학적 조성물과 동시에 또는 연속으로 투여될 수 있다. 상기 다른 조성물은 정제된 고유 항원 또는 에피토프 또는 재조합 CMV 또는 또 다른 벡터 시스템에 의한 발현으로부터의 항원 또는 에피토프를 포함할 수 있고; 상기 언급된 인자들을 고려하여 투여된다.

[0094] 조성물의 예는 오리피스 (orifice), 예를 들어, 경구, 비강, 항문, 생식기, 예를 들어, 질 등을 위한 액체 제제, 혼탁제, 시럽 또는 엘리시르와 같은, 투여를 위한 액체 제제; 및 멸균 혼탁제 또는 에멀젼과 같은 비경구, 피하, 피내, 근육내 또는 정맥내 투여 (예를 들어, 주사가능한 투여)를 위한 제제를 포함한다. 상기 조성물에서, 재조합체는 멸균수, 생리학적 식염수, 글루코스 등과 같은 적합한 담체, 희석제 또는 부형제와 혼합될 수 있다.

[0095] 항원성, 면역학적 또는 백신 조성물은 전형적으로 보조제, 및 목적하는 반응을 유발하기 위한 양의 CMV 벡터 또는 발현 생성물을 함유할 수 있다. 인간 적용에서, 알루(인산알루미늄 또는 수산화알루미늄)은 전형적인 보조제이다. 사포닌 및 이의 정제된 성분 Quil A, 프伦트(Freund's) 완전 보조제 및 연구 및 수의과 적용에 사용되는 다른 보조제는 인간 백신에서 이들의 잠재적 용도를 제한하는 독성을 갖는다. 화학적으로 규정된 제제, 예를 들어, 무라밀 디펩타이드, 모노포스포릴 지질 A, 문헌(Goodman-Snitkoff *et al.*, *J. Immunol.* 147:410-415 (1991))에 기재된 것들과 같은 인지질 접합체, 문헌(Miller *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1739-1744 (1992))에 기재된 프로테오리포좀 내에 단백질의 캡슐화, 및 노바좀 지질 소포와 같은 지질 소포 내 단백질 캡슐화(문헌참조: Micro Vescular Systems, Inc., Nashua, N.H.)가 또한 사용될 수 있다.

[0096] 조성물은 비경구 (예를 들어, 근육내, 피내 또는 피하) 투여 또는 오리피스 투여, 예를 들어, 설하 (예를 들어, 경구), 위내, 구강내, 비강내, 질내를 포함하는 점막 및 유사 투여에 의한 면역화를 위한 단일 투여 형태로 팩키징될 수 있다. 그리고 다시, 유효량 및 투여 경로는 조성물의 특성에 의해, 발현 생성물의 특성에 의해, 재조합 CMV가 직접적으로 사용되는 경우의 발현 수준에 의해, 및 LD₅₀ 및 공지되어 있고 과도한 실험을 요구하지 않는 다른 스크리닝 과정 뿐만 아니라 숙주의 품종 또는 종, 나이, 성별, 체중, 병태 및 특성과 같은 공지된 인자에 의해 결정된다. 발현된 생성물의 용량은 몇 마이크로그램 내지 수백 마이크로그램, 예를 들어, 5 내지 500 μg 범위일 수 있다. CMV 벡터는 이들 용량 수준에서 발현을 성취하기 위해 임의의 적합한 양으로 투여될 수 있다. 비제한적인 예에서: CMV 벡터는 적어도 10² pfu의 양으로 투여될 수 있고; 따라서, CMV 벡터는 적어도 상기 양으로 또는 약 10² pfu 내지 약 10⁷ pfu의 범위로 투여될 수 있다. 다른 적합한 담체 또는 희석제는 보존제의 존재 또는 부재하에 물 또는 완충 식염수일 수 있다. CMV 벡터는 투여 시에 재현탁을 위해 동결건조될 수 있거나 용액 중에 있을 수 있다. "약"은 한정된 값의 1%, 5%, 10% 또는 20% 이내를 의미할 수 있다.

[0097] 본원의 개시내용의 단백질 및 이들을 암호화하는 핵산은 본원에서 설명되고 기재된 정확한 서열과 상이할 수 있는 것으로 이해되어야만 한다. 따라서, 상기 개시내용은 서열이 개시내용의 방법에 따라 기능하는 한, 보여지는 서열에 대한 결실, 부가, 절단 및 치환을 고려한다. 이와 관련하여, 치환은 일반적으로 천연적으로 보존성이고, 즉, 아미노산 패밀리 내에서 일어나는 치환이다. 예를 들어, 아미노산은 일반적으로 4개의 패밀리로 나누어진다: (1) 산성--아스파르테이트 및 글루타메이트; (2) 염기성--라이신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성--알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비하전된 극성--글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린 트레오닌, 및 타이로신. 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신은 때로는 방향

족 아미노산으로서 분류된다. 류신의 이소류신 또는 발린으로의 단리된 대체 또는 그 반대로; 아스파르테이트의 글루타메이트로의 대체 또는 그 반대로; 트레오닌의 세린으로의 대체 또는 그 반대로; 또는 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산으로의 유사 보존적 대체가 생물학적 활성에 대해 주요 효과를 갖지 않을 것이라는 것은 합리적으로 예측 가능하다. 기재된 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖지만 단백질의 면역원성에 실질적으로 영향을 주지 않는 소수의 아미노산 치환을 소유한 단백질은 따라서 개시내용의 범위내에 있다.

[0098] 본원의 개시내용의 뉴클레오타이드 서열은 최적화된 코돈일 수 있고, 예를 들어, 상기 코돈은 인간 세포에 사용하기 위해 최적화될 수 있다. 예를 들어, 임의의 바이러스 또는 세균 서열은 그렇게 변형될 수 있다. HIV 및 다른 웨니바이러스를 포함하는 많은 바이러스는 대다수의 희귀 코돈을 사용하고, 목적하는 대상체에서 통상적으로 사용되는 코돈에 상응하도록 코돈을 변형시킴에 의해, 이종성 항원의 증진된 발현이 문헌(참조: Andre *et al.*, *J. Virol.* 72:1497-1503, 1998)에 기재된 바와 같이 성취될 수 있다.

[0099] 본원에 포함된 CMV 백터 및 당단백질의 기능적으로 및/또는 항원적으로 동등한 변이체 및 유도체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 고려된다. 이들 기능적으로 동등한 변이체, 유도체 및 단편은 항원 활성을 보유하는 능력을 나타낸다. 예를 들어, 아미노산 잔기의 보존적 치환, 하나 또는 몇개의 아미노산 결실 또는 부가 및 아미노산 유사체에 의한 아미노산 잔기의 치환을 유도하는 것들 뿐만 아니라, 암호화된 아미노산 서열을 변화시키지 않는 DNA 서열 내 변화는 암호화된 폴리펩타이드의 성질에 상당한 영향을 주지 않는 것들이다. 보존성 아미노산 치환은 글라이신/알라닌; 발린/이소류신/류신; 아스파라긴/글루타민; 아스파르트산/글루탐산; 세린/트레오닌/메티오닌; 라이신/아르기닌; 및 페닐알라닌/타이로신/트립토판이다. 하나의 구현예에서, 변이체는 목적하는 항원, 에피토프, 면역원, 펩타이드 또는 폴리펩타이드와 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성 또는 동일성을 갖는다.

[0100] 일부 동일성 또는 상동성은 중첩을 최대화하는 서열 캡을 감소시키면서 동정하기 위해 정렬되는 경우 서열을 비교함에 의해 결정된다. 특히, 서열 동일성은 임의의 다수의 수학적 알고리듬을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 서열의 비교를 위해 사용되는 수학적 알고리듬의 비제한적인 예는 문헌(Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90: 5873-5877)에서와 같이 변형된 문헌(참조: Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 2264-2268)의 알고리듬이다.

[0101] 서열의 비교를 위해 사용되는 수학적 알고리듬의 또 다른 예는 문헌(참조: Myers & Miller, *CABIOS* 1988;4: 11-17)의 알고리듬이다. 상기 알고리듬은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 팩키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)으로 혼입된다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 사용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표, 12의 캡 길이 페널티, 및 4의 캡 페널티가 사용될 수 있다. 국소 서열 유사성 및 정렬의 영역을 동정하기 위한 또 다른 유용한 알고리듬은 문헌(참조: Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*)에 기재된 바와 같은 FASTA 알고리듬이다.

[0102] 본원의 개시내용에 따라 사용하기 위해 유리한 것은 WU-BLAST (Washington University BLAST) 버전 2.0 소프트웨어이다. 여러 UNIX 플랫폼을 위한 WU-BLAST 버전 2.0 실행가능한 프로그램은 <ftp://blast.wustl.edu/blast/executables>로부터 다운로드받을 수 있다. 상기 프로그램은 WU-BLAST 버전 1.4를 기반으로 하고, 이는 이어서 공개 도메인 NCBI-BLAST 버전 1.4 (Altschul & Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., *Methods in Enzymology* 266: 460-480; Altschul *et al.*, *Journal of Molecular Biology* 1990; 215: 403-410; Gish & States, 1993; *Nature Genetics* 3: 266-272; Karlin & Altschul, 1993; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877; 이 모두는 본원에 참조로 인용됨)을 기반으로 한다.

[0103] 개시내용의 다양한 재조합 뉴클레오타이드 서열 및 항체 및/또는 항원은 표준 재조합 DNA 및 클로닝 기술을 사용하여 제조된다. 상기 기술은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook *et al.* 1989))을 참조한다.

[0104] 본원의 개시내용의 뉴클레오타이드 서열은 "백터"로 삽입될 수 있다. 용어 "백터"는 광범위하게 사용되고 당업자에 의해 이해되고 본원에 사용된 바와 같은 용어 "백터"는 당업자에 대한 이의 의미와 일관되게 사용된다. 예를 들어, 용어 "백터"는 통상적으로 하나의 환경으로부터 또 다른 환경으로 핵산 분자의 전달을 가능하게 하거나 촉진시키거나 핵산 분자의 조작을 가능하게 하거나 촉진시키는 비히클을 언급하기 위해 당업자에게 통상적으로 사용된다.

- [0105] 본원의 개시내용의 바이러스의 발현을 가능하게 하는 임의의 벡터는 본원의 개시내용에 따라 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 기재된 바이러스는 시험관내에서 사용되고 (예를 들어, 세포 부재 발현 시스템을 사용하여)/되거나 시험관내 성장한 배양 세포에서 사용되어 암호화된 이종성 항원 (예를 들어, 병원체-특이적 항원, HIV 항원, 종양 항원 및 항체)을 생성할 수 있고, 상기 항원은 이어서 단백질성 백신의 제조에서와 같이 다양한 적용을 위해 사용될 수 있다. 상기 적용을 위해, 시험관내 및/또는 배양된 세포에서 바이러스의 발현을 가능하게 하는 임의의 벡터가 사용될 수 있다.
- [0106] 발현될 기재된 이종성 항원에 대해, 이종성 항원의 단백질 암호화 서열은 단백질의 전사 및 해독을 지시하는 조절 또는 핵산 제어 서열에 "작동적으로 연결된" 것이어야 한다. 본원에 사용된 바와 같은 암호화 서열 및 핵산 제어 서열 또는 프로모터는 이들이 암호화 서열의 발현 또는 전사 및/또는 해독이 핵산 제어 서열의 영향 또는 제어하에 있도록 하는 방식으로 공유적으로 연결되는 경우 "작동적으로 연결된" 것으로 일컬어진다. "핵산 제어 서열"은 임의의 핵산 요소일 수 있지만 예를 들어, 이에 제한되지 않지만 프로모터, 인핸서, IRES, 인트론, 및 여기에 작동적으로 연결된 핵산 서열 또는 암호화 서열의 발현을 지시하는 본원에 기재된 다른 요소일 수 있다. 용어 "프로모터"는 본원에서 RNA 폴리미라제 II에 대한 개시 부위 주위에 클러스터링되어 있고 개시내용의 단백질 암호화 서열에 작동적으로 연결되는 경우 암호화된 단백질의 발현을 유도하는 전사 제어 분자 그룹을 언급하기 위해 사용된다. 본원의 개시내용의 전이유전자의 발현은 항상성 프로모터, 또는 제한 없이 테트라사이클린과 같은 항생제, 엑디손과 같은 호르몬 또는 중금속과 같이 일부 특정 외부 자극에 노출된 경우에만 전사를 개시하는 유도성프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 프로모터는 또한 특정 세포 유형, 조직 또는 기관에 특이적일 수 있다. 많은 적합한 프로모터 및 인핸서는 당업계에 공지되어 있고, 임의의 적합한 프로모터 또는 인핸서는 개시내용의 전이유전자의 발현을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 프로모터 및/또는 인핸서는 전핵 세포 프로모터 데이터베이스 (EPDB)로부터 선택될 수 있다.
- [0107] 개시내용은 이종성 단백질 항원을 발현하는 재조합 바이러스 벡터에 관한 것이다. 일부 예에서, 항원은 HIV 항원이다. 유리하게, HIV 항원은 미국 공개 번호 2008/0199493 A1 및 2013/0136768 A1 (이 둘 다는 본원에 참조로 인용됨)에서 논의된 HIV 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. HIV, 핵산 또는 이의 면역원성 단편은 HIV 단백질 항원으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 번호 2008/0199493 A1 및 2013/0136768 A1에서 논의된 HIV 뉴클레오타이드가 사용될 수 있다. HIV 항체에 의해 인지되는 임의의 항원은 HIV 단백질 항원으로서 사용될 수 있다. 단백질 항원은 또한 SIV 항원일 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 번호 2008/0199493 A1 및 2013/0136768 A1에서 논의된 SIV 항원이 사용될 수 있다.
- [0108] 본원의 개시내용에 따라 사용된 벡터는 본원의 개시내용의 항원이 발현될 수 있도록 프로모터 또는 인핸서와 같은 적합한 유전자 조절 영역을 함유할 수 있다.
- [0109] 대상체에서 생체내 개시내용의 항원을 발현하기 위해, 예를 들어, HIV-1 항원에 대한 면역 반응 및/또는 HIV-1에 대한 보호 면역력을 생성하기 위해, 상기 대상체 상에서의 발현을 위해 적합하고 생체내 사용하기 위해 안전한 발현 벡터가 선택되어야만 한다. 일부 예에서, 예를 들어, 개시내용의 HIV-1 면역원성 조성물 및 백신의 임상전 시험을 위해, 실험 동물에서 항체 및/또는 항원을 발현하는 것이 요구될 수 있다. 다른 실시예에서, 인간 대상체에서, 예를 들어, 임상 시험에서 및 개시내용의 면역원성 조성물 및 백신의 실제 임상 사용을 위해 항원을 발현시킬 수 있다.
- [0110] 본원에 기재된 CMV 벡터는 숙주에서 숙주로의 확장을 방지하여 바이러스가 면역손상된 대상체 또는 CMV 감염의 결과로서 합병증에 직면할 수 있는 다른 대상체에 겹염될 수 없도록 하는 돌연변이를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 CMV 벡터는 또한 비-캐노니컬 MHC 제한 뿐만 아니라 면역우성 및 비면역우성 에피토프의 제공을 유도하는 돌연변이를 함유할 수 있다. 그러나, 본원에 기재된 CMV 벡터 내 돌연변이는 벡터가 CMV로 이전에 감염된 적 있는 대상체를 재감염시키는 능력에 영향을 주지 않는다. 상기 CMV 돌연변이는 예를 들어, 미국 특허 공개 2013-0136768; 2010-0142823; 2014-0141038; 및 PCT 출원 공개 WO 2014/138209에 기재되어 있고, 이 모두는 본원에 참조로 인용된다.
- [0111] 기재된 CMV 벡터는 생체내에서 투여될 수 있고, 예를 들어, 여기서, 상기 목적은 높은 퍼센트의 CD8+ T 세포 반응이 MHC-E (또는 이의 동족체 또는 오툴로그)에 의해 제한된 것을 특징으로 하는 면역 반응을 포함하는, CD8+ 면역 반응을 포함하는 면역원성 반응을 생성시키는 것이다. 예를 들어, 일부 예에서, RhCMV를 사용한 면역원성 조성물 및 백신의 임상전 시험을 위한 레서스 마카쿠에스와 같은 연구 동물에서 기재된 CMV 벡터를 사용하는 것이 요구될 수 있다. 다른 예에서, 인간 대상체에서, 예를 들어, 임상 시험에서 및 HCMV를 사용한 면역원성 조성물의 실제 임상 사용을 위한 기재된 CMV 벡터를 사용하는 것이 요구될 수 있다.

[0112] 상기 생체내 적용을 위해, 기재된 CMV 벡터는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물의 성분으로서 투여된다. 개시내용의 면역원성 조성물은 병원체-특이적 항원을 포함하는 이종성 항원에 대한 면역 반응을 자극하기 위해 유용하고 AIDS의 예방, 개선 또는 치료를 위해 HIV-1에 대한 예방학적 또는 치료학적 백신의 하나 이상의 성분으로서 사용될 수 있다. 개시내용의 핵산 및 벡터는 특히 유전학적 백신, 즉, 개시내용의 항원을 암호화하는 핵산을 대상체, 예를 들어, 인간에게 항원이 면역 반응을 유발하도록 상기 대상체에서 발현되도록 전달하기 위한 백신을 제공하기 위해 유용하다.

[0113] 면역화 스케줄 (또는 용법)은 동물 (인간을 포함하는)에 대해 널리 공지되어 있고 특정 대상체 및 면역원성 조성물에 대해 용이하게 결정될 수 있다. 따라서, 면역원은 대상체에게 하나 이상의 회수로 투여될 수 있다. 바람직하게, 면역원성 조성물의 별도의 투여 사이에 시간 간격 세트가 있다. 상기 간격은 모든 대상체에 대해 다양하고, 전형적으로 10일 내지 수주 범위이고 흔히 2, 4, 6 또는 8주이다. 인간에 대해, 상기 간격은 전형적으로 2 내지 6주이다. 본원의 개시내용의 특히 유리한 구현예에서, 상기 간격은 보다 길고, 유리하게 약 10주, 12주, 14주, 16주, 18주, 20주, 22주, 24주, 26주, 28주, 30주, 32주, 34주, 36주, 38주, 40주, 42주, 44주, 46주, 48주, 50주, 52주, 54주, 56주, 58주, 60주, 62주, 64주, 66주, 68주 또는 70주이다. 면역화 용법은 전형적으로 면역원성 조성물의 1 내지 6회 투여를 갖지만 1회 또는 2회 또는 4회 정도로 적은 투여를 가질 수 있다. 면역 반응을 유도하는 방법은 또한 면역원과 함께 보조제의 투여를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 연간, 연 2회 또는 보다 긴 간격 (5 내지 10년) 부스터 면역화는 초기 면역화 프로토콜을 보충할 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 다양한 프라임-부스트 용법을 포함한다. 이들 방법에서, 하나 이상의 프라이밍 면역화에 이어서 하나 이상의 부스팅 면역화이다. 실제 면역원성 조성물은 각각의 면역화를 위해 동일하거나 상이할 수 있고 면역원성 조성물 (예를 들어, 단백질 또는 발현 벡터를 함유하는)의 유형, 경로 및 면역원의 제형이 또한 다양할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터가 프라이밍 및 부스팅 단계를 위해 사용되는 경우, 이것은 동일하거나 상이한 유형 (예를 들어, DNA 또는 세균 또는 바이러스 발현 벡터)일 수 있다. 하나의 유용한 프라임-부스트 용법은 4주 격리된 2개의 프라이밍 면역화에 이어서 마지막 프라이밍 면역화 후 4 및 8주째에 2개의 부스팅 면역화를 제공한다. 또한, 프라이밍 및 부스팅 용법을 제공하기 위해 개시내용의 DNA, 세균 및 바이러스 발현 벡터를 사용하여, 포함된 여러 순열 및 조합이 있음은 용이하게 당업자에게 자명해야만 한다. CMV 벡터는 상이한 병원체로부터 유래된 상이한 항원을 발현하면서 반복적으로 사용될 수 있다.

[0114] 실시예

[0115] 하기의 실시예는 단지 설명을 위한 것이다. 개시내용의 측면에서, 당업자는 이들 실시예 및 기재된 개시내용의 다른 실시예의 변형이 과도한 실험 없이 가능함을 인지한다.

[0116] 실시예 1

[0117] MHC-E 반응은 SIV에 대한 보호를 위해 중요하다.

[0118] 균주 68-1 RhCMV/SIV 벡터는 고도의 독성 SIV에 대해 이제까지 관찰된 최상의 보호를 제공한다(문헌참조: Hansen, S.G. *et al.* Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473, 523-7, (2011); Hansen, S.G. *et al.* Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* 502, 100-4, (2013); Hansen, S.G. *et al.* Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nature medicine* 15, 293-9, (2009) (hereafter "Hansen 2009"). 특히, 균주 68.1은 MHC-E 및 MHC-II 제한된 CD8⁺ T 세포를 유발하지만 (Hansen, S.G. *et al.* Cytomegalovirus vectors violate CD8⁺ T cell epitope recognition paradigms. *Science* 340, 1237874 (2013) (이후 "Hansen Science 2013"); Hansen, S.G. *et al.* Broadly targeted CD8(+) T cell responses restricted by major histocompatibility complex E. *Science* 351, 714-20 (2016) (이후 "Hansen 2016")); 보호를 매개하는데 있어서 상기 "비통상적인" T 세포 반응의 중요성은 이전에 결정되지 않았다.

[0119] RhCMV 68-1은 HCMV UL128 및 UL130의 동족체가 없고, UL128 및 UL130의 RhCMV 68-1 (균주 68-1.2 RhCMV/gag (UL128/UL130 복구된))로의 재-삽입은 MHC-E 및 MHC-II로부터 MHC-Ia로의 완전한 스위치를 유도한다(도 1) (또한, Hansen Science 2013을 참조한다). 추가로, 균주 68-1.2 (균주 68-1.2 RhCMV/gag (UL130 복구된) 및 균주 68-1.2 RhCMV/gag (UL128 복구된))로부터 UL128 또는 UL130의 결실은 혼합된 표면형을 유도한다: MHC-I 및 MHC-II, 그러나 MHC-II 슈퍼토프-특이적 또는 MHC-E-제한된 CD8⁺ T 세포가 아닌(도 1) (또한 WO/2014/138209를 참조한다).

- [0120] MHC-E-제한된 CD8+ T 세포를 유발하는 능력이 없는 벡터가 또한 고도의 독성 SIV에 대해 레서스 마카쿠에스 (RM)를 보호할 수 있는지를 결정하기 위해, RM은 3개의 벡터 중 하나로 백신 접종하였다: RhCMV 68-1 (UL128 및 UL130에 대해 결실된); 68-1.2 (UL128 및 UL130에 대해 온전한); 및 UL128에 대해 결실된 68-1.2(UL130에 대해 온전한). 각각의 벡터는 SIV 항원 SIVgag, SIVrev-tat-nef- 및 SIVpol을 발현하였다. 문헌(Hansen 2009)에 기재된 방법을 사용하여, RhCMV/SIV 벡터는 $t = 0$ 및 $t = 18$ 주에 2회 피하 투여하고 (벡터 당 5×10^6 PFU), 반복적인 제한 용량, 직장 내 SIVmac239 챌린지는 91주에 개시하였다. 모든 RM은 SIV 감염 "수용"이 SIV Vif-특이적 T 세포 반응의 드 노보 발생에 의해 확인될 때까지 저용량의 SIVmac239로 반복적으로 챌린지하고 결과는 단지 한정적으로 SIV-감염된 동물에 대해서만 결정되었다. SIV Vif는 백신에 포함되지 않음에 따라 이를 반응은 SIV 감염으로부터 유래한다. 15마리의 68-1 RhCMV/SIV-백신접종된 RM 중 8마리는 (전형적인) 염증 SIV 대조군을 보여주었고, 모든 68-1.2 및 UL128-결실된 68-1.2 RhCMV/SIV-백신접종된 RM은 백신접종되지 않은 대조군과 유사하게 챌린지 후 명백한 진행성 감염을 보여준다(도 2). 동일한 결과는 질내 경로를 통해 SIVmac239로 챌린지된 암컷 RM에서 68-1 대 68-1.2 RhCMV/SIV 백신접종을 비교하는 독립적 실험에서 관찰되었다. SIV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응의 크기 및 기능성 표현형은 3개의 백신 그룹에서 비교될 수 있고, 벡터 면역원성에서 유일하게 현저한 차이는 SIV-특이적 CD8+ T 세포에 의해 표적화된 에피토프의 특성이다. 구체적으로, 68-1은 MHC-E- 또는 MHC-II-제한된다고; (Δ UL128) 68-1.2는 MHC-Ia- 또는 MHC-II-제한된다고(MHC-II 슈퍼토프를 제외한); 68-1.2는 단지 MHC-Ia-제한된이다. 이를 결과는 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포, 및 잠재적으로 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포가 SIV에 대한 보호를 위해 중요함을 강하게 지적한다.
- [0121] 실시예 2
- [0122] UL128 및 UL130의 동족체에 추가로 UL146 및 UL147 상동성 유전자의 결실은 시노몰구스 마카쿠에스에서 MHC-E 반응의 유도를 위해 요구된다.
- [0123] RhCMV 68-1은 다중 유전자 결실, 유전자 전도 및 단일 점 돌연변이를 함유하는 섬유아세포-적응된 바이러스이다 (문헌참조: Malouli, D. et al., Reevaluation of the Coding Potential and Proteomic Analysis of the BAC-Derived Rhesus Cytomegalovirus Strain 68-1. *J Virol* 86, 8959-73 (2012)). 추가로, 야생형 RhCMV는 MHC-II 및 MHC-E 반응을 유발하지 않는다(Hansen *Science* 2013 and Hansen 2016). RhCMV과 유사하게, 야생형 HCMV는 예외적 상황에서만 HLA-E-제한된 CD8+ T 세포를 유발한다(문헌참조: Pietra, G. et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10896-10901 (2003)). RM에서 야생형 RhCMV 및 인간에서 추정적 야생형 HCMV는 UL128 및 UL130의 존재로 인해 MHC-E 반응을 유발하지 않는 것으로 사료된다. 그러나, 이것은 68-1 내 다른 돌연변이가 MHC-E 반응을 위해 요구되는 가능성을 배제하지 않는다. 상기 가능성을 해결하기 위해, MHC-E 반응을 유발하기 위해 요구되는 유전학적 변화는 상이한 종, 시노몰구스 마카쿠에스 (엠. 파시큘라리스(*M. fascicularis*))에 대해 결정하였다.
- [0124] 비통상적인 CD8+ T 세포가 시노몰구스 마카쿠에스에서 유발될 수 있는지를 결정하기 위해, 시노몰구스 CMV (CyCMV)는 세균 인공 염색체 (BAC)로서 클로닝하였다. RhCMV Rh13.1 및 HCMV RL13의 동족체인 Cy13.1 유전자는 SIVgag로 대체하였다. 수득한 CyCMV BAC는 차세대 서열 분석에 의해 완전히 서열분석하고 모든 예상된 개방 판독 프레임의 존재를 입증하였다(도 3). UL128-130의 결실이 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포를 유발하기 위해 충분한지를 조사하기 위해, HCMV UL128 및 UL130에 상동성인 CyCMV 유전자는 전구체 차제물로부터 결실시켜 CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130을 생성하였다 (도 4).
- [0125] CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130의 면역원성은 시노몰구스 마카쿠에스를 접종하고 SIVgag 웹타이드에 대한 말초 혈액 CD8+ 기억 T 세포 반응을 모니터링함에 의해 생체내 평가하였다. CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130 벡터-백신화된 시노몰구스 마카쿠에스로부터의 PBMC는 4개 아미노산 (GAG ORF)까지 중첩된 15량체 SIVgag 웹타이드로 자극하거나 MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프에 상응하는 지적된 SIVgag 웹타이드로 자극하였고 유동 세포측정 세포내 사이토킨 염색 (ICS)을 수행하였다. 슈퍼토프 웹타이드는 즉, 소정의 MHC-I 또는 MHC-II 대립유전자의 존재 또는 부재하에, MHC 반수체에 상관 없이 동물의 90% 이상에서 인지되는 웹타이드이다. MHC-E 또는 MHC-II-결합된 SIVgag 웹타이드에 응답하는 CD8+ T 세포는 IFN- γ 및 TNF- α 발현을 통해 동정하였다(도 5a). 동물은 T 세포가 전체 단백질 (GAG ORF)를 포괄하는 중첩 웹타이드로 자극되는 경우 SIVgag에 대해 강한 CD8 T 세포 반응을 유발하였다. 그러나, CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130은 모든 RhCMV 68-1-면역화된 마카쿠에스에서 이전에 검출된, MHC-E 슈퍼토프 반응(문헌(Hansen *Science* 2013 및 Hansen 2016)에 기재된 웹타이드 Gag69 및 Gag120) 또는 MHC-II 슈퍼토프 반응 (문헌(Hansen *Science* 2013 및 Hansen 2016)에 기재된 Gag53 및 Gag7

3)을 인지하는 CD8+ T 세포 반응을 유발하지 않았다(도 5b). 대신, CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130은 MHC-I 및 MHC-II 제한된 CD8+ T 세포 반응의 혼합을 유도하였다(도 5c). 그러나, MHC-II 슈퍼토프 반응은 관찰되지 않았다. 이들 결과는 야생형 시노몰구스 CMV로부터의 UL128 및 UL130의 결실이 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포의 유발을 위해 불충분함을 지적한다.

[0126]

적어도 2개의 상이한 가능성은 이들 결과를 설명할 수 있다: a) 시노몰구스 마카쿠에스는 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포를 유도할 수 없거나, b) RhCMV 68-1에서 추가의 돌연변이는 상기 바이러스가 레서스 마카쿠에스에서 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포를 유발할 수 있게 한다. UL128 및 UL130의 동족체에 추가로, RhCMV 68-1은 또한 HCMV UL146 및 UL147와 상동성을 갖는 유전자가 없다(문헌참조: Oxford, K. L., M. K. Eberhardt, K. W. Yang, L. Strelow, S. Kelly, S. S. Zhou, and P. A. Barry. 2008. Protein coding content of the ULb' region of wild-type rhesus cytomegalovirus. *Virology* 373:181-8; 본원에 참조로 인용됨). 야생형 RhCMV는 이들 CXC-케모킨 유사 단백질의 6개 카페물을 암호화하고, 이중 3개는 RhCMV 68-1에서 결실되어 있고, 나머지 3개의 유전자들의 발현은 공지되지 않는다. RhCMV 68-1의 상기 특성을 요약한다면, UL128 및 UL130의 동족체 뿐만아니라, UL146 및 UL147의 모든 6개 동족체가 없는 CyCMV가 생성되었다. (도 4). CyCMV Δ RL13/ gag Δ UL128-130 Δ UL146-147 벡터-백신화된 시노몰구스 마카쿠에스로부터의 PBMC는 4개 아미노산 (GAG ORF)까지 중첩된 15량체 SIVgag 웨타이드로 자극하거나 MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프에 상응하는 지적된 SIVgag 웨타이드로 자극하였고 유동 세포측정 세포내 사이토킨 염색 (ICS)을 수행하였다. MHC-E 또는 MHC-II-결합된 SIVgag 웨타이드에 응답하는 CD8+ T 세포는 IFN- γ 및 TNF- α 발현을 통해 동정하였다. CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128/130 Δ UL146을 사용한 시노몰구스 마카쿠에스의 접종은 MHC-E 및 MHC-II 슈퍼토프 둘 다를 인지하는 CD8+ T 세포를 유발하였다(도 6a). 특히, Gag69는 항-MHC-I 및 VL9 웨타이드에 의해 차단되지만, CLIP 웨타이드로 차단되지 않고, 이는 MHC-E 제한 (MHC-E는 비-다형성 MHC-1 분자이다)과 일치하는 반면, Gag73은 CLIP 웨타이드로 차단되었지만 항-MHC-I 또는 VL9 웨타이드로는 차단되지 않고, 이는 MHC-II 제한과 일치한다(도 6b). 이들 결과는 CyCMV Δ RL13/SIVgag Δ UL128-130 Δ UL146-147이 MHC-E 및 MHC-II-제한된 CD8+ T 세포를 유발하지만 다형성 MHC-Ia-제한된 CD8+ T 세포를 유발하지 않음을 지적한다(도 6c).

[0127]

총체적으로, 이들 데이터는 UL146/147 패밀리의 CXC 케모킨-유사 단백질이 MHC-II 슈퍼토프-제한된 CD8+ T 세포 뿐만 아니라 MHC-E-제한된 CD8+ T 세포의 유도를 차단함을 시사한다. 따라서, 이들 데이터는 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포가 단지 UL146 및 UL147의 동족체 일부 또는 모두 뿐만 아니라 UL128 및 UL130 둘 다가 없는 CMV벡터에 의해 유도될수 있다는 개념을 지지한다. RhCMV에 의한 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포 반응의 유도는 또한 이전에 UL40 및 US28의 동족체의 존재를 요구하는 것으로 나타났다. CyCMV는 또한 이들 유전자를 함유하기 때문에, 이들 결과는 CMV 벡터가 단지 이들이 하기의 유전자 구성을 갖는 경우 MHC-E 반응을 유도함을 시사한다: UL128 및 UL130 또는 동족체의 결실; UL146 및 UL147 또는 동족체의 일부 또는 모두의 결실; UL40 또는 동족체의 존재; 및 US28 또는 동족체의 부재.

[0128]

실시예 3

[0129]

레서스 CMV 및 인간 CMV의 UL146 동족체는 레서스 마카쿠에스에서 MHC-E 반응의 유도를 차단한다.

[0130]

RhCMV의 UL146/147-상동성 유전자들이 심지어 UL128 및 UL130이 결실되어 있음에도 RM에서 MHC-E 반응의 유도를 유사하게 차단시킴을 입증하기 위해, 야생형 버전의 RhCMV를 고도로 돌연변이된 RhCMV 68-1를 생성시켰던 RhCMV 단리물의 본래의 서열을 복구시킴에 의해 생성하였다. RhCMV 68-1 전구체 바이러스의 ULb'-영역은 길 등 (Gill et al)(문헌참조: Gill, R. B. et al., Coding potential of UL/b' from the initial source of rhesus cytomegalovirus Strain 68-1. *Virology* 447, 208-212)에 기재된 본래의 단리물로부터 서열분석하였다. RhCMV 68-1 세균 인공 염색체(BAC)의 유전학적 가공을 사용하여, 야생형의 전장 계놈(FL-RhCMV)은 일련의 돌연변이 유발 단계에서 재생성하였다(도 7). 출발점으로서 FL-RhCMV-BAC를 사용하여, SIVgag는 HCMV RL13의 RhCMV 동족체에 삽입하여 FL-RhCMV Δ RL13gag를 생성하였다. RM의 접종시, SIVgag에 대한 CD8+ T 세포 반응이 관찰되었지만 MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프에 대한 반응은 관찰되지 않았다(도 8a). 이어서, UL128 및 UL130의 RhCMV 동족체는 결실시켜 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130을 생성하였다. RM의 접종시, SIVgag-특이적 CD8+ T 세포 반응이 관찰되었지만 MHC-E 또는 MHC-II 슈퍼토프에 대한 반응은 관찰되지 않았다(도 8b). 이들 관찰은 케모킨의 HCMV UL146/147 유전자 패밀리의 RhCMV 동족체가 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포의 유도를 억제함을 강하게 시사하였다.

[0131]

68-1 RhCMV는 HCMV UL146 및 UL147의 6개 동족체 중 3개만이 부재이기 때문에, HCMV UL146 및 UL147의 주요 3개 동족체를 결실시켜 UL128-130 결실된 RhCMV가 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포를 유발

할 수 있는지를 결정하였다. 그러나 놀랍게도 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130 Δ UL146(3)은 MHC-II 또는 MHC-E에 의해 제한된 슈퍼토프 웨타이드에 대해 CD8+ T 세포를 유발할 수 없었다(도 8c). 이들 결과는 6개 동족체 중 3개 초과가 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포를 유발하기 위해 결실되거나 불활성화될 필요가 있음을 시사한다. 따라서, UL146 및 UL147 중 모든 6개 동족체를 결실시켜 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130 Δ UL146(6)을 생성하였다. 상기 벡터가 접종된 RM은 MHC-II 및 MHC-E 슈퍼토프를 인지하는 CD8+ T 세포를 유발할 수 있었다(도 8d). 이들 결과는 UL146 및 UL147의 모든 6개 동족체의 결실이 UL128+130이 없는 RhCMV가 MHC-E-제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포를 유발할 수 있음을 입증한다.

[0132]

CyCMV 및 RhCMV는 2개의 HCMV 유전자 UL146 및 UL147에 상동성인 6개 유전자를 함유한다. 이를 종합해 보면, 상기 데이터는 시노몰구스 CMV 및 레서스 CMV 둘 다의 이들 케모킨 유사 유전자가 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포 반응의 유도를 차단함을 시사한다. 저해 효과가 HCMV에서 보존되어 있음을 결정하기 위해, HCMV UL146 및 UL147는 단독으로 또는 조합으로 BAC의 재넘버링함에 의해 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130 Δ UL146(6)에 삽입하였다. 3개의 상이한 키메라 벡터를 생성하였다: FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130hcmvUL146-UL147 (이는 상응하는 RhCMV 동족체 대신 HCMV 유전자 둘 다를 함유한다); FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130hcmvUL146 (이는 상응하는 RhCMV 동족체 대신 HCMV UL146을 함유한다); 및 FL-RhCMV Δ RL13gag Δ UL128-130hcmvUL147 (이는 상응하는 RhCMV 동족체 대신 HCMV UL147을 함유한다). RM이 이들 3개의 작제물로 접종되는 경우, 3개의 재조합 벡터의 어느 것도 MHC-II 또는 MHC-E 슈퍼토프를 인지하는 CD8+ T 세포를 유발하지 않았다(도 9a-9c). 이들 결과는 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포를 차단하는 능력이 HCMV 내 보존된 특성임을 지적한다. 이들 및 이전의 결과를 토대로, 또한 HCMV 벡터가 MHC-E 제한된 및 MHC-II 슈퍼토프-특이적 CD8+ T 세포를 유발하기 위해 하기의 특징을 가질 필요가 있음을 자명하다: a) UL128 및 UL130 둘 다의 부재; b) UL147 및 UL147 둘 다의 부재; c) UL40의 존재; d) US28 또는 US27의 존재.

[0133]

실시예 4

[0134]

내피 세포 특이적 마이크로RNA 인지 요소 (MRE)를 포함하는 CMV 벡터는 대부분 MHC-E에 의해 제한되는 CD8+ T 세포 반응을 유발한다.

[0135]

RhCMV 기반 벡터가 내피 계통 세포에서 복제하는 능력을 제한하기 위해, RhCMV 68-1은 필수 바이러스 유전자의 3' UTR에 내피-특이적 miR-126-3p 표적 서열을 함유하도록 가공하였다. miR-142-3p의 조직 특이적 발현을 나타내는 골수 계통 세포와 유사하게, 내피 세포는 세포 계통 특이적인 miR-126-3p를 발현한다. 2개의 필수 RhCMV 유전자(Rh156, HCMV UL122 (IE2)에 상동성인 필수 이메디에이트 어얼리 유전자, 및 Rh108, HCMV UL79에 상동성인 필수 어얼리 유전자)의 3' UTR로의 miR-126-3p 표적 부위의 삽입이 이들 바이러스 필수 유전자를 암호화하는 mRNA의 해독 저해로 인해 miR-126-3p를 고도로 발현하는 내피 세포에서 바이러스 복제를 차단시키는 것으로 추정되었다.

[0136]

galK-매개된 BAC 재조합을 사용하여, galK 선택 카세트는 Rh156의 3' UTR 내에 삽입하고 이어서 8개 무작위 뉴클레오타이드에 의해 분리된 miR-126-3p 결합 부위의 4개 카페물을 함유하는 인공 카세트로 대체하였다. 이어서 제2 시리즈의 재조합을 수행함으로써 galK 카세트를 Rh108의 3' UTR에 삽입하고 이를 상기된 바와 같은 인공 카세트로 대체하였다(도 10). 이들 벡터는 추가로 상기 항원(EF1a 프로모터의 제어하에 있는)을 유전자 Rh211에 삽입함에 의해 SIVgag로부터 유래된 이종성 항원을 발현하였다. 성공적인 재조합은 PCR 생성물의 삽입 부위 및 후속 서열을 플랭킹하는 영역으로 디자인된 프라이머와 함께 PCR을 사용하여 확인하였다. 온전한 BAC DNA는 후속적으로 1차 레서스 섬유아세포에 전기친공하여 바이러스를 회수하고 바이러스 DNA는 또한 서열분석하였다.

[0137]

폐 섬유아세포, 제대 정맥 내피 세포 및 대식세포는 레서스 마카쿠에스로부터 유래하였다. RNA는 각각의 세포 유형으로부터 단리하였고 miR-126-3p 및 miR-142-3p에 대한 qRT-PCR은 모든 샘플에 대해 수행하였다. miR-126-3p 및 miR-142-3p 카페 번호는 표준 곡선을 사용하여 10ng의 RNA로부터 결정하였다. miR-126-3p miRNA는 레서스 마카쿠에 내피 세포에서 고도로 발현되지만 말초 혈액으로부터 유래된 대식세포 또는 1차 섬유아세포에서 보다 낮은 수준으로 발현된다. 대조적으로, miR-142-3p는 대식세포에서는 고도로 발현되지만 내피 세포 또는 섬유아세포에서는 아니다(도 11). 이들 데이터는 레서스 마카쿠에 내피 계통 세포가 레서스 섬유아세포 또는 대식세포와 비교하여 보다 높은 수준의 miR-126-3p를 발현하고 내피 세포에서 필수 RhCMV 전사체를 표적화하기 위해 상기 miRNA를 사용하기 위한 이유를 제공한다.

[0138]

miR-126-3p 수준이 높은 세포에서, 필수 유전자 (예를 들어, Rh156 및 Rh108)에서 miR-126-3p 결합 부위를 함유하는 바이러스는 miR-126-3p-로딩된 RNA 유도된 사일런싱 복합체 (RISC)가 성장을 위해 염격히 제한되고, Rh156 및 Rh108의 3' UTR에 결합하고 해독을 차단하기 때문에 성장을 위해 염격히 제한된다. 바이러스 복제에

대한 miR-126-3p 발현의 영향을 입증하기 위해, miR-126-3p 또는 음성 대조군 모사체로 레서스 섬유아세포를 형질감염시키고 miR-126-3p 표적 부위 또는 균등한 크기의 스크램블된 서열 (68-1 Rh156/Rh108 miR-126mut)을 함유하는 68-1 RhCMV의 바이러스 성장을 모니터링하였다. 구체적으로, 텔로머화된 레서스 섬유아세포는 음성 대조군 miRNA 또는 miR-126 RNA 모사체로 형질감염시키고, 형질감염 24시간 후, 세포는 0.01의 MOI로 RhCMV 68-1 Rh156/Rh108 miR-126 또는 RhCMV 68-1 Rh156/Rh10 miR-126mut를 사용하여 감염시켰다. 세포 및 상등액은 지정된 시간에 수거하였고 레서스 섬유아세포 상에서 적정하였다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 세포에서 바이러스 성장 및 상등액으로의 바이러스 방출은 대조군 miRNA의 형질감염시가 아닌 miR-126-3p 모사체의 형질감염 시 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126에 대해 매우 저해되었지만 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126mut에 대해서는 저해되지 않았다.

[0139] miR-126-3p가 내피 세포에서 바이러스 성장을 저해함을 추가로 입증하기 위해, miR-126-3p 표적 부위를, 온전한 5량체 복합체로 인해 RhCMV 68-1 보다 효율적으로 시험관내 내피 세포를 감염시키는, RhCMV 68-1.2에서 IE2 및 UL79 동족체의 3' UTR에 삽입하였다. 1차 레서스 내피 세포는 0.01의 MOI로 68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126 또는 68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126mut를 사용하여 감염시켰다. 감염된 세포 또는 상등액은 감염 후 7일, 14일, 21일 및 28일째에 수거하고 이어서 레서스 섬유아세포에 대한 바이러스 적정을 수행하였다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 스크램블된 miR-126-3p 표적 서열 (68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126mut)을 함유하는 대조군이 아닌 68-1.2 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126-3p는 레서스 내피 세포에서 성장하는 이의 능력에서 심하게 제한되었다.

[0140] miR-126-제한된 바이러스의 면역원성은 생체내 평가하였다. 레서스 마카우에에 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 miR-126/SIVgag 벡터 (UL128, UL130, UL146, 및 UL147의 동족체가 없지만 EF1 α 프로모터의 제어하에 SIVgag 전이 유전자 뿐만 아니라 HCMV UL40 및 US28의 가능성 동족체를 함유하는)를 접종하고 말초 혈액 CD8+ 기억 T 세포를 단리하고 유동 세포측정 ICS를 통해 중첩 SIVgag 웨بت아이드에 대한 반응에 대해 분석하였다(도 15). 상기 동물은 SIVgag에 대한 중첩 웨بت아이드의 존재하에 CD69 및 TNF α 의 상향조절에 의해 나타나는 바와 같이 전체 단백질에 대한 강한 CD8 T세포 반응을 유발하였다. 상기 결과는 백신 벡터의 전체 면역원성이 miR-126-3p 표적 부위의 도입에 의해 손상되지 않음을 지적했다. 그러나, 벡터는 MHC-E에 의해 제한된 CD8+ T 세포를 유발하였지만, 이것은 MHC-II 제한된 에피토프에 대해 CD8+ T 세포를 유발하지 않았다. 상기 T 세포 표현형을 추가로 특징 분석하기 위해, 2개의 RM에 68-1 RhCMV miR-126/SIVgag를 접종하고, 125 SIVgag 웨بت아이드 각각의 MHC-제한은 각각 MHC-E 또는 MHC-II 제한된 CD8+ T 세포 반응을 차단하는 VL9 또는 CLIP 웨بت아이드의 존재 또는 부재하에 ICS에 의한 T 세포 반응을 측정함에 의해 결정하였다. 도 14에 나타낸 바와 같이, 68-1 RhCMV miR-126/SIVgag-면역화된 RM으로부터 수득된 CD8+ T 세포에 의해 인지되는 모든 웨بت아이드는 MHC-E에 의해 제공되었다. 이들 결과는 RhCMV 68-1이 UL128, UL130, UL146, 및 UL147의 동족체가 부재이고 UL40 및 US28의 동족체를 발현하기 때문에 MHC-E 및 MHC-II 제한된 CD8+ T 세포를 유발함을 지적한다. miR-126-3p가 상기 골격에 삽입됨에 의해, MHC-II 반응이 제거되었다.

[0141] 이들 데이터는 내피 세포의 감염이 MHC-II 제한된 CD8+ T 세포의 유도를 위해 요구됨을 입증한다. miR-126-3p 표적 부위의 삽입은 따라서 "MHC-E 단독" 벡터, 즉, MHC-E 제한된 CD8+ T 세포를 배타적으로 유발하지만 다형성 MHC-I 또는 MHC-II 분자에 의해 제한된 T 세포를 유발하지 않는 벡터를 유도한다. MHC-E 제한된 CD8+ T 세포는 SIV 및 추정컨대 HIV에 대한 보호를 위해 요구되기 때문에, 이들 데이터는 또한 벡터 효능이, CD8+ T 세포 반응을 보호 에피토프 상으로 집중시키는 miR-126-3p 삽입에 의해 개선될 수 있음을 시사한다. 따라서, MHC-E-최적화된 HCMV 벡터는 하기의 특징을 가져야만 한다: a) UL128 및 UL130 둘 다의 부재; b) UL146 및 UL147 둘 다의 부재; c) UL40의 존재; d) US28 또는 US27의 존재; 및 e) miR-126-3p 표적 부위의 필수 유전자, 예를 들어, IE2 또는 UL79 (또는 HCMV 성장을 위해 필수적인 것으로 공지된 임의의 유전자)의 3' UTR로의 삽입.

[0142] 실시예 5

[0143] 내피 세포-특이적 및 골수-특이적 마이크로RNA 인지 요소 (MRE) 둘 다를 포함하는 CMV 벡터는 대부분 MHC-Ia에 의해 제한되는 CD8+ T 세포 반응을 유발한다.

[0144] 본원 발명자들은 이전에 필수 바이러스 유전자의 3' UTR에서 골수-특이적 miR-142-3p 표적 서열을 함유하도록 가공된 RhCMV 68-1이 MHC-E 반응이 완전히 상실된 miR-126-3p 삽입의 정확히 반대 표현형을 가졌고 MHC-II-단독 벡터 디자인을 유도하는 MHC-II 반응을 유지함을 입증하였다(문헌참조: WO/2017/087921). miR-142-3p 및 miR-126-3p의 조합 삽입의 영향을 결정하기 위해, 본원 발명자는 각각 miR-126-3p 및 miR-142-3p의 2개의 카페물을 3' UTR of Rh156 및 Rh108에 삽입하기 위해 BAC 재조합을 사용하였다(도 16). 이들 벡터는 추가로 상기 항원

(EF1 a 프로모터의 제어하에 있는)을 유전자 Rh211에 삽입함에 의해 SIVgag로부터 유래된 이종성 항원을 발현하였다. 성공적인 재조합은 PCR 생성물의 삽입 부위 및 후속 서열을 플랭킹하는 영여으로 디자인된 프라이머와 함께 PCR을 사용하여 확인하였다. 온전한 BAC DNA는 후속적으로 1차 레서스 섬유아세포에 전기천공하여 바이러스를 회수하고 바이러스 DNA는 또한 서열분석하였다.

[0145] miR-126/ miR-142-제한된 바이러스의 면역원성은 생체내 평가하였다. 레서스 마카쿠에에 68-1 RhCMV Rh156/Rh108 -126 miR-126 miR-142/SIVgag 벡터 (UL128, UL130, UL146, 및 UL147의 동족체가 없지만 EF1 a 프로모터의 제어하에 SIVgag 전이유전자 뿐만아니라 HCMV UL40 및 US28의 기능성 동족체를 함유하는)를 접종하고 말초 혈액 CD8+ 기억 T 세포를 단리하고 유동 세포측정 ICS를 통해 SIVgag 웨타이드에 대한 반응에 대해 분석하였다(도 17). 상기 동물은 중첩 웨타이드를 사용하는 ICS에서 측정된 바와 같이 전체 SIVgag 단백질에 대해 강한 CD8 T 세포 반응을 유발하였다. 그러나, 상기 벡터는 MHC-II 또는 MHC-E 제한된 슈퍼토프 웨타이드를 인지하는 CD8+ T 세포를 유발하였다. 상기 T 세포 표현형을 추가로 특징 분석하기 위해, 125 SIVgag 웨타이드 각각의 MHC- 제한은 범-MHC-I (blocks both MHC-Ia 및 MHC-E 둘 다를 차단하는), VL9 웨타이드 (MHC-E를 차단하는) 또는 CLIP 웨타이드 (MHC-II를 차단하는)의 존재 또는 부재하에 ICS에 의한 T 세포 반응을 측정함에 의해 결정하였다. 도 17에 나타낸 바와 같이, 68-1 RhCMV miR-126/miR-142/SIVgag-면역화된 RM으로부터 수득된 CD8+ T 세포에 의해 인지되는 모든 웨타이드들은 MHC-Ia에 의해 제공되었다. 이들 결과는 UL128, UL130, UL146, 및 UL147 또는 이의 동족체가 없고 UL40 및 US28의 동족체를 발현하는 벡터가 miR-126-3p 및 miR-142-3p 둘 다를 삽입함에 의해 MHC-Ia 제한된 CD8+ T 세포를 유도하도록 재프로그래밍될 수 있음을 지적한다.

[0146] 표 1은 상기 실시예로부터 결과를 요약한다. 모든 유전자에 대해 온전하고 세포 유형-특이적 miR에 의해 제한되지 않는 야생형 CMV가 통상적인 MHC-I 제한된 CD8+ T 세포를 유발한다. UL128 및 UL130 (단독으로 또는 조합으로)의 결실은 MHC-I 및 (비-슈퍼토프) MHC-II 제한된 CD8+ T 세포 반응의 혼합을 유발하는 벡터를 유도한다. UL146 또는 UL147의 동족체와 함께 UL128 및 UL130의 결실은 MHC-II 및 MHC-E 슈퍼토프에 대한 반응을 포함하는, MHC-II 및 MHC-E에 의해 제한된 T 세포 반응을 유발한다. 이들 유전자 모두가 결실된 벡터만이 MHC-E 및 MHC-II 제한된 CD8+ T 세포를 유발한다. UL146 및 UL147의 동족체가 없지만 UL128 및 UL130 동족체를 함유하는 벡터는 MHC-E 또는 MHC-II 제한된 CD8+ T 세포를 유발하지 않지만 대신 통상적인 MHC-I 제한된 CD8+ T 세포를 유발한다. miR-126-3p 표적화를 통한 내피 세포에서 바이러스 유전자 발현을 제한시킴에 의해, MHC-II 제한된 CD8+ T 세포의 유도는 차단될 수 있고 배타적으로 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포를 유도하는 벡터를 유도한다. miR-126-3p 및 miR-142-3p 표적화를 통한 내피 세포 및 골수-계통 세포 둘 다에서 바이러스 유전자 발현을 제한시킴에 의해, MHC-II 및 MHC-E 제한된 CD8+ T 세포 둘 다의 유도는 차단될 수 있고 배타적으로 MHC-Ia 제한된 CD8+ T 세포를 유도하는 벡터를 유도한다.

표 1: CMV 벡터의 특정 MHC-제한을 생성하는 유전자 변형의 요약

CMV 벡터의 유전자 변형				벡터-유발된 CD8+ T 세포의 MHC-제한				
Rh157.5 (UL128)	Rh157.4 (UL130)	Rh158/161 (UL146/147)	마이크로 RN A 제한*	MHC-Ia	MHC-II 슈퍼토프	MHC-II 슈퍼토프	MHC-E	MHC-E 슈퍼토프
온전한	온전한	온전한	부재	예	아니오	아니오	아니오	아니오
결실된	온전한	온전하거나 결실된	부재	예	아니오	아니오	아니오	아니오
온전한	결실된	온전하거나 결실된	부재	예	아니오	아니오	아니오	아니오
결실된	결실된	온전한	부재	예	아니오	아니오	아니오	아니오
온전한	온전한	결실된	부재	예	아니오	아니오	아니오	아니오
결실된	결실된	결실된	부재	아니오	예	예	예**	예**
결실된	결실된	결실된	miR-126-3p	아니오	아니오	아니오	예**	예**
결실된	결실된	결실된	miR-142-3p	아니오	예	예	아니오	아니오
결실된	결실된	결실된	miR-126-3p; miR-142-3p	예	아니오	아니오	아니오	아니오

*miR 표적 서열의 4 개 카피물의 필수 바이러스 유전자 IE2 (Rh156) 및 UL79 (Rh108)의 3' UTR로의 삽입

**MHC-E-제한된 반응 프라이밍은 또한 Rh67 및 Rh214/220 또는 이들의 HCMV 오톨로그 (UL40 및 US27/28)의 온전한 기능에 의존한다.

[0147]

[0148]

실시예 6

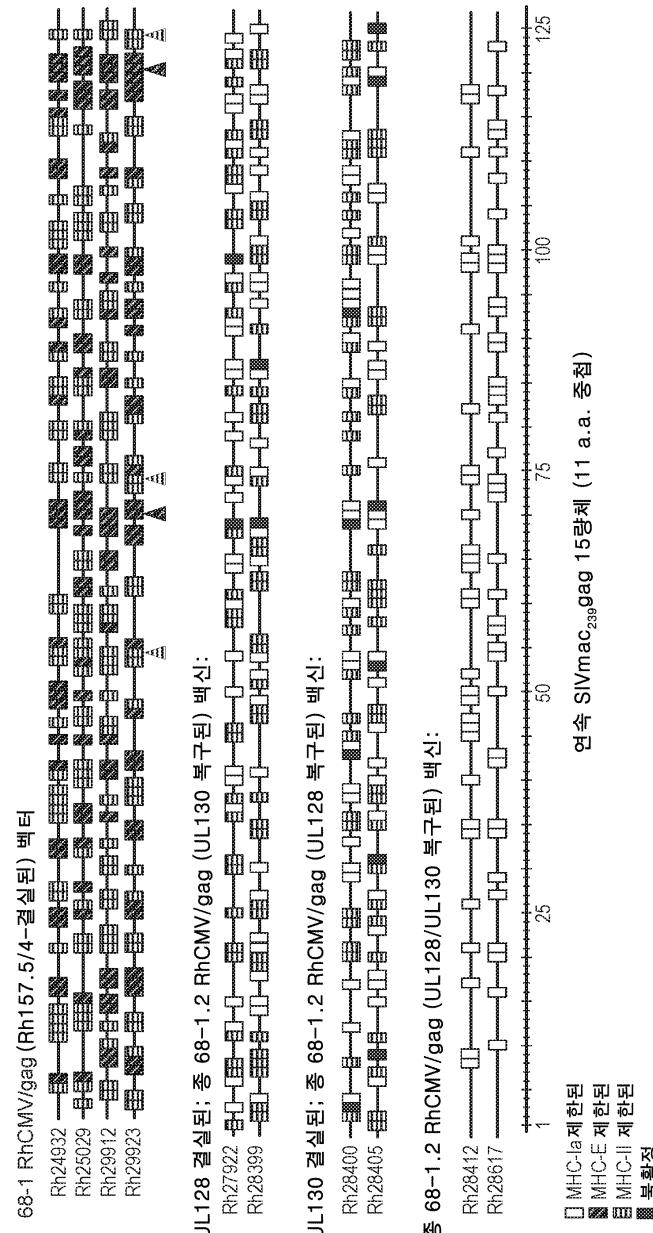
[0149] MHC-E와 관련하여 목적하는 펩타이드에 특이적인 CD8+ T 세포의 생성

[0150] 전형적인 다형성 MHC-Ia 분자와 관련하여 목적하는 항원-유래된 펩타이드를 인지하는 T 세포 수용체를 사용하여 암 또는 감염성 질환과 같은 질환의 면역치료요법을 위해 자가 T 세포를 형질감염시킬 수 있다. 상기 접근법의 주요 장애는 소정의 TCR의 용도를 MHC-Ia 일치된 환자로 제한하는 인간 집단에서의 MHC-Ia 다양성이다. 비-전형적, 비-다형성 MHC-E 분자와 관련하여 목적하는 항원-유래된 펩타이드(예를 들어, 종양 항원-유래된 펩타이드 및 병원체-유래된 펩타이드)를 인지하는 TCR을 생성시킴에 의해, MHC-매칭은 쓸모가 없게 되었고 수득한 TCR은 모든 환자에서 사용될 수 있다.

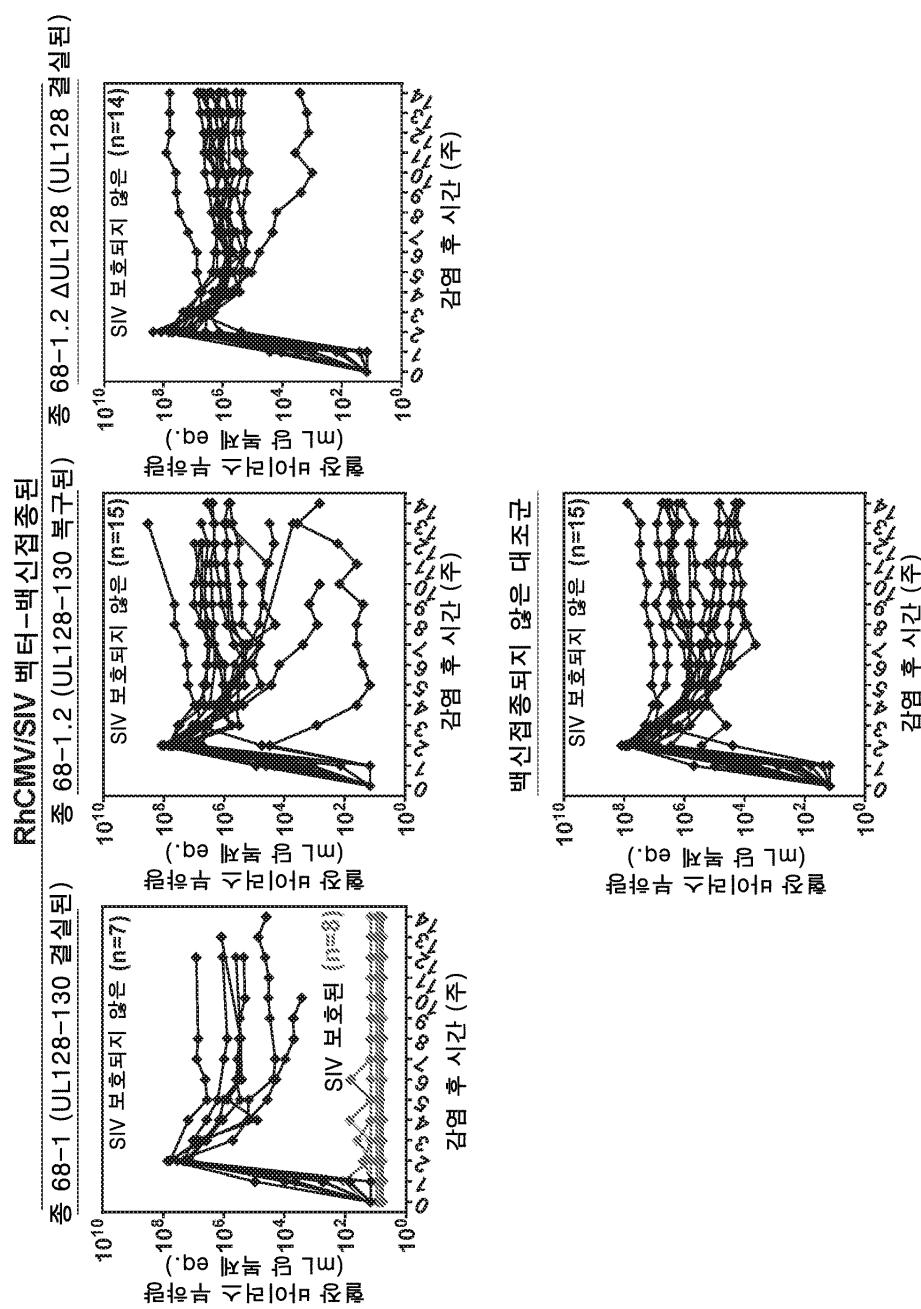
[0151] MHC-E/펩타이드 복합체를 인지하는 CD8+ T 세포는 천연에서 희귀하고 현재 종양 항원, 병원체-유래된 항원, 조직-특이적 항원 또는 숙주 자가-항원과 같은 목적하는 항원에 대해 지시된 T 세포를 생성하기 위한 신뢰할만한 방법이 없다. 본원에 기재된 방법은 HCMV UL128, UL130, UL146, 및 UL147에 상동성인 유전자가 없는 레서스 사이토메갈로바이러스 (RhCMV) 및 시노몰구스 사이토메갈로바이러스 (CyCMV) 백터가 증가된 빈도로 MHC-E-제한된 CD8+ T 세포를 유발한다는 발견을 토대로 한다. 목적하는 항원을 UL128, UL130, UL146, 및 UL147에 대해 결실된 RhCMV 또는 CyCMV로 삽입함에 의해, MHC-E에 의해 제공된 개별 펩타이드에 대해 지시된 CD8+ T 세포가 생성될 수 있다. 상기 CMV 백터는 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA, 예를 들어, miR-126-3p의 존재 하에 유전자 발현을 사일런싱하는 MRE를 포함시킴에 의해 추가로 변형될 수 있다. MHC-E/펩타이드-인지 TCR은 임의의 다수의 방법에 의해 동정될 수 있지만 일반적으로 단일 세포, 클론적으로 확장된 단일 세포 또는 펩타이드 특이적 CD8+ T 세포의 딥 서열분석 풀의 cDNA로부터 PCR에 의해 직접적으로 알파 및 베타 쇄를 서열분석함에 의존한다. 대안적으로, 서열은 단일 세포, 클론적으로 확장된 단일 세포 또는 펩타이드 특이적 CD8+ T 세포의 풀에 대한 전체 전사체 라이브러리를 먼저 생성시킴에 의해 RNA 주형을 확장시켜 간접적으로 유래할 수 있다. 펩타이드 특이적 가변 서열은 cDNA 말단의 신속한 증폭(RACE) 또는 mRNA 상에 수행되는 RNA 주형 (SMART) 프로토콜의 5' 말단에서 스위칭 기전에 의해 생성될 수 있다. 단일 펩타이드 반응성 CD8+ 세포의 전체 전사체 라이브러리로부터 플랭킹 불변 영역 또는 이와 유사하게 고정된 PCR은 이들 각각의 TCR 가변 영역에 대해 직접적으로 서열분석될 수 있거나 딥 서열분석될 수 있다. 펩타이드 반응성 CD8+ T 세포의 개별 또는 풀의 TCR 서열로부터 유래된 알파 및 베타 쇄의 확장된 조합은 추가로 합성될 수 있거나 클로닝될 수 있다. 이어서, 수득한 TCR 작제물로 T 세포를 형질감염시킬 수 있고, 이어서 T 세포는 치료요법(예를 들어, 암 치료요법 또는 감염성 질환 치료요법)으로서 환자에게 투여될 수 있다. TCR 가변 영역을 클로닝하고 형질감염시키기 위한 방법은 또한 문현(참조: Barsov EV *et al.*, *PLoS One* 6, e23703 (2011))에서 논의되고, 이는 본원에 참조로 인용된다.

도면

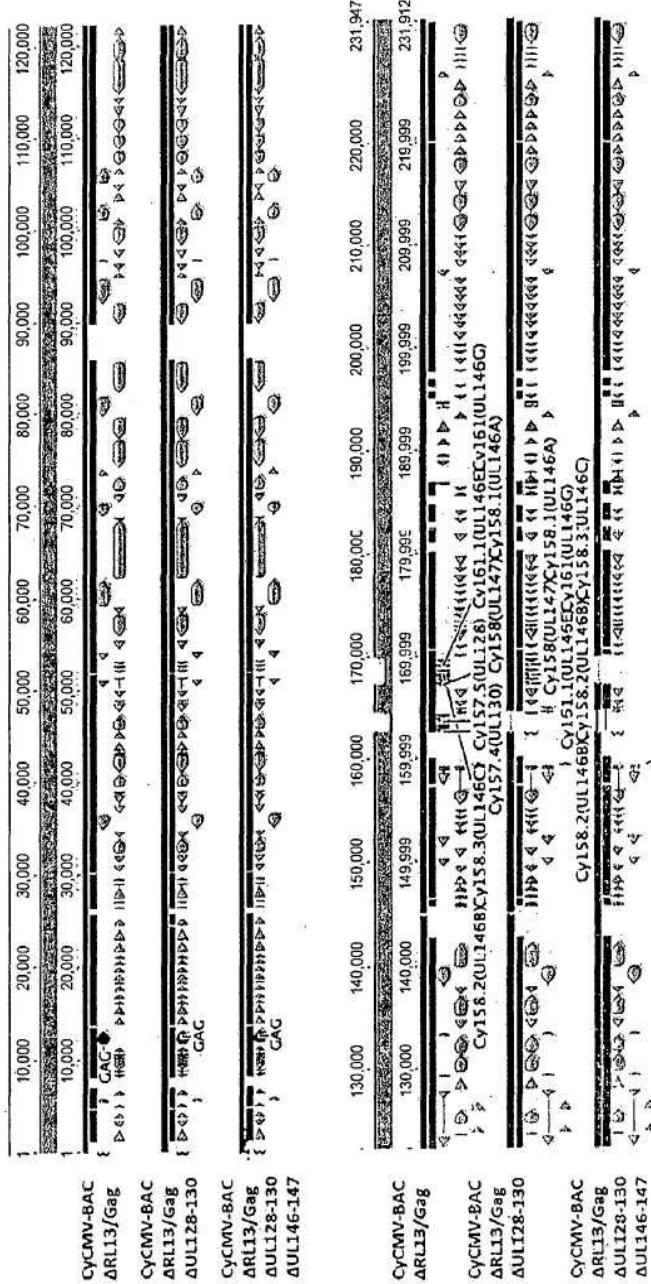
도면1



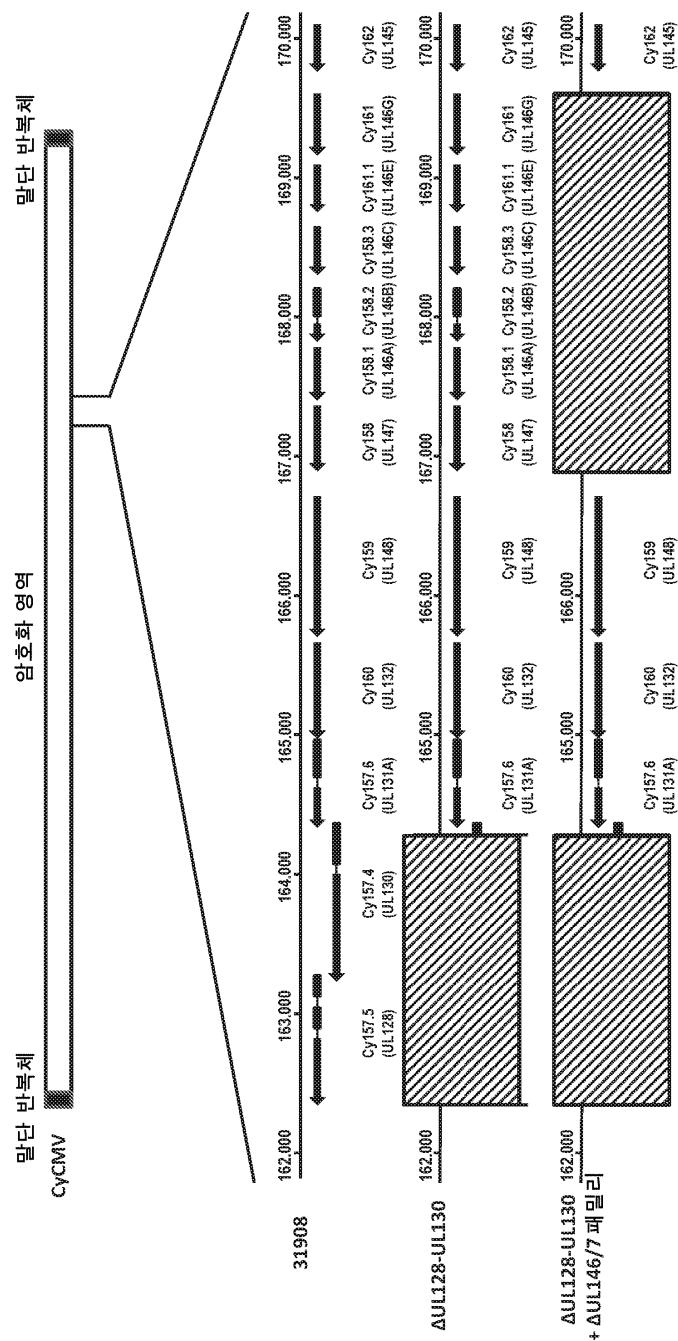
도면2



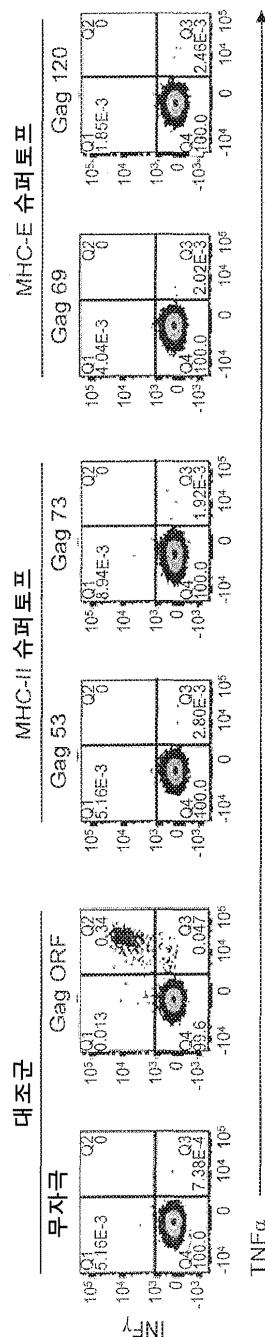
도면3



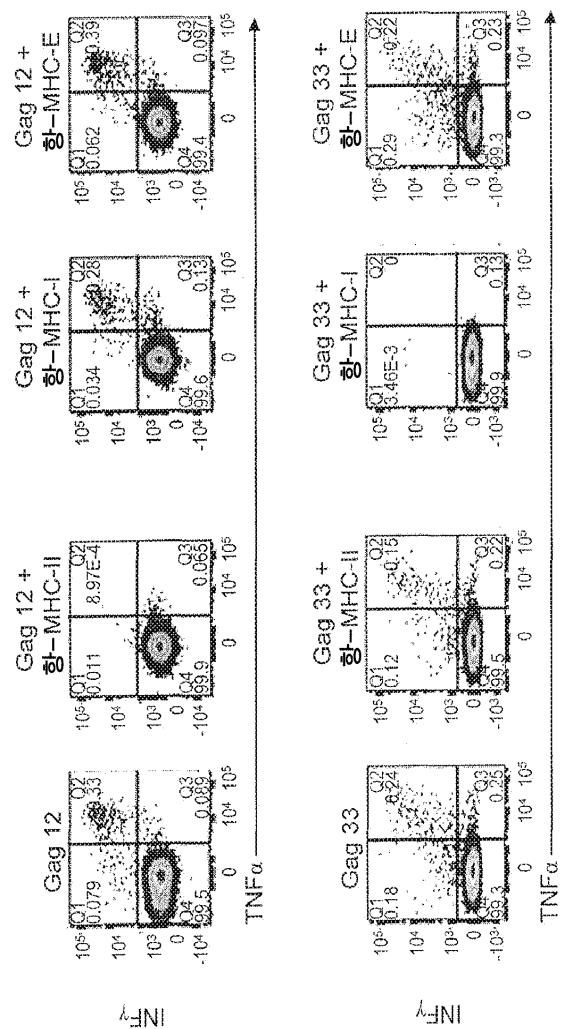
도면4



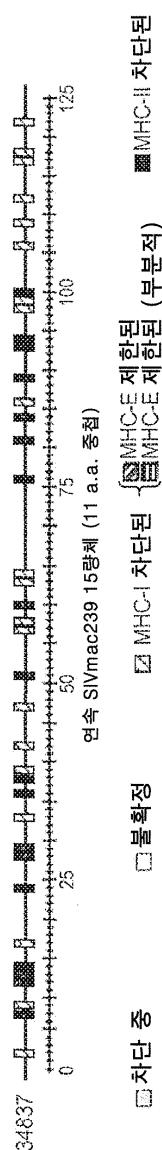
도면5a



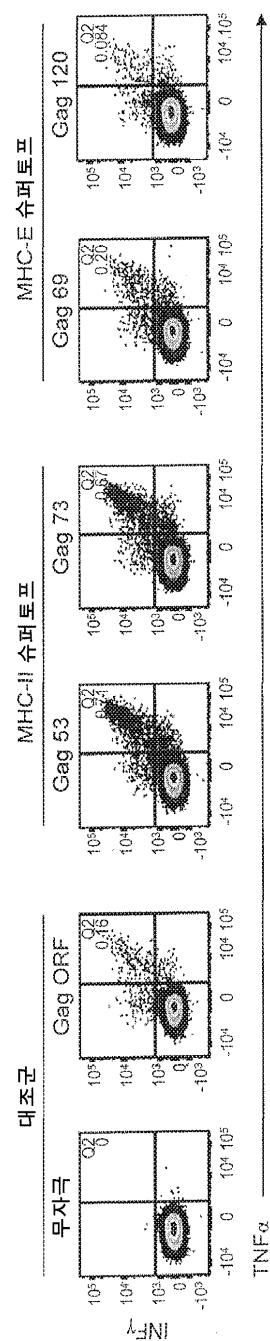
도면5b



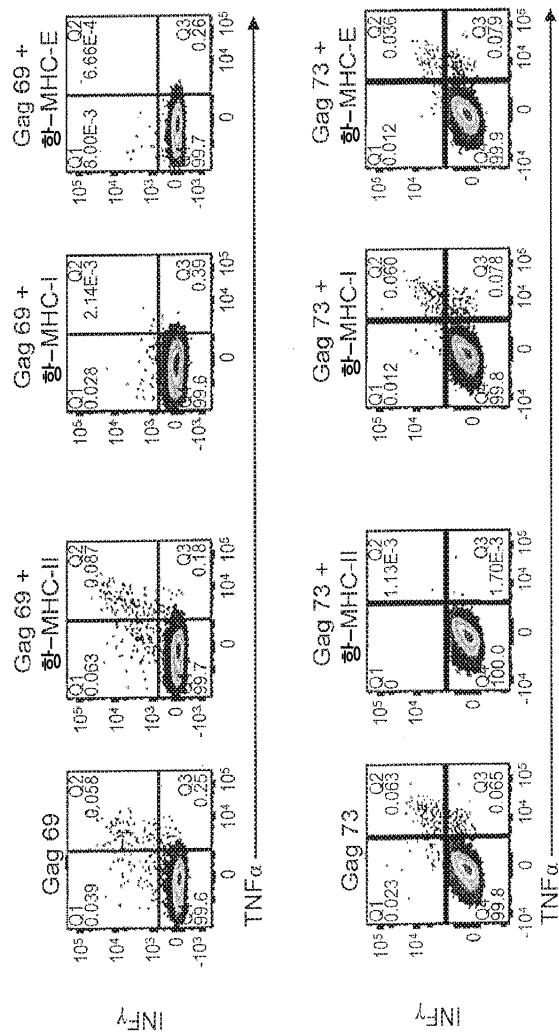
도면 5c



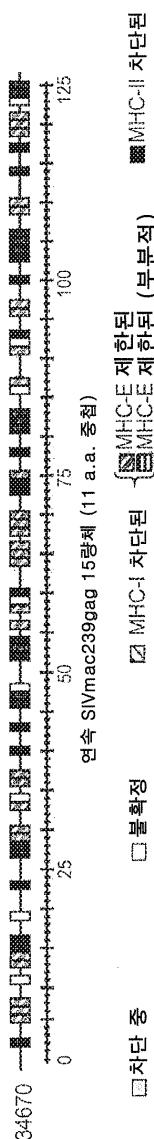
도면 6a



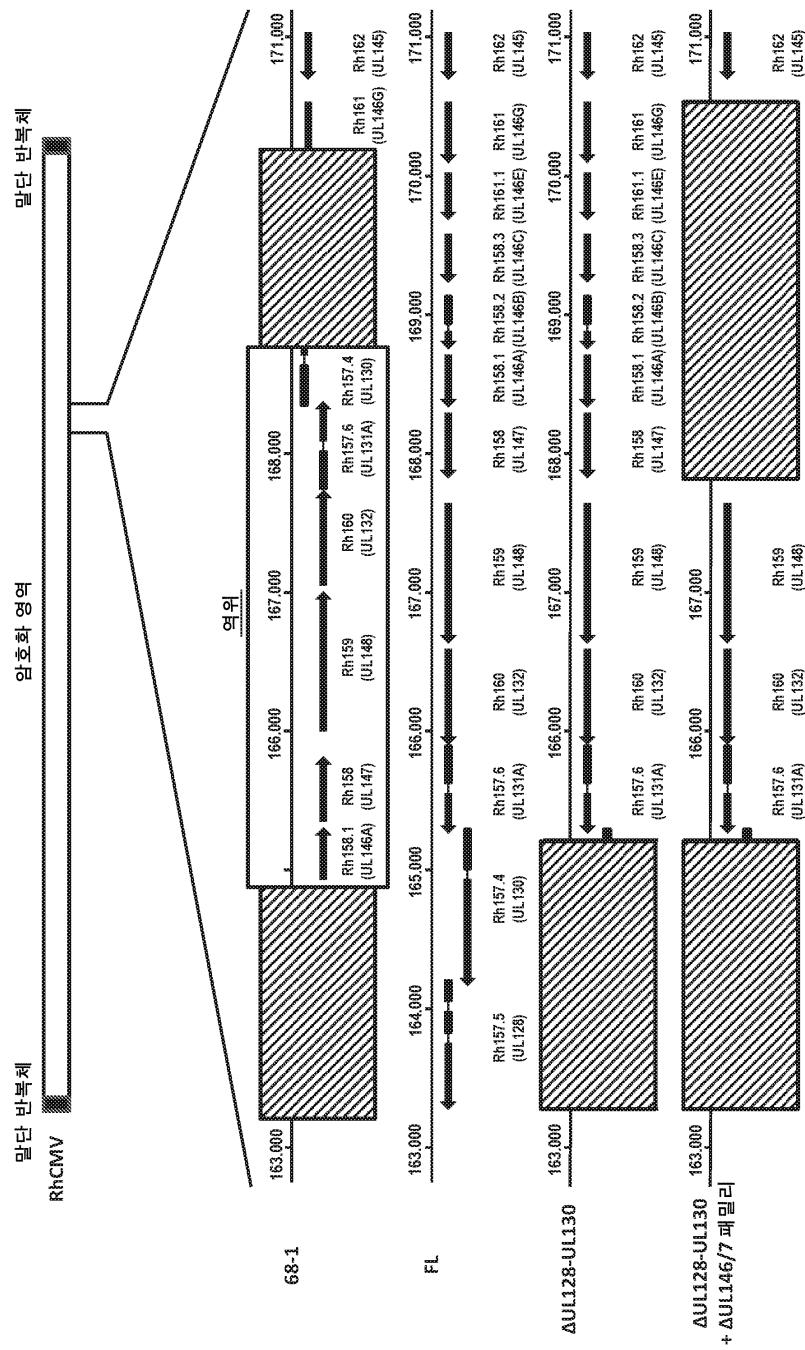
도면6b



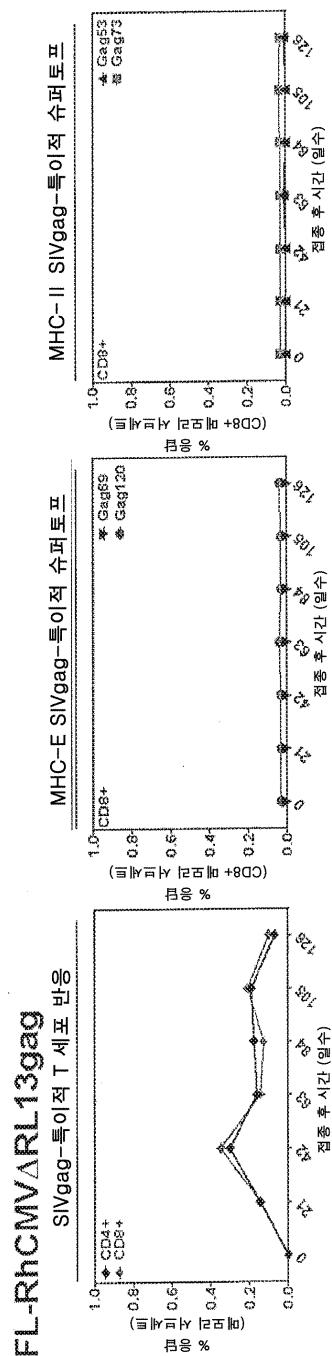
도면6c



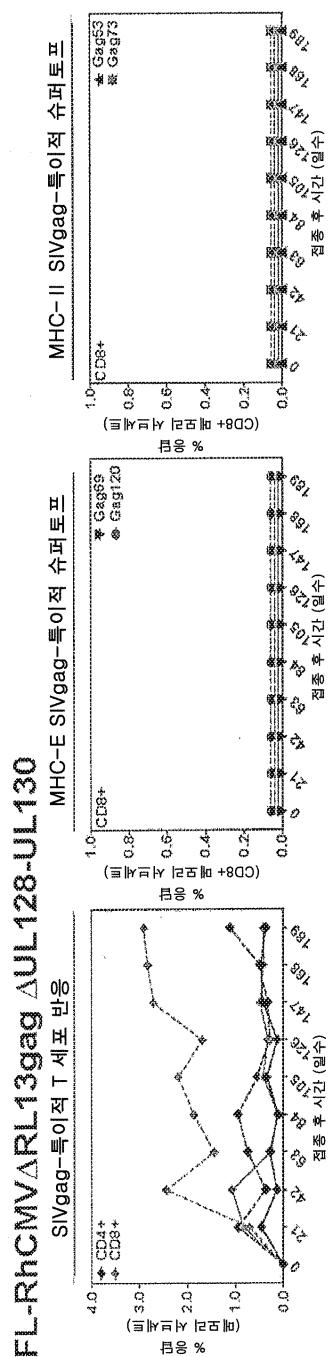
도면7



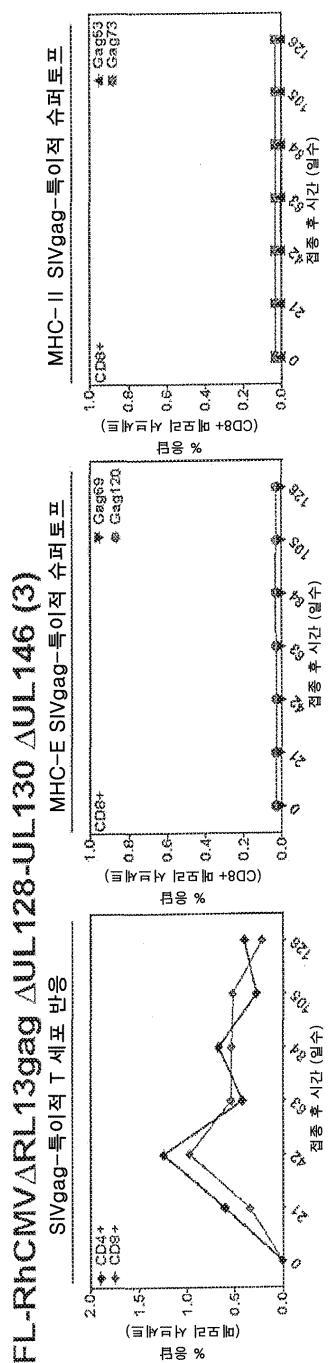
도면 8a



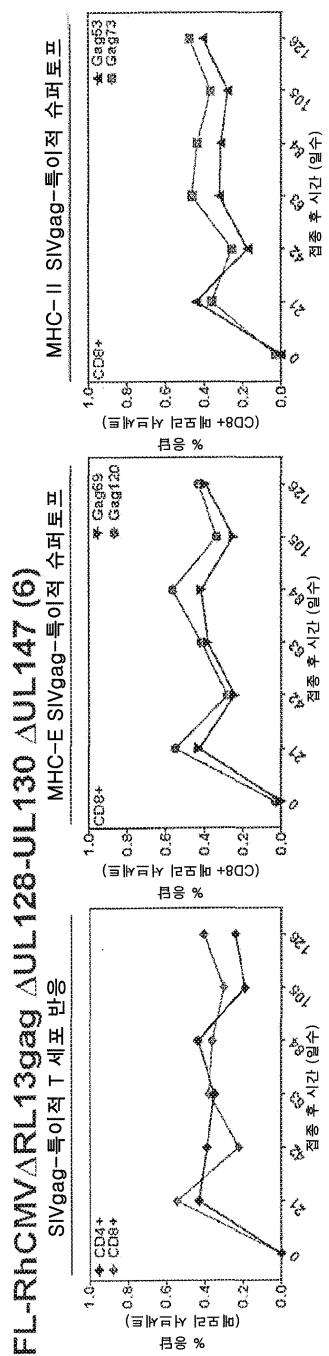
도면 8b



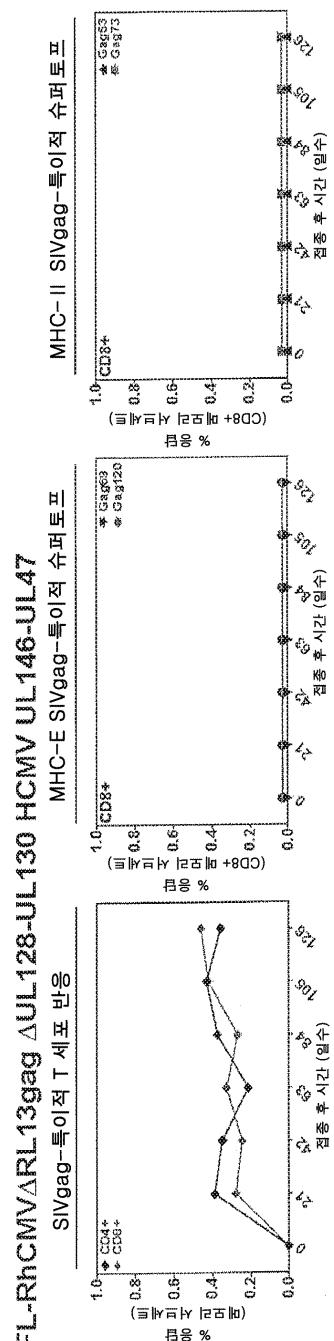
도면 8c



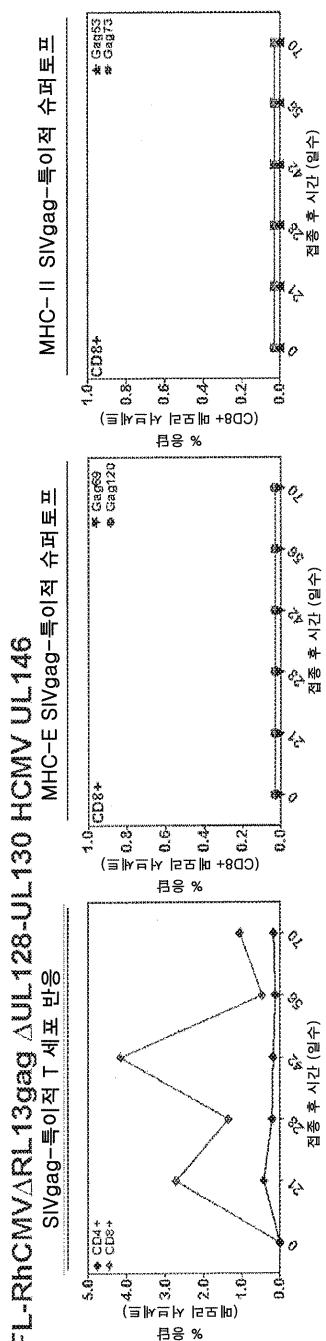
도면 8d



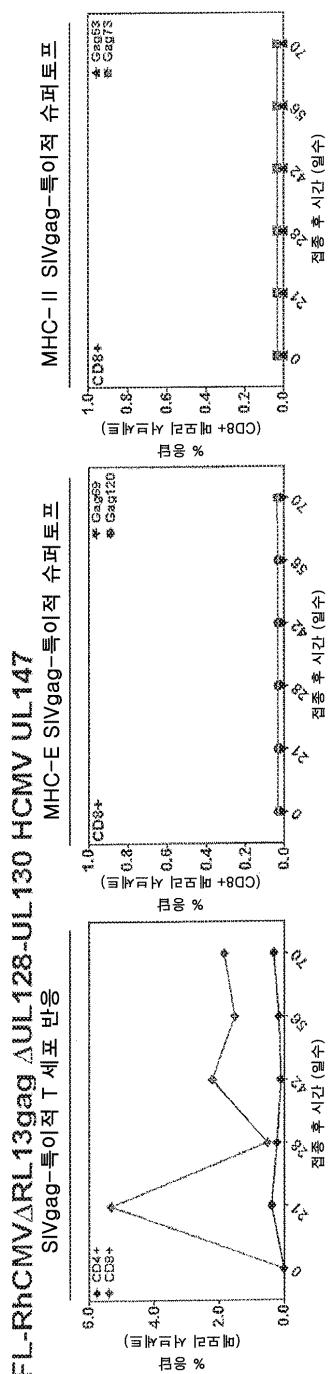
도면 9a



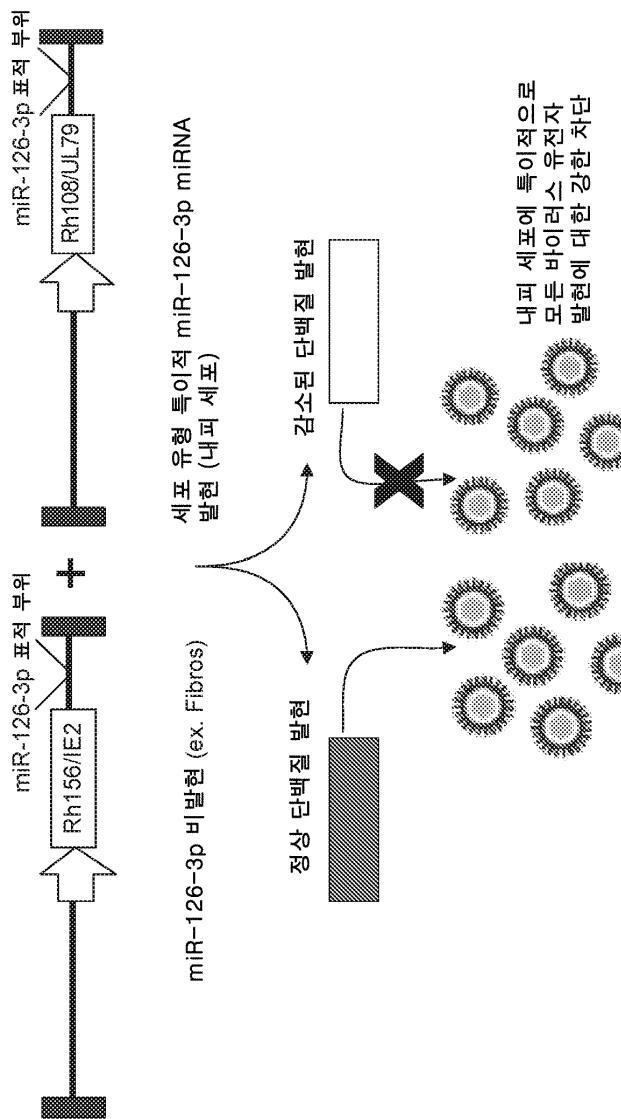
도면 9b



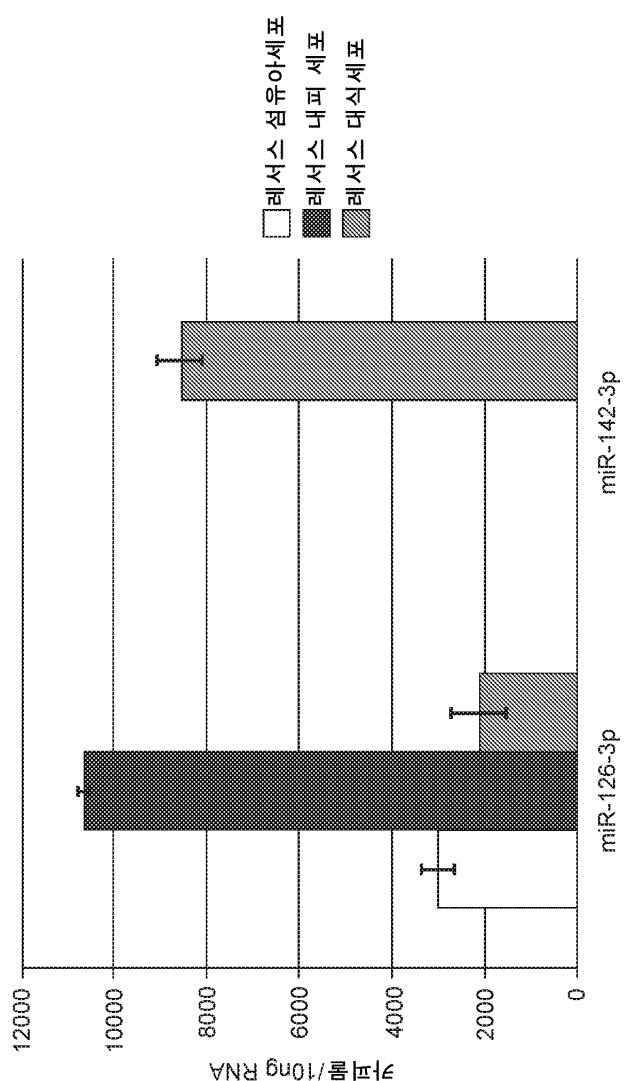
도면 9c



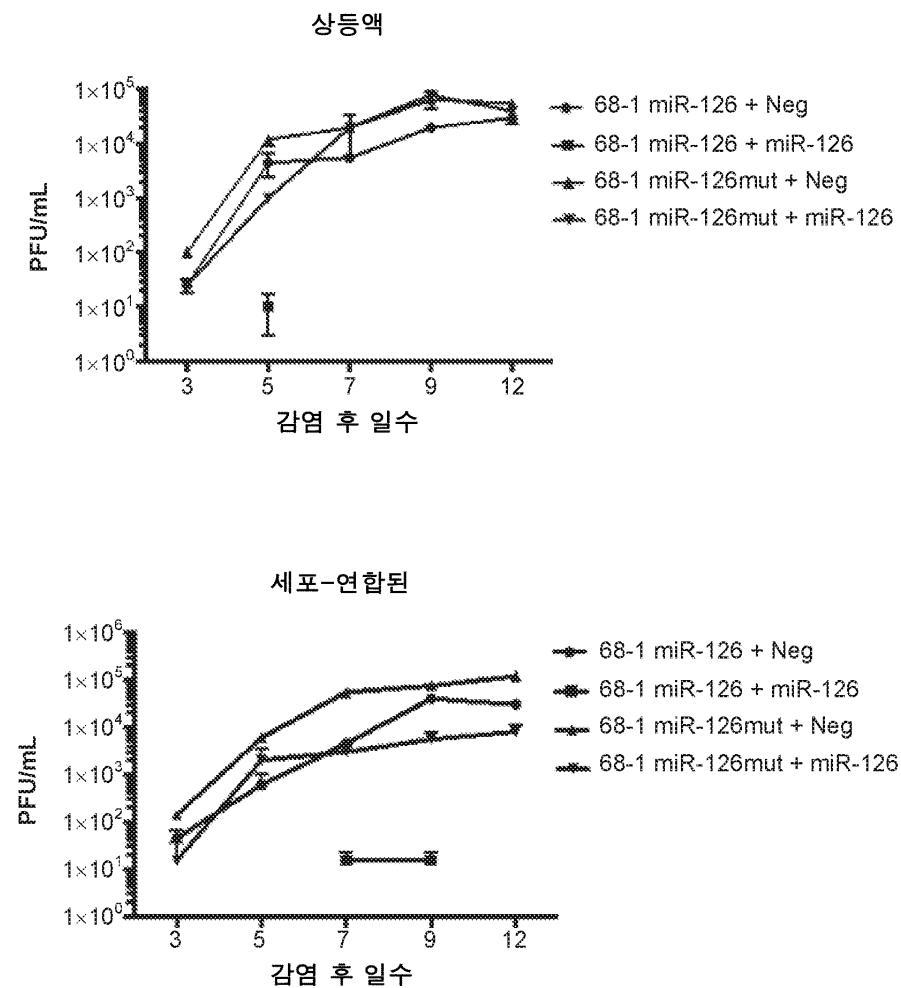
도면 10



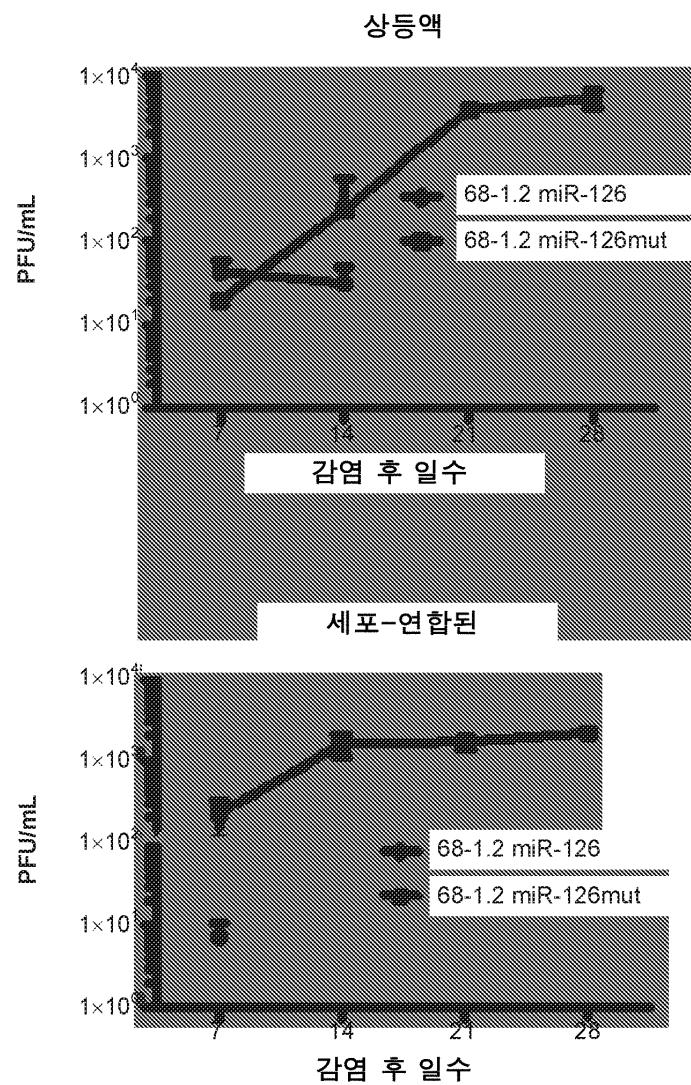
도면 11



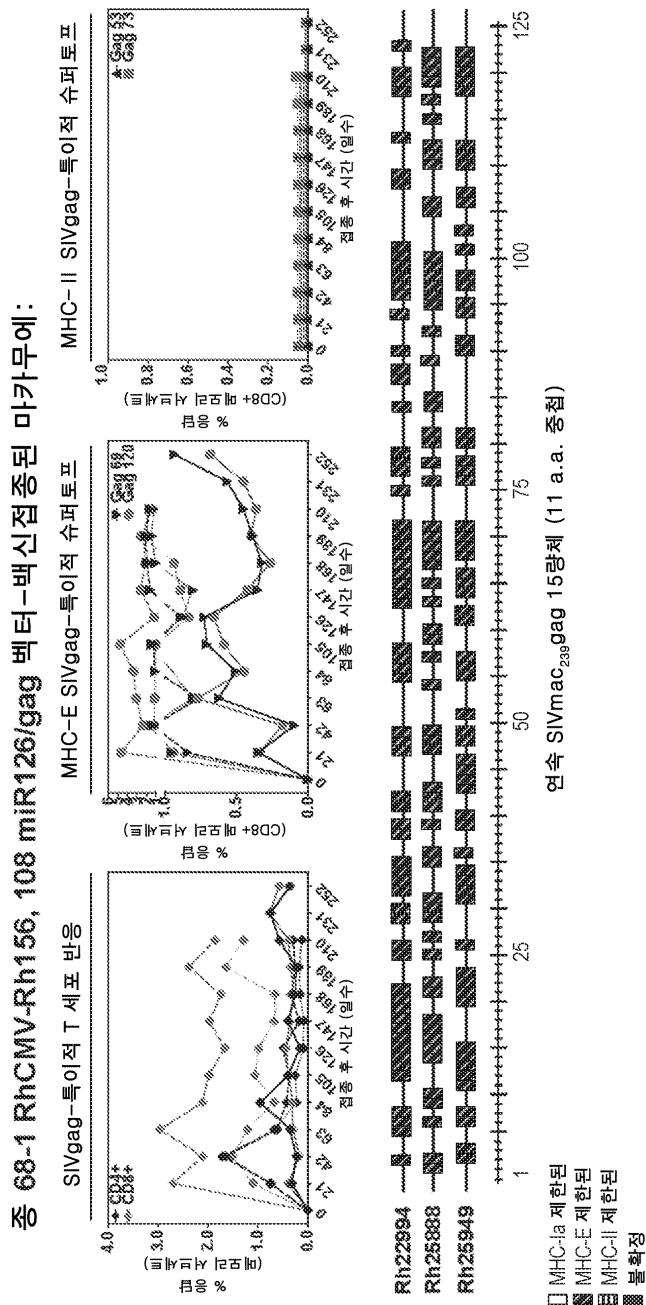
도면12



도면13

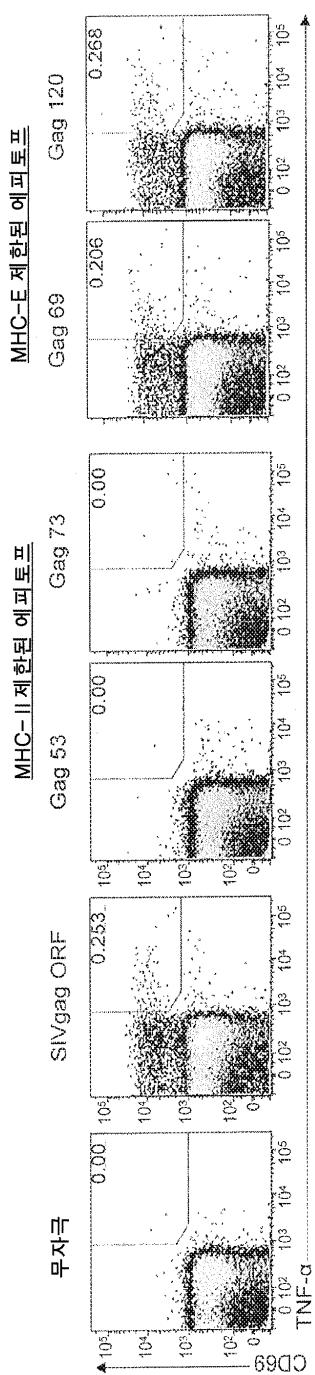


도면14

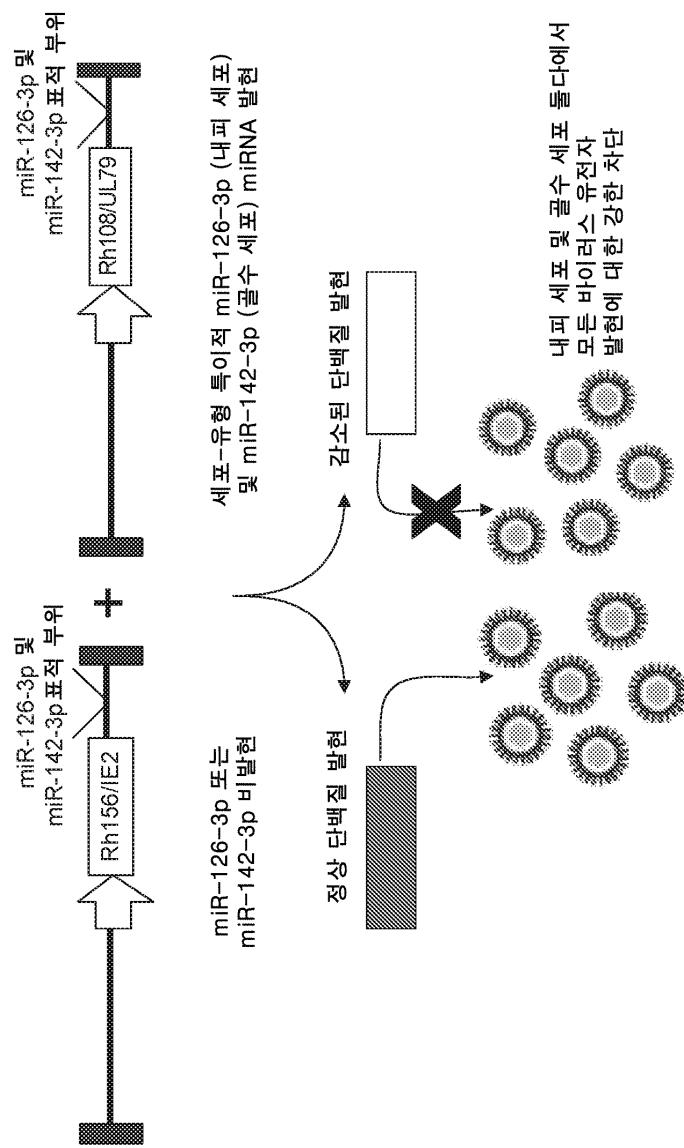


도면 15

종 68-1 RhCMV-Rh156, 108 miR 126/SIVgag 뼈 터-백신 접종된 마카무에:

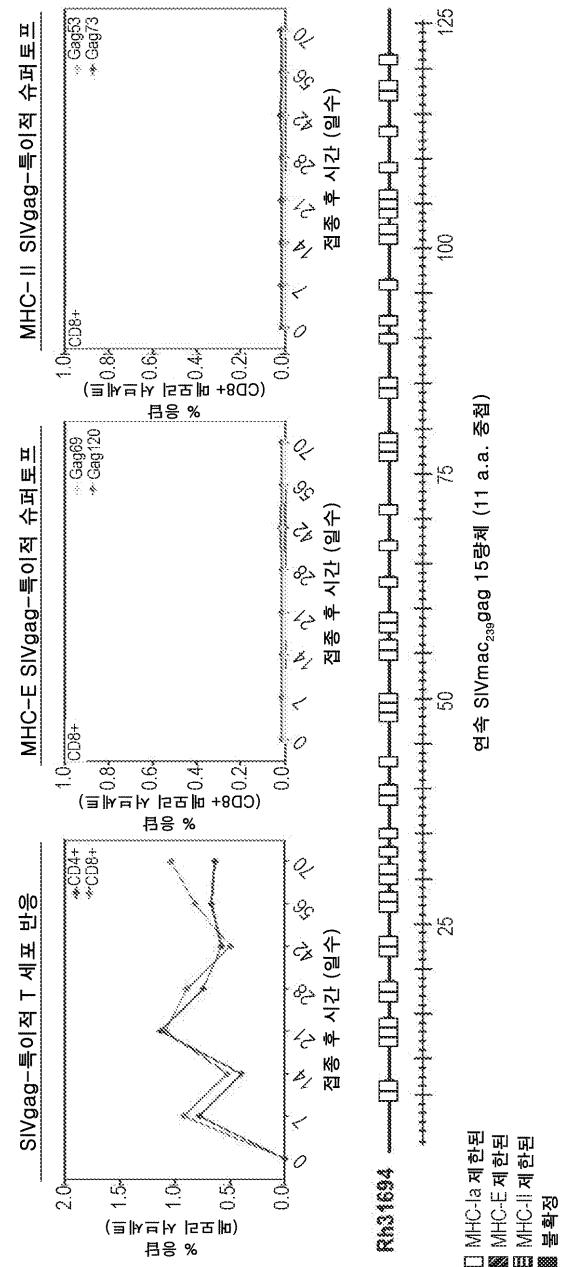


도면 16



도면17

종 68-1 RhCMV-Rh156, 108 miR142, miR126/gag 벡터-백신접종된 마카우에:



서 열 목록

- <110> Oregon Health & Science University
 PICKER, LOUIS
 HANSEN, SCOTT
 FRUEH, KLAUS
 MALOULI, DANIEL
 NELSON, JAY
 SACHA, JONAH
 HANCOCK, MEAGHAN
- <120> CYTOMEGALOVIRUS VECTORS ELICITING T CELLS RESTRICTED BY MAJOR

HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX E MOLECULES

<130>	P105PCT	
<150>	62/409,840	
<151>	2016-10-18	
<160>	4	
<170>	KoPatent In version 3.0	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
ucguaccgug aguaauaaug cg		22
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
cgcattatta ctcacggtagt acg		22
<210>	3	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	3	
uguaguguuu ccuacuuuau gga		23
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	4	
tccataaagt aggaaacact aca		23

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

제1항에 있어서,

CMV 성장에 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된 제2 MRE를 포함하고, 상기 MRE가 내피 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 제3 핵산 서열을 더 포함하는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 백터.

【변경후】

제1항에 있어서,

CMV 성장에 필수적이거나 이를 증가시키는 CMV 유전자에 작동적으로 연결된 제2 MRE를 포함하고, 상기 MRE가 골수 계통의 세포에 의해 발현되는 마이크로RNA의 존재하에 발현을 사일런싱하는 제3 핵산 서열을 더 포함하는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 백터.