

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034284**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.01.24

(21) Номер заявки

201491676

(22) Дата подачи заявки

2013.03.11

(51) Int. Cl. **C12N 7/02** (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ЧАСТИЦЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ТРАНСГЕНСОДЕРЖАЩЕГО АДЕНОВИРУСА С 5'-КОНЦЕВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ СТАТСТАТ

(31) **61/609,678; 12159009.5**(32) **2012.03.12**(33) **US; EP**(43) **2014.12.30**(86) **PCT/EP2013/054846**(87) **WO 2013/135615 2013.09.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Кустерс Жером Х.Х.В., Веллинг Йорт
(NL)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **ROBERTS DIANE M. ET AL.:** "Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity", **NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM**, vol. 441, no. 7090, 11 May 2006 (2006-05-11), pages 239-243, XP002385300, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE04721 page 239 - page 243

KINCHINGTON PAUL R. ET AL.: "Sequence changes in the human adenovirus type 5 DNA polymerase associated with resistance to the broad spectrum antiviral cidofovir", **ANTIVIRAL RESEARCH**, vol. 56, no. 1, October 2002 (2002-10),

pages 73-84, XP002696552, ISSN: 0166-3542 page 75; table 1

US-A1-2009227000

WO-A2-2008080003

XIAOPING HE ET AL.: "5/35 Fiber-Modified Conditionally Replicative Adenovirus Armed with p53 Shows Increased Tumor-Suppressing Capacity to Breast Cancer Cells", **HUMAN GENE THERAPY**, vol. 22, no. 3, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 283-292, XP55061895, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2010.058 figure 4

H. KANEKO ET AL.: "Analysis of the complete genome sequence of epidemic keratoconjunctivitis-related human adenovirus type 8, 19, 37 and a novel serotype", **JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY**, vol. 90, no. 6, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 1471-1476, XP055023766, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.009225-0 sequence AB448771

SILVER JIM ET AL.: "Transduction and Oncolytic Profile of a Potent Replication-Competent Adenovirus 11p Vector (RCAd11pGFP) in Colon Carcinoma Cells", **PLOS ONE**, vol. 6, no. 3, March 2011 (2011-03), XP008162557, ISSN: 1932-6203 page 10, right-hand column - page 11, right-hand column

XIAOPING HE ET AL.: "5/35 Fiber-Modified Conditionally Replicative Adenovirus Armed with p53 Shows Increased Tumor-Suppressing Capacity to Breast Cancer Cells", **HUMAN GENE THERAPY**, vol. 22, no. 3, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 283-292, XP055061895, ISSN: 1043-0342, DOI: 10.1089/hum.2010.058 page 284 - page 287; figure 1

(57) Изобретение относится к композиции, включающей частицы рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса человека серотипа 5, 26, 34, 35, 48, 49 или 50 или рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса обезьян, отличающейся тем, что геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ. Также настоящее изобретение относится к способам получения партии частиц таких рекомбинантных трансгенсодержащих аденовирусов.

B1**034284****034284****B1**

Изобретение относится к области медицины и к области доставки генов для применений в вакцинации и генной терапии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к партиям рекомбинантных аденовирусных векторов.

Предпосылки изобретения

Рекомбинантные аденовирусы человека и животных широко используются в генной терапии и вакцинации. Вектор на основе аденовируса используется в качестве носителя гена, представляющего интерес, подлежащего введению в клетку-хозяина, например, для экспрессии гена или его части, кодирующей требуемый антиген, для вызова иммунного ответа.

Было идентифицировано более 50 различных серотипов аденовируса человека. В прошлом среди них наиболее всесторонне был изучен аденовирус серотипа 5 (Ad5) для применения в качестве носителя генов. Ранее в качестве векторов было изучено несколько других серотипов, таких как аденовирусы человека Ad11, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 и Ad50 и аденовирусы обезьян, в связи с более низкими уровнями преобладающих нейтрализующих антител к данным серотипам в популяции человека (смотри, например, WO 00/70071). Среди них перспективными примерами являются рекомбинантные Ad35 (rAd35) и rAd26, которые исследуют в клинических испытаниях.

Молекулярная биология аденовирусов, обладающих геномом, представленным двухцепочечной ДНК размером приблизительно 34-38 т.п.о, была подробно изучена. Все аденовирусы характеризуются различными инвертированными концевыми повторами (ITR) размером приблизительно 100 п.о (Dan et al., 2001, *Virus Genes* 22:175-179; Liu et al., 2003, *Curr Top Microbiol Immunol* 272:131-164), которые являются консервативными среди серотипов различных групп (Shinagawa et al., 1987, *Gene* 55:85-93). Концы генома ковалентно связаны с терминальным белком (TP) на 5'-концах генома. ITR содержат точку начала репликации (Bernstein et al., 1986, *Mol Cell Biol* 6: 2115-2124; Challberg & Rawlins, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 100-104; Guggenheimer et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3069-3073; Harris & Hay, 1988, *J Mol Biol* 201: 57-67; Hay, 1985, *EMBO J* 4: 421-426; van Bergen et al., 1983, *Nucleic Acids Res* 11: 1975-1989; Wang & Pearson, 1985, *Nucleic Acids Res* 13: 5173-5187) и являются крайне важными для репликации ДНК, имея в составе сайты связывания с клеточными белками, которые активируют репликацию и способствуют образованию структуры "ручка сковороды". Последовательности ITR имеют короткий высококонсервативный канонический "коровый участок", находящийся в пределах от 9 до 18 нуклеотида (Liu et al., *supra*). Однако, 8 концевых нуклеотидов, предшествующих данному коровому участку, варьируют между типами и изолятами аденовируса (Alestrom et al., 1982, *Gene* 18: 193-197; Dan et al., *supra*; Jacobs et al., 2004, *J Gen Virol* 85: 3361-3366; Purkayastha et al., 2005, *J Clin Microbiol* 43: 3083-3094; Rademaker et al., 2006, *J Gen Virol* 87: 553-562; Shinagawa et al., 1987, *supra*; Shinagawa et al., 1983, *Virology* 125: 491-495; Shinagawa & Padmanabhan, 1980, *Proc Natl Acad Sci USA* 11: 3831-3835; Tokunaga et al., 1982, *Gene* 18: 329-334; Hounq et al., 2006, *J Clin Virol* 35: 381-387). Несмотря на то, что у большинства аденовирусов представлена последовательность CATCATCA в 8 концевых нуклеотидах, было описано несколько альтернативных последовательностей.

Спрос на рекомбинантные аденовирусы резко возрастает с учетом ряда заболеваний, поддающихся лечению или профилактике с использованием данных средств для переноса генов, в совокупности с большим числом людей, пораженных данными заболеваниями, и все возрастающей численностью населения во всем мире.

Для клинических партий, предназначенных для введения людям, крупномасштабное производство рекомбинантного аденовируса (rAd) должно быть безопасным и эффективным, а также соответствовать нормативам Надлежащей производственной практики (GMP). Одним важным аспектом в данном отношении является однородность полученных таким образом партий rAd.

Неожиданно, в данном документе сообщается, что результатом изменений, обнаруженных в последовательности восьми наиболее концевых оснований на 5'-конце генома определенных rAd, являются партии, которые демонстрируют неоднородность по отношению к данным последовательностям.

Следовательно, сохраняется необходимость в обеспечении партий rAd в промышленном масштабе, причем партии должны демонстрировать улучшенную однородность. Настоящее изобретение предлагает такие партии, а также способы их получения. Кроме того, данный rAd в партиях по настоящему изобретению демонстрирует улучшенную репликацию в способах получения.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей множество частиц рекомбинантного аденовируса, где рекомбинантный аденовирус представляет собой рекомбинантный трансгенсодержащий аденовирус человека серотипа 5, 11a, 26, 34, 35, 48, 49 или 50, или рекомбинантный аденовирус обезьян, отличающейся тем, что геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в указанной композиции содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов следующую нуклеотидную последовательность: СТАТСТАТ.

Настоящее изобретение также относится к способу получения партии частиц рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса человека серотипа 5, 11a, 26, 34, 35, 49 или 50 или рекомбинантного аденовируса обезьян, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, при этом способ включает: а) молеку-

лярное клонирование рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса для замены природных 5'-концевых нуклеотидов генома аденовируса, не образующих последовательность СТАТСТАТ, на нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ, б) размножение в клетках-хозяевах рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса, содержащего в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, и с) сбор рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса для получения партии частиц, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ.

Настоящее изобретение также относится к способу получения партии частиц рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса человека серотипа 5, 11а, 26, 34, 35, 49 или 50 или рекомбинантного аденовируса обезьян, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, при этом способ включает: а) осуществление очистки аденовируса методом бляшкообразования для выделения из одиночной бляшки рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса, включающего в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, б) размножение в клетках-хозяевах рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса, полученного из одиночной бляшки на стадии а), и с) сбор рекомбинантного аденовируса для получения партии частиц, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ.

Предпочтительно рекомбинантный аденовирус представляет собой рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26 или 35.

В определенных вариантах осуществления в рекомбинантном аденовирусе отсутствует по меньшей мере часть участка E1.

В определенных вариантах осуществления композиция или партия рекомбинантного аденовируса содержит по меньшей мере 1×10^7 , предпочтительно по меньшей мере 1×10^8 , предпочтительно по меньшей мере 1×10^9 , предпочтительно по меньшей мере 1×10^{10} частиц рекомбинантного аденовируса.

В определенных вариантах осуществления стадию б) способов согласно настоящему изобретению осуществляют в биореакторе, предпочтительно имеющем объем от приблизительно 2 литров до 20000 литров.

В определенных вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают очистку рекомбинантного аденовируса.

В определенных вариантах осуществления композиций или способов настоящего изобретения рекомбинантный аденовирус составляют в виде фармацевтической композиции.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Появление альтернативных последовательностей ITR. Подробности смотри в примере 3.

Фиг. 2. Кинетика репликации векторов Ad35 и Ad5 с альтернативными и исходными последовательностями ITR. Подробности смотри в примере 5.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении описано, что специфичная 5'-концевая последовательность (СТАТСТАТ) неожиданно была обнаружена после нескольких пассажей различных рекомбинантных аденовирусов, которые изначально содержали другие концевые последовательности, и что присутствие этой последовательности может способствовать улучшенному получению аденовируса.

Авторы настоящего изобретения предложили этот неожиданный результат наблюдения для практического применения путем конструирования и/или включения стадии активного отбора для получения серотипов рекомбинантных аденовирусов, которые, как сообщается, имеют иную концевую последовательность в своих геномах дикого типа, с геномами, содержащими в качестве 5'-концевых нуклеотидов нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ.

Следовательно, настоящее изобретение относится к определенной последовательности (СТАТСТАТ) на конце генома рекомбинантного аденовируса и его применению в получении рекомбинантных аденовирусов. Данную концевую последовательность можно использовать для любого серотипа аденовируса, который не содержит данную последовательность в 5'-концевой области своего генома дикого типа.

По существу, композиции (партии) аденовируса в соответствии с настоящим изобретением могут содержать последовательность СТАТСТАТ в 100% своих 5'-концевых областей генома (поскольку исходный аденовирус активно получали и/или отбирали в соответствии с настоящим изобретением). Принимая во внимание некоторые природные мутации, которые случайно и периодически могут происходить в любой биологической системе, действительное число может быть немного ниже 100%, хотя в предпочтительных вариантах осуществления количество концевых последовательностей, отличных от СТАТСТАТ, составляет ниже предела детектирования в партиях аденовируса в соответствии с настоящим изобретением. Следовательно, в соответствии с настоящим изобретением по сути все аденовирусные геномы в композициях или партиях частиц рекомбинантного аденовируса содержат в качестве 5'-концевых последовательностей нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ. Используемое в данном документе выражение "по сути все" относится по меньшей мере к 90%, предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, еще более предпочтительно по меньшей мере

99,9%, вплоть до 100% (частиц аденовируса в композиции). Это можно определить, например, с помощью таких способов, как ПЦР, которая позволяет легко выявлять 1 из 1000 частиц, при этом в композициях рекомбинантных аденовирусных частиц по настоящему изобретению аденовирусы с исходными концевыми последовательностями не выявляли.

"Партия" аденовируса в соответствии с настоящим изобретением означает композицию, которая была получена в одном производственном цикле в одной промышленной емкости, или, в качестве альтернативы, она может относиться к множеству частиц аденовируса в композиции, которые присутствуют в одной емкости (например, биореактор, резервуар, колба, микробиологический матрас, многодозовый флакон, однодозовый флакон, шприц и т.д.).

Партия аденовируса в соответствии с настоящим изобретением или композиция, содержащая аденовирус в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно содержит по меньшей мере 10^7 рекомбинантных аденовирусных частиц и в определенных вариантах осуществления содержит по меньшей мере 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} , 10^{17} , 10^{18} или более аденовирусных частиц, вплоть до 10^{20} аденовирусных частиц (например, при получении в биореакторе промышленного масштаба в одном производственном цикле). Помимо рекомбинантного аденовируса партия или композиция могут содержать или не содержать дополнительные сопутствующие компоненты.

Используемое в данном документе выражение по отношению к аденовирусу "рекомбинантный" подразумевает, что он был модифицирован человеком, например, он имеет измененные концевые области, активно клонированные в него, и/или он содержит гетерологичный ген, то есть он не является встречающимся в природе аденовирусом дикого типа.

В данном документе последовательности приведены в направлении от 5' до 3', как принято в данной области техники.

"Капсидный белок аденовируса" относится к белку на капсиде аденовируса, который участвует в определении серотипа и/или тропизме конкретного аденовируса. Аденовирусные капсидные белки, как правило, включают фибер-, пентон- и/или гексон-белки. Аденовирус определенного серотипа (или "основанный" на таковом) в соответствии с настоящим изобретением, как правило, содержит фибер-, пентон- и/или гексон-белки данного определенного серотипа и предпочтительно содержит фибер-, пентон и гексон-белок данного определенного серотипа. Данные белки, как правило, кодируются геномом рекомбинантного аденовируса. Рекомбинантный аденовирус определенного серотипа необязательно может содержать и/или кодировать другие белки другого серотипа аденовируса.

Как используется в данном документе, рекомбинантный аденовирус "основан" на аденовирусе, полученном из дикого типа, по меньшей мере в отношении последовательности. Этого можно достичь молекулярным клонированием, используя геном дикого типа или его части в качестве исходного материала. Также возможно применение известной последовательности генома аденовируса дикого типа для получения (частей) генома *de novo* с помощью синтеза ДНК, который может быть выполнен с использованием стандартных процедур компаниями, предоставляющими услуги в области синтеза ДНК и/или молекулярного клонирования (например, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins). Таким образом, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантный аденовирус, не основанный на Ad4 человека, представляет собой рекомбинантный аденовирус, который не содержит пентон, гексон и фибер из Ad4 человека; рекомбинантный аденовирус, который содержит гексон, пентон и фибер из Ad35, считается рекомбинантным аденовирусом, основанным на Ad35, и т.д.

В результате обширных исследований, которые выполняли с серотипами аденовируса и их геномной организацией, специалист в данной области техники осведомлен о границах ITR в аденовирусном геноме. Последовательность СТАТСТАТ расположена в рекомбинантных аденовирусах в соответствии с настоящим изобретением в наиболее удаленных концевых областях генома. К примеру, верхняя цепь левого ITR из wt Ad5 начинается с 5'-САТСАТСА...-3', и данную последовательность заменяют в соответствии с настоящим изобретением на предпочтительную последовательность 5'-СТАТСТАТ...-3'. Специалист в данной области осведомлен о том факте, что в правом ITR данная последовательность от 5' до 3' расположена в нижней цепи.

Замена исходной (родительской) последовательности на измененную последовательность по настоящему изобретению может быть осуществлена с помощью различных способов, которые сами по себе являются известными и стандартными для специалистов в данной области. Примерами являются прямой ПЦР-синтез последовательностей или субклонирование из исходных аденовирусных геномов, которые идентифицируют по содержанию конкретных последовательностей на их концах.

При замене последовательности на одном конце, например, путем использования методик молекулярной биологии в процедуре гомологичной рекомбинации плазмиды/космиды (смотри, например, WO 99/55132), тогда как другой конец остается незамененным, полученный в результате аденовирус будет при получении и репликации копировать левый или правый ITR, результатом чего будет смешанная популяция аденовирусов только с измененными концами и аденовирусов только с неизмененными концами (которая, как указано в данном документе, будет развиваться в популяцию с более и более измененными концами, имеющими концевую последовательность СТАТСТАТ, при культивировании и размножении *in vitro*, так как преимущество роста обеспечивается данной концевой последовательностью). Пред-

почтительно, чтобы рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержал геном, который имеет в составе последовательность СТАТСТАТ как на правой, так и на левой концевых областях генома.

Таким образом, рекомбинантные аденовирусы в соответствии с настоящим изобретением содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов генома следующую нуклеотидную последовательность: СТАТСТАТ.

Векторы по настоящему изобретению представляют собой рекомбинантные аденовирусы, также называемые рекомбинантными аденовирусными векторами. Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно в данной области.

В определенных вариантах осуществления в аденовирусном векторе в соответствии с настоящим изобретением имеет место дефицит по меньшей мере одного существенно важного функционального гена участка E1, например, участка E1a и/или участка E1b аденовирусного генома, который требуется для вирусной репликации. В определенных вариантах осуществления в аденовирусном векторе в соответствии с настоящим изобретением имеет место дефицит по меньшей мере части участка E3, не являющегося существенно важным. В определенных вариантах осуществления в данном векторе имеет место дефицит по меньшей мере одного существенно важного функционального гена участка E1 и по меньшей мере части участка E3, не являющегося существенно важным. В аденовирусном векторе может иметь место "множественный дефицит", что означает, что в данном аденовирусном векторе имеет место дефицит одного или нескольких существенно важных функциональных генов в каждом из двух или более участков аденовирусного генома. Например, в вышеупомянутых аденовирусных векторах с дефицитом E1 или E1, с дефицитом E3 могут дополнительно иметь место дефицит по меньшей мере одного существенно важного гена участка E4 и/или по меньшей мере одного существенно важного гена участка E2 (например, участка E2A и/или участка E2B).

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913, и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", разделах 67 и 68, соответственно, в *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), а также других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов включает применение стандартных методик молекулярной биологии, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также других источниках, упомянутых в данном документе.

Аденовирус в соответствии с настоящим изобретением принадлежит к семейству Adenoviridae и предпочтительно представляет собой аденовирус, принадлежащий к роду Mastadenovirus. Это может быть аденовирус человека, а также аденовирус, который инфицирует другие виды, включая без ограничений аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус крупного рогатого скота 3, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус мартышек и аденовирус человекообразных обезьян, например, аденовирус шимпанзе). Предпочтительно аденовирус представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu; в настоящем изобретении при обозначении Ad без указания видов подразумевают аденовирус человека, например, краткое обозначение "Ad5" означает то же самое, что и HAdV5, который представляет собой аденовирус человека серотипа 5) или аденовирус обезьян, такой как аденовирус шимпанзе (ChAd, AdCh или SAdV).

Предпочтительно рекомбинантный аденовирус по настоящему изобретению представляет собой аденовирус, в отношении дикого типа которого сообщалось, что он имеет иную последовательность (отличную от СТАТСТАТ, например, часто встречающуюся последовательность CATCATCA) в 5'-концевой области.

Опубликованные или предполагаемые 8 5'-концевых нуклеотидов различных серотипов аденовируса представлены в табл. I. В US 2009/227000 описан Ad11p, содержащий СТАТСТАТ в 5'-концевой области. Наиболее углубленные исследования были проведены с использованием аденовирусов человека, при этом аденовирусы человека являются предпочтительными в соответствии с определенными аспектами настоящего изобретения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением основан на аденовирусе человека, и не является основанным на аденовирусе человека серотипа 3, 4, 7, 8, 9, 11p, 15, 21, 29, 37 или 53. В предпочтительных вариантах осуществления данный рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе человека серотипа 1, 2, 5, 6, 10, 11a, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 28, 31, 34, 35, 36, 40, 41, 46, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 56 или 57. Более предпочтительно данный рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе человека серотипа 5, 11a, 26, 34, 35, 48, 49 или 50. В соответствии с конкретным предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека одного из серотипов 26, 35, 48, 49 или 50. Преимуществом данных серотипов является низкое доминирова-

ние серотипа и/или низкие титры преобладающих нейтрализующих антител в популяции человека. Наиболее предпочтительными серотипами для рекомбинантного аденовируса являются человеческий серотип 35 или человеческий серотип 26, оба из которых исследованы в клинических испытаниях. Получение векторов rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в Abbink et al., (2007) *Virology* 81(9):4654-63. Иллюстративные геномные последовательности Ad26 указаны в GenBank под номером доступа EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 из WO 2007/104792. Получение векторов rAd35 описано, например, в патенте США № 7270811, в WO 00/70071 и в Vogels et al., (2003) *J Virol* 77(15): 8263-71. Иллюстративные геномные последовательности Ad35 указаны в GenBank под номером доступа AC 000019 и на фиг. 6 в WO 00/70071.

Обычно аденовирусы обезьян также характеризуются низким доминированием серотипа и/или низкими титрами преобладающих нейтрализующих антител в популяции человека, при этом было опубликовано значительное количество работ по использованию векторов на основе аденовируса шимпанзе (например, US6083716; WO 2005/071093; WO 2010/08 6189; WO 2010085984; Farina et al., 2001, *J Virol* 75: 11603-13; Cohen et al., 2002, *J Gen Virol* 83: 151-55; Kobinger et al., 2006, *Virology* 346: 394-401; Tatsis et al., 2007, *Molecular Therapy* 15: 608-17; также см. обзорную публикацию Bangari and Mittal, 2006, *Vaccine* 24: 849-62; и обзорную публикацию Lasaro and Ertl, 2009, *Mol Ther* 17: 1333-39). Следовательно, в других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением основан на аденовирусе обезьян, например, аденовирусе шимпанзе. В определенных вариантах осуществления данный рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе обезьян типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

Известны последовательности большинства выше упомянутых аденовирусов человека и аденовирусов, не являющихся аденовирусами человека, а для других они могут быть получены с использованием стандартных процедур.

Рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением может быть репликативно-компетентный или репликативно-дефицитный.

В определенных вариантах осуществления данный аденовирус является репликативно-дефицитным, например, потому что он содержит делецию в участке E1 генома. Как известно специалисту, в случае делеций существенно важных участков из генома аденовируса функциональные элементы, кодируемые данными участками, должны быть обеспечены в транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, то есть если части или целые участки E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, например, встроены в ее геном или находятся в форме так называемого вспомогательного аденовируса или вспомогательной плазмиды. Аденовирус также может иметь делецию в участке E3, который не является существенным для репликации, и, следовательно, такую делецию не следует восполнять.

Клетка-продуцент (также иногда называемая в данной области техники и в данном документе как "пакующая клетка", или "дополняющая клетка", или "клетка-хозяин"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может быть размножен. Например, размножение векторов на основе рекомбинантного аденовируса осуществляют в клетках-продуцентах, которые восполняют дефициты в аденовирусе. Предпочтительно такие клетки-продуценты имеют в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса и, таким образом, они способны к дополнению рекомбинантных аденовирусов с делецией в участке E1. Можно использовать любую E1-дополняющую клетку-продуцент, например, клетки сетчатки глаза человека, иммортализованные с помощью E1, например, клетки 911 или PER.C6 (смотри патент США № 5994128), E1-трансформированные амниоциты (смотри патент EP № 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (смотри, например, WO 98/39411, патент США № 5891690), GH329:HeLa (Gao et al., 2000, *Human Gene Therapy* 11: 213-219), 293 и т.п. В определенных вариантах осуществления клетками-продуцентами являются, например, клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и т.п.

Для E1-дефицитных аденовирусов, которые не происходят из подгруппы аденовирусов C или E, предпочтительной является замена кодирующей последовательности E4-orf6 в аденовирусе, не относящегося к подгруппе C или E, на E4-orf6 аденовируса из подгруппы C, например, Ad5. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293 или клетки PER.C6 (смотри, например, Havenga et al., 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143; WO 03/104467, включенные в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки).

В альтернативных вариантах осуществления нет необходимости помещать гетерологичный участок E4orf6 (например, из Ad5) в аденовирусный вектор, но вместо этого E1-дефицитный, не относящийся к подгруппе C или E вектор размножают в линии клеток, которые экспрессируют как E1, так и сходный E4orf6, например, в линии клеток 293-ORF6, которая экспрессирует как E1, так и E4orf6 из Ad5 (смотри, например, Brough et al., 1996, *J Virol* 70: 6497-501, в которой описано получение клеток 293-ORF6; Abrahamson et al., 1997, *J Virol* 71: 8946-51 и Nan et al., 2003, *Gene Therapy* 10: 326-36, в каждой из которых описано получение не относящихся к подгруппе C аденовирусных векторов с удаленным E1).

В качестве альтернативы, можно использовать дополняющую клетку, которая экспрессирует E1 из серотипа, подлежащего размножению (смотри, например, WO 00/70071, WO 02/40665).

Для аденовирусов подгруппы В, таких как Ad35, с делецией в участке E1 предпочтительным является сохранение 3'-конца открытой рамки считывания E1B 55K в аденовирусе, например, 166 п.о., расположенных непосредственно выше открытой рамки считывания pIX, или фрагмента, включающего их, как например, фрагмента из 243 п.о., расположенного непосредственно выше стар-кодона pIX (маркированных на 5'-конце сайтом рестрикции Bsu36I в геноме Ad35), так как это повышает стабильность аденовируса, потому что промотор гена pIX частично расположен в данной области (смотри, например, Havenga et al., 2006, J. Gen. Virol. 87: 2135-2143; WO 2004/001032, включенные в данный документ посредством ссылки).

"Гетерологичная нуклеиновая кислота" (также называемая в данном документе "трансгеном") в аденовирусах по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях не присутствует в аденовирусе. Ее вводят в аденовирус с помощью, например, стандартных методов молекулярной биологии. В определенных вариантах осуществления она может кодировать белок, представляющий интерес, или его часть. Например, ее можно клонировать в удаленный участок E1 или E3 аденовирусного вектора. Трансген обычно функционально связывают с последовательностями, управляющими экспрессией. Это можно выполнить, например, путем помещения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансген(ы), под контроль промотора. Можно добавлять дополнительные регуляторные последовательности. Для экспрессии трансгена(ов) можно использовать множество промоторов и они известны специалистам в данной области. Неограничивающим примером подходящего промотора для получения экспрессии в эукариотических клетках является промотор CMV (патент США № 5385839), например, предранний промотор CMV, например, содержащий нуклеотиды от -735 до +95 из энхансера/промотора предраннего гена CMV. Сигнал полиаденилирования, например, сигнал полиА гена бычьего гормона роста (патент США 5122458) может присутствовать позади трансгена(ов).

В определенных вариантах осуществления может быть необходимой экспрессия более одного белка из одного аденовируса, и в таких случаях можно связывать больше кодирующих последовательностей для образования одного транскрипта из одной кассеты экспрессии, или они могут присутствовать в двух отдельных кассетах экспрессии, клонированных в различные части аденовирусного генома.

Идентичность трансгена, пригодного для аденовирусов, содержащих какие-либо трансгены, не является темой настоящего изобретения. Подходящие трансгены хорошо известны специалисту в данной области и, например, могут включать открытые рамки считывания трансгенов, например, открытые рамки считывания, кодирующие полипептиды с терапевтическим эффектом, например, для целей генной терапии, или полипептиды, против которых желателен иммунный ответ, если вектор rAd используют для целей вакцинации. В частности, предпочтительными гетерологичными нуклеиновыми кислотами являются представляющие интерес гены, кодирующие антигенные детерминанты, в отношении которых необходимо повышение иммунного ответа. Как правило, такие антигенные детерминанты также называют антигенами. Любой необходимый антиген может кодироваться аденовирусным вектором. В типичных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением антигены представляют собой пептиды, полипептиды или белки из организмов, которые могут вызывать заболевание или патологическое состояние. Следовательно, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления указанная гетерологичная нуклеиновая кислота, представляющая интерес, кодирует иммуногенную детерминанту. Более предпочтительно указанная иммуногенная детерминанта представляет собой антиген из бактерии, вируса, дрожжей или паразита. Заболевание, вызванное такими организмами, обычно называют "инфекционным заболеванием" (и, таким образом, не ограничивают организмами, которые "инфицируют", но также включают такие, которые попадают в хозяина и вызывают заболевание). Так называемые "аутоантигены", например, опухолевые антигены, также образуют часть существующего уровня техники и могут кодироваться гетерологичными нуклеиновыми кислотами в рекомбинантных аденовирусах в соответствии с настоящим изобретением. Неограничивающими примерами, из которых выбраны антигенные детерминанты (или антигены), являются организмы, вызывающие малярию, как например *Plasmodium falciparum*, организмы, вызывающие туберкулез, например, *Mycobacterium tuberculosis*, дрожжи или вирусы. В других предпочтительных вариантах осуществления антигены из таких вирусов, как флавивирусы (например, вирус лихорадки Западного Нила, вирус гепатита С, вирус японского энцефалита, вирус денге), вирус Эбола, вирус иммунодефицита человека (HIV) и вирус Марбург, можно использовать в композициях в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления указанный антиген представляет собой белок CS или его иммуногенную часть из *P. falciparum* (например, векторы на основе аденовируса, кодирующие CS, смотри, например, Havenga et al., 2006, J. Gen. Virol. 87: 2135-2143; Ophorst et al., 2007, Vaccine 25:1426-36; WO 2004/055187, все из которых включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки). В другом варианте осуществления антигенная детерминанта представляет собой белок из одного антигена или слитый белок из нескольких антигенов из *M. tuberculosis*, такой как белки Ag85A, Ag85B и/или TB10.4, или их иммуногенную часть (части) (о конструировании и получении противотуберкулезных вакцин на основе вирусов смотри, например, WO 2006/053871, включенный в данный документ посредством ссылки). В еще одном варианте осуществления указанная

антигенная детерминанта представляет собой вирусный гликопротеин или его иммуногенную часть, например, GP из филловируса, такого как вирус Эбола или вирус Марбург (например, Sullivan et al., (2003) Nature 424(6949): 681-684; Sullivan, et al., (2006) PLoS Med 3(6): e177; Geisbert et al., (2011) J Virol 85: 4222-4233). В еще одних вариантах осуществления указанная детерминанта получена из белка HIV, такого как gag, pol, env, nef или их вариантов (примеры вакцин против HIV на основе аденовируса, смотри, например, в WO 2009/026183, WO 2010/096561, WO 2006/120034, WO 02/22080, WO 01/02607). В других вариантах осуществления указанная антигенная детерминанта представляет собой белок HA, NA, M или NP или иммуногенную часть любого из них из вируса гриппа (например, Zhou et al., 2010, Mol Ther 18:2182-9; Hu et al., 2011, Virus Res 155: 156-62; обзорная публикация Vemula and Mittal, 2010, Expert Opin Biol Ther 10: 1469-87). В других вариантах осуществления антигенная детерминанта представляет собой белок HA или его иммуногенную часть из вируса кори (например, WO 2004/037294). В других вариантах осуществления антигенная детерминанта представляет собой гликопротеин из вируса бешенства (например, Zhou et al., 2006, Mol Ther 14: 662-672).

Настоящее изобретение дополнительно предлагает способ получения партии частиц рекомбинантного аденовируса, которые имеют по сути все идентичные нуклеотидные последовательности на 5'-концах своих геномов, включающий: а) осуществление этапа молекулярного клонирования для замены встречающихся в природе 5'-концов генома аденовируса измененными 5'-концами, содержащими в качестве концевых нуклеотидов нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ, б) размножение в клетках-хозяевах рекомбинантного аденовируса, содержащего измененные 5'-концы, и с) сбор рекомбинантного аденовируса для получения партии частиц рекомбинантного аденовируса, которые по сути все содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов в своих геномах следующую нуклеотидную последовательность: СТАТСТАТ. В данном предпочтительном аспекте 5'-концы геномов изменены активным образом с помощью методик молекулярного клонирования, которые сами по себе являются хорошо известными и стандартными для специалистов в области молекулярной биологии. Идентификация данной предпочтительной концевой последовательности СТАТСТАТ согласно данному документу делает возможным данный этап. Данный этап является преимущественным в случае, когда какой-либо аденовирус с отличной 5'-концевой последовательностью (то есть не являющейся СТАТСТАТ) используют в качестве исходного материала или основы для получения (партии или композиции) рекомбинантного аденовируса в соответствии с настоящим изобретением, например, для любого из предпочтительных серотипов по настоящему изобретению, как указано в данном документе. Преимуществом является контроль и достоверность того, что изначально требуемая последовательность СТАТСТАТ присутствует во всех геномах посевного аденовируса для этапа б), и с учетом стабильности данной последовательности, как указано в данном документе, полученные в результате партии аденовируса на этапе с) будут содержать аденовирусные частицы, которые по сути все имеют одну и ту же требуемую 5'-концевую последовательность.

Однако в качестве альтернативы способу молекулярного клонирования теперь можно также использовать естественно индуцированную изменчивость и выбирать аденовирус с измененной последовательностью СТАТСТАТ на его конце для получения требуемого исходного материала со стабильными 5'-концами для размножения в партиях аденовируса в любом требуемом масштабе. Таким образом, настоящее изобретение также предлагает способ получения партии частиц рекомбинантного аденовируса, которые имеют по сути все идентичные нуклеотидные последовательности на 5'-концах своих геномов, включающий: а) осуществление очистки аденовируса методом бляшкообразования, при этом рекомбинантный аденовирус не является аденовирусом человека серотипа 3, 4, 7, 8, 9, 11p, 15, 21, 29, 37 или 53, или его рекомбинантной формой, для выделения аденовируса или рекомбинантного аденовируса из одиночной бляшки, где указанный аденовирус или рекомбинантный аденовирус содержит в качестве 5'-концевых нуклеотидов в своем геноме следующую нуклеотидную последовательность: СТАТСТАТ, б) размножение в клетках-хозяевах рекомбинантного аденовируса, полученного из одиночной бляшки на этапе а), и с) сбор данного рекомбинантного аденовируса для получения партий частиц рекомбинантного аденовируса, которые по сути все содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов в своих геномах нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ. В данном контексте активный этап представляет собой получение одиночной бляшки (рекомбинантного) аденовируса и тестирование/подтверждение того, что его геном содержит в своей 5'-концевой области необходимую последовательность СТАТСТАТ. Специалист в данной области примет во внимание, что этап а) данного варианта осуществления можно выполнять либо уже с рекомбинантным аденовирусом, либо по прежнему с изолятом дикого типа аденовируса, где в последнем случае перед этапом б) этап проводят для получения рекомбинантного аденовируса (например, путем клонирования для введения трансгена в геном). Этап очистки методом бляшкообразования для того, чтобы удостовериться, что исходный материал для дальнейшей работы является однородным и получен из одиночного изолята, может быть выполнен с использованием исключительно стандартных методик для специалиста в области манипуляции с аденовирусами. Активный отбор (рекомбинантного) аденовируса, который содержит в качестве 5'-концевых нуклеотидов в своем геноме нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ, не был описан прежде и до настоящего изобретения это не имело бы никакого смысла. Напротив, до настоящего изобретения выявление данной последовательности рассматривали бы как отклонение и бляшку уничтожали бы как имеющую генетическое изменение. Преимуществом

вом настоящего изобретения является отбор такого (рекомбинантного) аденовируса в качестве исходного материала для обеспечения генетической стабильности, результатом чего являются партии рекомбинантного аденовируса, которые по сути все содержат одинаковые требуемые 5'-концевые нуклеотиды в своих геномах. Рекомбинантный аденовирус по настоящему изобретению характеризуется потенциально улучшенными характеристиками репликации.

Клетка-хозяин в соответствии со способами настоящего изобретения может представлять собой пакующую клетку, которая может восполнять дефициты в рекомбинантном аденовирусном геноме, например, E1. Этапы b) и c) способов настоящего изобретения представляют собой стандартные и общепринятые этапы в получении партий рекомбинантного аденовируса, хорошо известные специалисту.

В определенных вариантах осуществления этап b) данных способов осуществляют в биореакторе, который может иметь объем от приблизительно 1 л до приблизительно 20000 л. Это позволяет получать достаточные количества требуемых композиций аденовируса для применения в промышленном масштабе. Используемое в настоящем раскрытии для числовых величин выражение "приблизительно" означает величину $\pm 10\%$. В определенных вариантах осуществления рабочий объем составляет от 10 л до 10000 л, например, от 20 л до 2000 л. Рабочий объем представляет собой эффективный объем культуры в биореакторе. Объем биореактора может выбирать специалист в зависимости от фактической потребности. Настоящее изобретение обеспечивает то, что в конечном продукте по сути все частицы аденовируса будут иметь одинаковые концевые области в получаемых таким образом партиях, то есть будут генетически однородными, что является необходимым для фармацевтического продукта.

Манипуляции с суспензионными культурами наиболее крупного масштаба проводят в периодическом или подпитываемом процессе, поскольку они являются наиболее простыми для управления и увеличения масштаба. В настоящее время более распространенными становятся непрерывные процессы на основе принципов перфузии, и они также являются пригодными (смотри, например, WO 2010/060719 и WO 2011/098592, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки, в которых описаны подходящие способы получения и очистки больших количеств рекомбинантных аденовирусов).

Клетки-продуценты культивируют для увеличения числа клеток и вирусов и/или титров вирусов. Культивирование клетки выполняют для обеспечения для нее возможности метаболизма, и/или роста, и/или деления, и/или продуцирования вируса, представляющего интерес в соответствии с настоящим изобретением. Этого можно достичь с помощью способов по сути хорошо известных специалистам в данной области, и включает без ограничений обеспечение питательных веществ для клетки, например, в соответствующих питательных средах. Подходящие питательные среды хорошо известны специалистам в данной области и могут, как правило, быть получены в больших количествах из коммерческих источников или произведены по заказу согласно стандартным протоколам. Культивирование может быть выполнено, например, в чашках, роллерных флаконах или в биореакторах, с использованием периодических, подпитываемых, непрерывных систем и т.п. Известны подходящие условия для культивирования клеток (смотри, например, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), и R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).

Как правило, аденовирус подвергают воздействию соответствующей клетки-продуцента в культуре, обеспечивая возможность поглощения вируса. Обычно оптимальное перемешивание составляет от приблизительно 50 до 300 об./мин, как правило, приблизительно 100-200, например, приблизительно 150, как правило, DO составляет 20-60%, например, 40%, оптимальный pH составляет от 6,7 до 7,7, оптимальная температура составляет от 30 до 39°C, например, 34-37°C, оптимальная MOI составляет от 5 до 1000, например, приблизительно 50-300. Как правило, аденовирус инфицирует клетки-продуценты спонтанно, и приведение в контакт клеток-продуцентов с частицами гAd является достаточным для инфекции клеток. Обычно посевной материал аденовируса добавляют в культуру для возникновения инфекции, и в дальнейшем аденовирус размножается в клетках-продуцентах. Все это является обычным для специалиста в данной области. Такой посевной материал аденовируса в соответствии с настоящим изобретением содержит частицы рекомбинантного аденовируса, где геномы по сути всех частиц аденовируса в указанном посевном материале содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ.

После инфицирования аденовирусом вирус реплицируется внутри клетки и таким образом амплифицируется - процесс, называемый в данном документе размножением аденовируса. Аденовирусная инфекция в итоге приводит к лизису инфицированной клетки. Следовательно, литические характеристики аденовируса обеспечивают возможность получения вируса двумя различными способами. Первый способ представляет собой сбор вируса до лизиса клетки, используя внешние факторы для лизирования клетки. Второй способ представляет собой сбор вирусного супернатанта (практически) полным лизисом клетки продуцируемым вирусом (смотри, например, патент США № 6485958, в котором описан сбор аденовируса без лизиса клеток-хозяев с помощью внешнего фактора). Предпочтительным является использование внешних факторов для активного лизирования клеток для сбора аденовируса. Известны способы, которые можно использовать для активного лизиса клетки, и их рассматривали, например, в WO 98/22588, р. 28-35. Применимыми в этом отношении способами являются, например, замораживание-размораживание, разрушение клеток абразивными материалами, гипертонический и/или гипотони-

ческий лизис, жидкий сдвиг, разрушение ультразвуком, экструзия высокого давления, лизис детергентом, комбинации вышеперечисленных и т.п. В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетки лизируют с использованием по меньшей мере одного детергента. Преимущество использования детергента для лизиса состоит в том, что это является простым методом и что его легко масштабировать.

Детергенты, которые можно использовать, и способ их применения, в целом, известны специалисту в данной области. Например, несколько примеров рассматриваются в WO 98/22588, р. 29-33. Детергенты могут включать анионные, катионные, цвиттерионные и неионные детергенты. Концентрация детергента может варьировать, например, в диапазоне приблизительно 0,1-5% (вес./вес.). В одном варианте осуществления применяемым детергентом является Triton X-100.

Нуклеазы можно применять для удаления загрязняющих, то есть главным образом из клетки-производителя, нуклеиновых кислот. Иллюстративные нуклеазы, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают Benzonase®, Pulmozyme® или любую другую ДНКазу и/или РНКазу, широко используемую в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой Benzonase®, которая быстро гидролизует нуклеиновые кислоты путем гидролиза внутренних фосфодиэфирных связей между определенными нуклеотидами, уменьшая тем самым вязкость клеточного лизата. Benzonase® коммерчески доступна от Merck KGaA (код W214950). Концентрация, при которой используют нуклеазу, предпочтительно находится в диапазоне 1-100 ед./мл. В качестве альтернативы или дополнительно к обработке нуклеазой также возможно селективно осаждают ДНК клетки-хозяина из препаратов аденовируса во время очистки аденовируса с применением селективных осаждающих средств, таких как домифена бромид (смотри, например, US 7326555; Goerke et al., 2005, *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 91: 12-21; WO 2011/045378; WO 2011/045381).

Способы сбора аденовируса из культур клеток-производителей подробно описаны в WO 2005/080556.

В определенных вариантах осуществления собранный аденовирус дополнительно очищают. Очистку аденовируса можно осуществлять в несколько этапов, включая осветление, ультрафильтрацию, диафильтрацию или разделение с помощью хроматографии, как описано, например, в WO 05/080556, включенный в данный документ посредством ссылки. Осветление можно осуществлять с помощью этапа фильтрации, удаляя клеточный детрит и другие примеси из клеточного лизата. Ультрафильтрацию используют для концентрирования раствора вируса. Диафильтрация или замена буфера с применением ультрафильтров представляет собой способ удаления или замены солей, сахаров и т.п. Специалист в данной области знает, как подобрать оптимальные условия для каждого этапа очистки. Также в WO 98/22588, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, описаны способы получения и очистки аденовирусных векторов. Способы включают выращивание клеток-хозяев, инфицирование клеток-хозяев аденовирусами, сбор и лизирование клеток-хозяев, концентрирование неочищенного лизата, замену буфера в неочищенном лизате, обработку лизата нуклеазой и дополнительную очистку вируса с использованием хроматографии.

Предпочтительно при очистке используется по меньшей мере один этап хроматографии, как, например, рассматривается в WO 98/22588, р. 61-70. Описано много способов дополнительной очистки аденовирусов, где в способ включены этапы хроматографии. Специалист в данной области будет осведомлен о данных способах и может изменять точный способ применения хроматографических этапов для оптимизации процесса. Например, возможна очистка аденовирусов с помощью этапов анионообменной хроматографии, смотри, например, WO 2005/080556. Было описано много других способов очистки аденовируса, и они доступны для специалиста. Дополнительные способы получения и очистки аденовирусов раскрыты, например, в WO 00/32754, WO 04/020971, US 5837520, US 6261823 и WO 2006/108707, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

Для введения людям в настоящем изобретении могут быть использованы фармацевтические композиции, содержащие гAd и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В настоящем контексте выражение "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или наполнитель в применяемых дозировках или концентрациях не вызовет каких-либо нежелательных или неблагоприятных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и наполнители хорошо известны в данной области (смотри Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Очищенный гAd предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно применение лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают с помощью стерильной фильтрации или с помощью других способов, известных как таковые в данной области техники. Затем растворы лиофилизируют или разливают по контейнерам для лекарственных форм. pH раствора обычно находится в диапазоне от pH 3,0 до 9,5, например, от pH 5,0 до 7,5. Как правило, гAd находится в растворе с подходящим буфером, при этом раствор гAd может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления гAd можно составлять в виде инъекционного препарата. Данные составы, содержащие эффективные количества гAd, являются либо стерильными жидкими растворами, жидкими суспензиями,

либо лиофилизированными вариантами и необязательно содержат стабилизаторы и наполнители. Также аденовирусная вакцина может быть в виде аэрозоля для интраназального введения (смотри, например, WO 2009/117134).

Например, аденовирус можно хранить в буфере, который также используют для Adenovirus World Standard (Hoganson et al., Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing March 2002, p. 43-48): 20 mM Трис, pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерин. Другой используемый состав буфера, который подходит для введения людям, представляет собой 20 mM Трис, 2 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, сахароза 10% вес/объем, полисорбат-80 0,02% вес/объем. Безусловно можно использовать множество других буферов, при этом некоторые примеры подходящих составов для хранения и для фармацевтического введения препаратов очищенного (адено)вируса можно, например, найти в Европейском патенте № 0853660, патенте США № 6225289 и в международных заявках на патент WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592, WO 03/061708.

В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая аденовирус, дополнительно содержит один или несколько адьювантов. Адьюванты, известные в данной области, для дополнительно-го повышения иммунного ответа на применяемую антигенную детерминанту, и фармацевтические композиции, содержащие аденовирус и подходящие адьюванты, раскрыты, например, в WO 2007/110409, включенной в данный документ посредством ссылки. Выражения "адьювант" и "иммуностимулятор" используют в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адьювант используют для усиления иммунного ответа на аденовирусные векторы по настоящему изобретению. Примеры подходящих адьювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции на основе масляной эмульсии (или композиции на основе масла в воде), в том числе сквален в воде, например, MF59 (смотри, например, WO 90/14837); составы на основе сапонина, например, QS21, и комплексы с иммуностимулирующими свойствами (ISCOM) (смотри, например, US 5057540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); бактериальные или микробные производные, примерами которых являются монофосфорил липид А (MPL), 3-О-деацетилованный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолабильный энтеротоксин LT из *E. coli*, холерный токсин СТ и т.п. Также возможно использование адьюванта, кодируемого вектором, например, путем использования гетерологичной нуклеиновой кислоты, которая кодирует слияние домена олигомеризации C₄-связывающего белка (C4bp) с антигеном, представляющим интерес (например, Solabomi et al., 2008, Infect Immun 76: 3817-23). В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат в качестве адьюванта алюминий, например, в форме гидроксида алюминия, фосфата алюминия, фосфата алюминия-калия или их комбинации в концентрациях 0,05-5 мг, например, 0,075-1,0 мг алюминия на дозу.

В других вариантах осуществления композиции не содержат адьюванты.

Композиции на основе аденовирусов можно вводить субъекту, например, субъекту-человеку. Как известно квалифицированному практику общая доза аденовируса, обеспечиваемая субъекту при однократном введении, может варьировать, и, как правило, составляет от 1×10^7 вирусных частиц (vp) до 1×10^{12} vp, предпочтительно от 1×10^8 vp до 1×10^{11} vp, например, от 3×10^8 до 5×10^{10} vp, например, от 10^9 до 3×10^{10} vp.

Введение композиций аденовирусов можно осуществлять с использованием стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как инъекция, например, внутривенная, внутримышечная и т.д., или подкожное или чрескожное введение или введение через слизистые, например, интраназальное, пероральное и т.п. В одном варианте осуществления композицию вводят путем внутримышечной инъекции, например, в дельтовидную мышцу руки или латеральную широкую мышцу бедра. Специалисту известны различные возможности введения композиции, например вакцины, для индуцирования иммунного ответа на антиген(ы) в вакцине.

Субъект, как используется в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, к примеру, грызуна, например, мышшь, или примата, не являющегося человеком, или человека. Предпочтительно субъект представляет собой субъекта-человека.

Также возможным является обеспечение одного или нескольких бустер-введений одной или нескольких аденовирусных вакцин. При бустерной вакцинации, как правило, такую бустерную вакцину будут вводить одному и тому же субъекту в промежутке от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев после введения композиции субъекту впервые (которое в данном случае называется "первичной вакцинацией"). В альтернативных бустерных схемах введения также возможным является введение различных векторов, например, одного или нескольких аденовирусов различных серотипов, или других векторов, таких как MVA, или ДНК, или белка субъекту в качестве первичной или бустерной вакцинации.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами. Данные примеры не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом. Они служат лишь для пояснения настоящего изобретения.

Примеры Способы

Плазмиды.

Альтернативную последовательность ITR вводили в левый ITR путем клонирования в pAdapt и в правый ITR путем клонирования в плазмиды pBt для Ad35 и Ad5, соответственно (смотри, например, Havenga M. et al., 2006, *J. Gen. Virol.* 87: 2135-2143; Havenga M. et al., 2001, *J. Virol.* 75: 3335-3342). Для введения альтернативной последовательности ITR в левый ITR проводили ПЦР с перекрывающимися праймерами с использованием прямого праймера, содержащего сайт *ScaI* (GTGACTGGTGAGTACTC [SEQ ID NO: 1]), обратного праймера, содержащего сайт *AvrII* (GACCACCTAGGCTGAC [SEQ ID NO: 2]), и перекрывающихся прямого и обратного праймеров, несущих альтернативную последовательность ITR (альт. ITR прям. 1: TTAATTAATCGATCTCTATATAATATACCTTATAG [SEQ ID NO: 3], алт. ITR прям. 2: GATCTATCTATATAATATACCTTATAGATGGAATGG [SEQ ID NO: 4], алт. ITR обр.: ATTATATAGATAGATCGATTAATTAATTCGAACCC [SEQ ID NO: 5]). В данной ПЦР использовали два частично перекрывающихся прямых праймера ITR для получения одного из фрагментов с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами для повышения эффективности ПЦР в участке матрицы, особенно богатым АТ. Продукт ПЦР с перекрывающимися праймерами сперва субклонировали в вектор pТоро для обеспечения субклонирования, а затем вставляли в плазмиду pAdapt35 по сайтам для *AvrII* и *ScaI* с указанными трансгенами.

Для введения альтернативной последовательности ITR в правый ITR проводили ПЦР с перекрывающимися праймерами, используя прямой праймер, содержащий сайт *NdeI*, и обратный праймер, содержащий сайт *NruI*, а также перекрывающиеся прямой и обратный праймеры, несущие альтернативную последовательность ITR, с использованием той же методологии ПЦР с перекрывающимися праймерами, как описано для левого ITR. Далее продукт ПЦР с перекрывающимися праймерами субклонировали в pТоро и в дальнейшем встраивали в плазмиду pBR.Ad35.PR.dE3 *orf6/7*, используя *NdeI* и *NruI*.

Для создания векторов Ad5 с альтернативными ITR использовали ту же стратегию, которая описана выше.

Куль тура клеток.

Клетки PER.C6 (Fallaux et al., 1998) поддерживали на модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), обогащенной 10 мМ $MgCl_2$. Клетки A549, HEK293, Hep2, HeLa и MRC5 получали из ATCC и поддерживали в DMEM с 10% FBS.

Получение аденовируса, инфицирования и пересев.

Если не указано иное, то все вирусы получали в PER.C6 путем одиночной или двойной гомологичной рекомбинации и продуцировали, как описано ранее (Havenga et al., 2006). Вкратце, плазмиды трансфицировали в PER.C6, используя липофектамин в соответствии с протоколами производителя (Life Technologies). Клетки собирали через один день после полного CPE, подвергали замораживанию-размораживанию, центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об./мин и хранили при -20°C. От 3 до 5 мл неочищенного лизата использовали для инокуляции трехуровневых матрасов 4×T175, содержащих слои клеток PER.C6 с конfluenceностью 70%. Вирус очищали, применяя способ двухэтапной очистки с использованием CsCl. В заключение вирус хранили в аликвотах при -85°C.

Для исследования изменения исходной последовательности на альтернативную последовательность ITR различные вирусы последовательно пассировали, используя либо неочищенный вирусный материал после очистки методом бляшкообразования, либо партии очищенного вируса, как описано выше. Для этой цели инфицировали клетки соответствующим вирусным вектором. Через день после полного CPE клетки и супернатант собирали и замораживали. Вирусные частицы извлекали из клетки путем размораживания и данный неочищенный вирусный материал использовали для инфицирования новых клеток.

Выделение вирусной ДНК из инфицированных клеток:

Выделения ДНК для ITR-специфичной ПЦР выполняли следующим образом. Вирусные частицы извлекали из неочищенного вирусного материала с помощью повторных циклов замораживания-размораживания. После этого ДНК клетки-хозяина удаляли путем обработки ДНКазой I. Вирусные частицы разрушали путем инкубации с 10% SDS и обрабатывали протеиназой K. Далее вирусную ДНК очищали, применяя набор GeneClean Spin Kit (MP Biochemicals), и использовали для анализа ПЦР.

Неочищенный лизат использовали для выделения ДНК для анализа последовательности ITR. Для этой цели ДНК выделяли путем выделения с использованием PEG из 20 мл неочищенного клеточного лизата, лизированного последовательными циклами замораживания-размораживания, и обрабатывали ДНКазой I (0,01 мг/мл Roche) и РНКазой T1 (10 ед./мл Roche) с последующей инактивацией с помощью NaCl (1 М). Вирусные частицы осаждали, используя 10% PEG 6000 (BDH iochemical) на льду в течение 1 ч. с последующим этапом центрифугирования при 9000×g, и ресуспендировали в 1 мл буфера SM (0,1 М NaCl, 8 мМ $MgSO_4$, 50 мМ Tris HCl, pH 7,5, 0,002% желатин). Разрушали вирусные капсидные белки, используя 10% SDS и обработку протеиназой K, а ДНК экстрагировали путем фенол-хлороформного осаждения.

Полноразмерную ДНК расщепляли с помощью *EcoRI* (Ad26), *SphI* (Ad48, Ad5), *AgeI* (Ad49, Ad11), *NheI* (Ad50) и в итоге секвенировали в Baseclear, Лейден.

ITR-специфичная ПЦР.

Поскольку участки ITR богаты АТ, то праймеры на основе запертой нуклеиновой кислоты (LNA) использовали для обеспечения достаточного присоединения праймера к матрице. Праймеры приобретали у Eurogentech. Использовали следующие праймеры. Строчная буква обозначает LNA-нуклеотиды. ori.ITR: CatcaTcaATAATATACC [SEQ ID NO: 6], Ad35 алт. ITR: CtatcTatATAATATACC [SEQ ID NO: 7], Ad35 лев. ITR обр.: СТАAGTAGTTCCGTGAGAAAAG [SEQ ID NO: 8]. Ad35 правый ITR прямой: GGTACGTACATCCCATTA [SEQ ID NO: 9], Ad5 левый ITR обр.: САСТТТТGCCACATCCGTC [SEQ ID NO: 10], Ad5 правый ITR прям.: CCCACGTTACGTCACCTC [SEQ ID NO: 11]. Продукты ПЦР анализировали в агарозном геле.

Анализ кинетики репликации с помощью количественной ПЦР.

Кинетику репликации анализировали путем инфицирования клеток 293 и PER.C6, используя 1000 VP/клетку, в течение 3 часов, а затем промывки. Присутствие вирусных частиц в клетках и супернатанте анализировали в указанные моменты времени после инфицирования VP с помощью количественной ПЦР. С этой целью инфицированные клетки лизировали, используя 0,5% Triton X-100 (Sigma), инкубировали при -80 градусах в течение 1 ч и размораживали.

Выполняли количественную ПЦР, специфичную к промотору CMV, присутствующему во всех используемых аденовирусных векторах, с применением мастермикса для экспрессии генов (Applied Biosystems) в соответствии с рекомендациями производителя. Последовательности комбинации праймер/зонд следующие: CMV прям.: TGGGCGGTAGGCGTGTA [SEQ ID NO: 12], CMV обр.: CGATCTGACGGTTCACATAACG [SEQ ID NO: 13], зонд 5'-VIC-TGGGAGGTCTATATAAGC-MGB-NFQ-3' [SEQ ID NO: 14], приобрели у Applied Biosystems. Для определения количества вирусных частиц в отдельных образцах строили стандартную кривую.

Выравнивания последовательностей.

Последовательности ITR аденовируса получали с помощью поиска с использованием BLAST. Выравнивание создавали с использованием программного обеспечения CLC. Основой для выравниваний являлись опубликованные последовательности. Однако для некоторых опубликованных последовательностей ITR не были определены секвенированы. Вместо этого, исходили из консервативности среди подтипов, что может привести к доминированию консервативной последовательности CATCATCA. В случае публикации нескольких последовательностей для аденовируса одного серотипа, их включали лишь в том случае, если они отличались друг от друга по 8 конечным нуклеотидам.

Пример 1. Выявление альтернативной последовательности ITR при продуцировании вакцинного вектора Ad35 в клетках PER. C6.

Для получения вакцинного вектора Ad35, экспрессирующего антигена Mycobacterium tuberculosis Ag85A, Ag85B и антигена TB10.4, как описано ранее (WO 2006/053871; Radosevic et al., 2007, Infect. Immun. 75: 4105-4115), клетки PER.C6 трансфицировали линейными плазмидами, получая вирус Ad35.TBS, способный к репликации в клетках PER.C6.

До продуцирования две последовательности очистки методом бляшкообразования обеспечивали получение посевного вируса из одиночного генетически стабильного клона. Полученный вирус характеризовали путем идентификации в ПЦР и вестерн-блоттинге на различных этапах способа получения и полностью секвенировали перед использованием в качестве посевного вируса для крупномасштабного производства.

Геномная последовательность была стабильной и, таким образом, идентичной геному, кодируемому плазмидами, спасение которых осуществляли, за исключением 8 конечных нуклеотидов в правом и левом ITR. Последовательность CATCATCA, кодируемая плазмидой, в дальнейшем называемая исходной последовательностью ITR, изменялась на последовательность СТАТСТАТ, называемую альтернативной последовательностью ITR, что в результате приводило к 6 нуклеотидным заменам по сравнению с плазмидной последовательностью. Данный результат был неожиданным, поскольку аденовирусные геномы считаются высоко стабильными, что является одной из причин возможности их применения в качестве вакцинных векторов.

Для исследования несоответствия в концевой последовательности ITR дополнительно секвенировали ITR на различных этапах получения вакцинного вектора. В данном анализе обнаружили, что исходная последовательность ITR по-прежнему присутствовала в пятых пассажах после очистки методом бляшкообразования (VPN 5). Однако также выявили последовательность с субпиками, указывающими на смешанную последовательность в пассаже номер 5 различными способами получения. За исключением субпиков в пределах 8 конечных нуклеотидов, в остальной последовательности не были обнаружены какие-либо несоответствия. В VPN 6 последовательность являлась смешанной, вероятно состоящей из приблизительно той же части исходной последовательности и альтернативной последовательности, становясь четко различимой альтернативной последовательностью в VPN 7.

Пример 2. Неоднородность ITR наблюдается в различных векторах Ad35, а также в вирусе дикого типа.

Для рассмотрения, является ли наблюдаемый эффект незначительным явлением, и для оценки частоты изменения исходной последовательности CATCATCA на альтернативную СТАТСТАТ ITR проана-

лизировали четыре бляшки, происходящие из одного и того же вируса, спасение которого осуществляли. В размноженных вирусах из всех бляшек при последовательном пассировании последовательность изменялась на альтернативную последовательность ITR.

Кроме того, альтернативные ITR наблюдали при пассировании векторов на основе Ad35, экспрессирующих различные трансгены и независимых от частичной делеции промотора pIX (табл. II).

Кроме того, обнаруживали смешанные последовательности не только в векторах на основе Ad35, но также в вирусах дикого типа Ad35, что позволяет исключить векторный артефакт.

Пример 3. Альтернативная последовательность ITR стабильна в Ad35.TBS после 10 пассажей вируса.

Для рассмотрения, является ли изменение на альтернативную последовательность ITR стабильным после нескольких пассажей вируса, сконструировали Ad35.TBS, несущий либо исходные последовательности ITR, называемые Ad35.TBS.ori ITR, либо Ad35.TBS.alt ITR. Данные вирусы пассировали на клетках PER.C6 и последовательность из 8 концевых нуклеотидов ITR контролировали с помощью анализа ПЦР каждого номера пассажа вируса. Для того, чтобы дифференцировать исходную последовательность от альтернативной, использовали различные наборы праймеров для ПЦР, которые специфично амплифицируют либо исходную, либо альтернативную последовательность ITR. В анализе каждого пассажа вируса выявляли снижение роста вируса с исходной последовательностью вируса в VPN3-VPN6 и появление альтернативной последовательности в вирусе в VPN6 при пассировании Ad35.TBS.ori ITR (фиг. 1A). Альтернативная последовательность сохранялась после 4 пассажей (фиг. 1A). При пассировании искусственно созданного Ad35.TBS.alt в ПЦР выявляли только альтернативную последовательность на протяжении 10 пассажей вируса (фиг. 1B), что исключало реверсивное изменение на исходную последовательность или общую нестабильность в пределах данной части генома.

Кроме того, смешивание векторов Ad35 с оригинальной или альтернативной последовательностями ITR, которые в остальном являлись идентичными, также приводило к существенному повышению роста вируса с альтернативной последовательностью ITR, что указывало на ростовые преимущества вируса с альтернативной последовательностью ITR в сравнении с вирусом с исходной последовательностью ITR.

Поскольку выявляли изменение исходной последовательности ITR на альтернативную последовательность ITR в Ad35, векторе группы B, мы дополнительно проанализировали Ad5.empty.ori ITR и Ad35.empty.alt ITR, вектор группы C, несущий либо исходную, либо альтернативную последовательности ITR. В противоположность результатам с вектором Ad35, Ad5 не демонстрировал изменение в последовательности ITR, но сохранял исходные ITR в течение 10 пассажей вируса (фиг. 1C) (тем не менее, смотри ниже пример 8, демонстрирующий, что альтернативную последовательность также обнаруживали в Ad5 при дальнейшем пассировании). Более того, искусственно созданный Ad5, несущий альтернативные ITR, оставался стабильным на протяжении 10 пассажей вируса, и в нем не происходило реверсивное изменение на исходную последовательность ITR (фиг. 1D).

Пример 4. Ad35, несущий альтернативную последовательность ITR, индуцирует CPE в ранние сроки после инфекции, в отличие от Ad35. ori ITR.

Поскольку наблюдали значительное увеличение количества вирусного генома с альтернативными ITR, предположили, что вирусы с альтернативными ITR должны иметь преимущество в репликации над таковыми с исходными ITR для Ad35. Для того, чтобы это проверить использовали вирусы Ad35, несущие либо исходные, либо альтернативные последовательности ITR, и анализировали их кинетику роста. Поскольку CPE, индуцированный аденовирусной инфекцией в E1-дополняющей линии клеток, представляет собой хороший показатель скорости репликации, сперва инфицировали клетки 293 и наблюдали цитопатогенный эффект через 24 ч., 48 ч., 72 ч. и 96 ч. после инфекции (hpi) при MOI 100 VP/клетку и 1000 VP/клетку. Через 24 ч после инфекции CPE не наблюдали как для 100, так и для 1000 VP/клетку. Однако, через 48 hpi наблюдали прогрессирующий CPE для Ad35.dE1.alt ITR как при 100, так и при 1000 VP/клетку с развитием полного CPE через 96 hpi. Для сравнения для Ad35.dE1.ori ITR наблюдали лишь ограниченный CPE в данные сроки после инфекции.

Пример 5. Альтернативная последовательность ITR наделяет преимуществом репликации генома.

Для количественного определения предполагаемого изменения кинетики репликации использовали анализ количественная ПЦР для измерения репликации генома в различные моменты времени после инфекции. Более конкретно, клетки 293 инфицировали при 1000 VP/клетку, лизировали и анализировали с помощью количественной ПЦР, используя анализ TaqMan для выявления промотора CMV, присутствующего в вирусном векторе. Как показано на фиг. 2, хотя Ad35.ori ITR и Ad35.alt ITR росли до одинакового титра приблизительно 10^{10} VP/мл, в самый последний момент времени измерения (90 hpi) у Ad35.ori ITR наблюдали задержку роста. В ранние моменты времени после инфекции для Ad35.alt ITR наблюдалась крутая кривая амплификации генома с достижением фазы плато раньше, чем Ad35.ori ITR (фиг. 2A). В противоположность этому, кинетика репликации для Ad5 не отличалась у вирусов, несущих альтернативные или исходные ITR (фиг. 2B).

Данное преимущество репликации генома, наблюдаемое для Ad35.alt ITR, но не для Ad5.alt ITR, подтверждали на клетках PER.C6 (фиг. 2C-D), в которых исходно наблюдали значительный рост вируса с альтернативной версией генома.

Пример 6. Альтернативная последовательность ITR присутствует в опубликованных последовательностях аденовируса человека.

Проводили анализ в отношении того, присутствовала ли альтернативная последовательность ITR в опубликованных последовательностях аденовируса. Кроме того, проводили выравнивание нуклеотидов 1-8 опубликованных ITR человека и ITR, не являющихся ITR человека. Аденовирусы человека преимущественно содержат исходную последовательность CATCATCA, и впоследствии их классифицировали как "консервативные последовательности аденовируса человека" (табл. I).

Кроме того, последовательности, отличающиеся от CATCATCA по одному - шести нуклеотидам, идентифицировали и назвали "вариабельными последовательностями аденовируса человека". Доминирующей последовательностью среди "вариабельных последовательностей" являлась альтернативная последовательность СТАТСТАТ, которую мы также идентифицировали путем пассирования векторов, полученных на основе Ad35. Выравнивание последовательностей, не являющихся человеческими последовательностями (табл. I), показало, что CATCATCA является наиболее часто встречающейся последовательностью. Помимо этого обнаружили альтернативные последовательности, то есть ранее идентифицированную альтернативную последовательность GATGATGT, которая обнаруживается у аденовирусов птиц. Большинство опубликованных последовательностей ITR соответствуют модели репликации по de Jong (de Jong et al., 2003, *Curr Top Microbiol Immunol* 272: 187-211; King & van der Vliet, 1994, *EMBO J* 13: 5786-5792) с малыми прямым повтором из двух, трех или четырех нуклеотидов, который требуется для механизма обратного прыжка во время инициации репликации.

Следует отметить, что в табл. I показаны опубликованные последовательности ITR, которые могут представлять собой необъективное представление встречающихся в природе последовательностей ITR. В ряде случаев концевые нуклеотиды из ITR не были секвенированы, а были просто предположительно отнесены к CATCATCA. Кроме того, рост аденовирусов из диагностических мазков перед секвенированием является общепринятым, что включает несколько циклов репликации, что в результате может привести к нуклеотидным заменам. Тем не менее, следует отметить, что исходную последовательность CATCATCA по-прежнему выявляют в природе после длительного периода коэволюции вируса и хозяина, и, следовательно, альтернативная последовательность СТАТСТАТ может быть более предпочтительна в культуре клеток, чем в природе.

Пример 7. Повторное пассирование на различных линиях клеток приводит к изменению в последовательности ITR.

Для исключения того, что наблюдаемое изменение исходных ITR на альтернативные представляет собой явление, ограничивающееся E1-дополняющей линией клеток-производителей, вирус Ad35.wt, содержащий исходную последовательность CATCATCA ITR, пассировали в различных типах клеток. Следовательно, осуществляли спасение Ad35wt с использованием плазмид, содержащих полный геном Ad35 дикого типа, в клетках A549, HEK293, PER.C6, Hep2, HeLa и MRC5. Выбирали специфичные линии клеток для представления широко спектра типов клеток, включая линии клеток, полученные из различных тканей, карциномного и некарциномного происхождения, эпителиальные и фибробластные линии клеток и различные плоидности (табл. III).

Результаты в табл. III показывают, что изменение на альтернативные ITR наблюдали в VPN 10 в отношении вспомогательной линии клеток HEK293 и клеток PER.C6, но изменение или смешанный фенотип также наблюдали в отношении других тестируемых линий клеток, хотя и при более позднем номере пассажа.

Пример 8. Длительное пассирование индуцирует неоднородность ITR или полное изменение на альтернативную последовательность ITR у большинства тестируемых векторов на основе Adenovirus.

Исследовали общность изменения на альтернативную последовательность СТАТСТАТ у аденовирусных векторов на основе различных серотипов. При этом аденовирусные векторы на основе Ad26, Ad48, Ad49, Ad11(a), Ad50 и Ad5 пассировали на клетках PER.C6. После очистки методом бляшкообразования вирусные векторы пассировали до VPN 15 и анализировали путем секвенирования в VPN 10 и VPN 15. Для вектора на основе каждого серотипа учитывали два различных трансгена для того, чтобы дополнительно исключить влияние разных трансгенов.

Результаты данной серии экспериментов показаны в таблице IV. Неожиданно обнаружили, что во всех тестируемых векторах, за исключением Ad48, происходит изменение на альтернативную последовательность ITR, или у них наблюдается смешанный фенотип, что указывает на то, что они будут трансформироваться в более позднем номере пассажа вируса. В соответствии с тем, что ранее наблюдали в отношении Ad5, исходная последовательность ITR сохранялась в VPN 10, однако начинала смешиваться в VPN 15. В то же время векторы, полученные на основе Ad48, были единственными сохранившими исходную последовательность ITR до VPN 15 включительно.

Тем не менее, для предупреждения потенциальной неоднородности партии в результате мутаций на концах генома при культивировании больших объемов или после длительного пассирования, для большей уверенности рекомендуется обеспечить все рекомбинантные аденовирусы, в том числе на основе Ad5 или даже Ad48, альтернативными последовательностями ITR в соответствии с настоящим изобретением. Это гарантирует, что будут получены партии рекомбинантного аденовируса, в которых геномы по

сути всех аденовирусных частиц содержат 5'-концевую последовательность СТАТСТАТ в соответствии с настоящим изобретением. Более того, спасение аденовирусных векторов, несущих данную альтернативную последовательность ITR, может ускорять продуцирование вакцинного вектора.

Таблица I. 5'-концевые последовательности из аденовирусных серотипов

		Последовательности аденовируса человека				Последовательности аденовируса, не инфицированного человека			
		A	B	C	D	E	F	A	B
Консервативные последовательности аденовируса человека	AdV 5 человека	L43079	CAT	CAT	CA				
	AdV 2 человека	ADRCG				
	AdV 1 человека	AF534906				
	AdV 6 человека	FJ349096				
	AdV 57 человека	HQ003817				
	AdV 17 человека	HQ910407				
	AdV 19 человека	AB448774				
	AdV 22 человека	FJ819037				
	AdV 26 человека	EF153474				
	AdV 28 человека	FJ824826				
	AdV 36 человека	GQ384060				
	AdV 36 человека	DQ900900				
	AdV 46 человека	AY875848				
	AdV 48 человека	EF153473				
	AdV 49 человека	DQ393829				
	AdV 53 человека	AB605244				
	AdV 54 человека	AB448770				
	AdV 56 человека	HM770721				
	AdV 3 человека	AY598836				
	AdV 7 человека	AY601634				
AdV 11а человека	FJ597732					
AdV 14 человека	AY803294					
AdV 34 человека	AY737797					
AdV 35 человека	AY128640					
AdV 55 человека	FJ643676					
AdV 4 человека	AY598837					
AdV 40 человека	L19443					
AdV 41 человека	DQ315364					
AdV 31 человека	AM748299					
AdV 18 человека	ADRP1IT1					
Вариабельные последовательности аденовируса человека	AdV 10 человека	ADRJITR-1	. T						
	AdV 19 человека	ADRITRAA	. . A T . A T .						
	AdV 8 человека	AB448759	. TA TC . AT						
	AdV 29 человека	AB562587	. TA TC . AT						
	AdV 53 человека	AB605246	. TA TC . AT						
	AdV 15 человека	AB562586	. TA TC . AT						
	AdV 37 человека	AF271992	. TA TC . AT						
	AdV 9 человека	AF099685	. TA TC . AT						
	AdV 3 человека	DC086466	. TA TC . AT						
	AdV 7 человека	HC659699	. TA TC . AT						
	AdV 7 человека	AY495969	. TC TC . AT						
	AdV 16 человека	AY601636	. . . T . . T						
	AdV 21 человека	AY601633	. TA TC . AT						
	AdV 50 человека	AY737798	. . A TCA AT						
	AdV 4 человека	AY458656	. TC TC . T						
	AdV 4 человека	AY594253	. TA TC . AT						
	AdV 41 человека	HM565136	G . G TG . TG						
	AdV 18 человека	GU191019	. C . ATC T .						
	AdV 12 человека	AC_000005	. C . ATC T .						
		Consensus	CAT	CAT	CA				
Mast-AdV	AdV 48 обезьян	FJ025929	CAT	CAT	CA				
	AdV 29 обезьян	FJ025916				
	AdV 28,1 обезьян	FJ025914				
	AdV 41,1 обезьян	FJ025913				
	AdV 32 обезьян	FJ025911				
	AdV 46 обезьян	FJ025930				
	AdV 27,1 обезьян	FJ025909				
	AdV 33 обезьян	FJ025908				
	AdV 35,1 обезьян	FJ025912				
	AdV 44 обезьян	FJ025899				
	AdV 31,1 обезьян	FJ025906				
	AdV 42,1 обезьян	FJ025903				
	AdV 40,1 обезьян	FJ025907				
	AdV 34 обезьян	FJ025905				
	AdV 45 обезьян	FJ025901				
	AdV 43 обезьян	FJ025900				
	AdV 50 обезьян	HQ241820				
	AdV 49 обезьян	HQ241819				
	AdV SA7P обезьян	X01027				
	AdV 8 обезьян	ADRITR1				
AdV 7 обезьян	DQ792570					
AdV 1 обезьян	AY771780					
AdV 30 обезьян	FJ025920					
AdV 23 обезьян	AY530877					
AdV 39 обезьян	FJ025924					
AdV 22 обезьян	AY530876					
AdV 36 обезьян	FJ025917					
AdV 26 обезьян	FJ025923					
AdV 37,2 обезьян	FJ025919					
AdV 24 обезьян	AY530878					
AdV 36 обезьян	FJ025917					
AdV 25 обезьян	FJ025918,1					
AdV 25 обезьян	AF394196	. C . TC . TC							
AdV 21 обезьян	AC000010	. CA TCA TC							
AdV 1 лошадей	AEEADITR1					
AdV 3 свиней	AF083132					
AdV 5 свиней	AF221544-1					
AdV 2 бычий	AF252854-1					
AdV 1 бычий	ADRITRB					
AdV 3 бычий	AF030154					
AdV 4 бычий	AF036092	... TCA T .							
AdV 5 бычий	AF238881	... TCA T .							
AdV 10 бычий	AF238882					
AdV 2 собак	CAU77082					
AdV 1 собак	AC_000003					
AdV 1 мышей	ADRITRRA					
AdV 3 мышей	EU835513					
AdV 2 мышей	NC_014899	. T . T . .							
AdV 1 тупайи	AF258794					
Мастаденовирус	ADFRFG	G . . G . . GT							
AdV 7 овец	OAU40839	. TA TTC AT							
AdV A индюков	AC_000016	. . A TCA AT							
AdV A индюков	AC_000016-1	. . A TCA AT							
AdV 1 индюков	NC_014564					
AdV 1 лягушек	NC_002501	. . A TCA AT							
AdV 1 курей	AAU46933	G . . G . . GT							
AdV 1 курей	AY421750S1					
AdV 1 курей	AY421750S2	... A . C . G							
AdV C курей	NC_015323					
AdV 9 курей	AF083975					
AdV E курей	NC_014969					
AdV A уток	AC_000004	. TC ATG TC							
	Consensus	CAT	CAT	CA					

Таблица II. ITR из различных вирусов rAd35 при пассировании

Вирус	Промотор рIX	Размер генома (т.п.о)	# PP	ITR
Ad35.TBS	+	32,4	2	смешивающаяся
Ad35.Ebo.GP.Z	+	32,4	2	альтернативная
Ad35.Ebo.GP.S/G	+	32,4	2	смешанная
Ad35.CS	+	31,5	1	смешанная
Ad35.CS	-	31,3	1	исходная
Ad35.Luc	+	32,0	1	смешивающаяся
Ad35.Luc	-	31,9	1	смешанная
Ad35.eGFP	+	31,1	1	смешивающаяся
Ad35.eGFP	-	30,9	1	смешанная
Ad35.Empty	+	30,4	1	альтернативная
Ad35.Empty	-	30,2	1	альтернативная
Ad35.SIV-Gag	+	31,9	1	альтернативная
Ad35 дикого типа	нет данных	34,8	1	смешанная

Таблица III. Изменение ITR в различных линиях клеток

Ad35wt	Тип клеток	Происхождение	плоидность	VP10	VP15
HEK293	Вспомогательные E1, почка	Эпителиальное	диплоидная	Альтернативная	-
PER.C6	Вспомогательные E1, сетчатка глаза	Эпителиальное	Гипотриплоидная	Альтернативная	-
A549	Карцинома легких	Эпителиальное	Гипотриплоидная	Смешивающаяся	Смешивающаяся
HeLa	Аденокарцинома шейки матки	Эпителиальное	Гипотриплоидная	-	Альтернативная
Hep2	Контаминированные HeLa	Эпителиальное	диплоидная	исходная	Смешивающаяся
MRC5	Нормальное легкое	фибробластное	диплоидная	-	смешивающаяся

Таблица IV. Изменение ITR в различных векторах

Вектор	Подгруппа	VPN 10	VPN 15
Ad26.eGFP	D	смешанная	альтернативная
Ad26.Luc	D	смешанная	альтернативная
Ad48.eGFP	D	исходная	исходная
Ad48.Luc	D	исходная	исходная
Ad49.eGFP	D	альтернативная	не выявлена
Ad49.Luc	D	смешанная	альтернативная
Ad11.Env	B	альтернативная	не выявлена
Ad11.SivGag	B	альтернативная	не выявлена
Ad50.eGFP	B	альтернативная	не выявлена
Ad50.Luc	B	смешанная	альтернативная
Ad5.eGFP	C	исходная	смешивающаяся
Ad5.Luc	C	исходная	смешанная

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для вакцинации и генной терапии, включающая частицы рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса человека серотипа 5, 11a, 26, 34, 35, 49 или 50 или рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса обезьян, отличающаяся тем, что геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что рекомбинантный аденовирус человека представляет собой аденовирус серотипа 5, 26, 35, 49 или 50.

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что рекомбинантный аденовирус человека представляет собой аденовирус серотипа 26 или 35.

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что в рекомбинантном аденовирусе отсутствует по меньшей мере часть участка E1.

5. Композиция по любому из пп.1-4, содержащая по меньшей мере 1×10^7 частиц рекомбинантного аденовируса.

6. Композиция по любому из пп.1-5, содержащая по меньшей мере 1×10^8 частиц рекомбинантного аденовируса.

7. Композиция по любому из пп.1-6, содержащая по меньшей мере 1×10^9 частиц рекомбинантного аденовируса.

8. Композиция по любому из пп.1-7, содержащая по меньшей мере 1×10^{10} частиц рекомбинантного аденовируса.

9. Способ получения партии частиц рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса человека серотипа 5, 11a, 26, 34, 35, 49 или 50 или рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса обезьян, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, при этом способ включает: а) молекулярное клонирование рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса для замены природных 5'-концевых нуклеотидов генома аденовируса, не образующих последовательность СТАТСТАТ, на нуклеотидную последовательность СТАТСТАТ, б) размножение в клетках-хозяевах рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса, включающего в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, и с) сбор рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса для получения партии частиц, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ.

10. Способ получения партии частиц рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса человека серотипа 5, 11a, 26, 34, 35, 49 или 50 или рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса обезьян, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, при этом способ включает: а) выделение методом бляшкообразования из одиночной бляшки рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса, включающего в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ, б) размножение в клетках-хозяевах рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса, полученного из одиночной бляшки на стадии а), и с) сбор рекомбинантного трансгенсодержащего аденовируса для получения партии частиц, причем геномы по меньшей мере 99% частиц аденовируса в партии содержат в качестве 5'-концевых нуклеотидов последовательность СТАТСТАТ.

11. Способ по п.9 или 10, отличающийся тем, что партия содержит по меньшей мере 1×10^7 частиц рекомбинантного аденовируса.

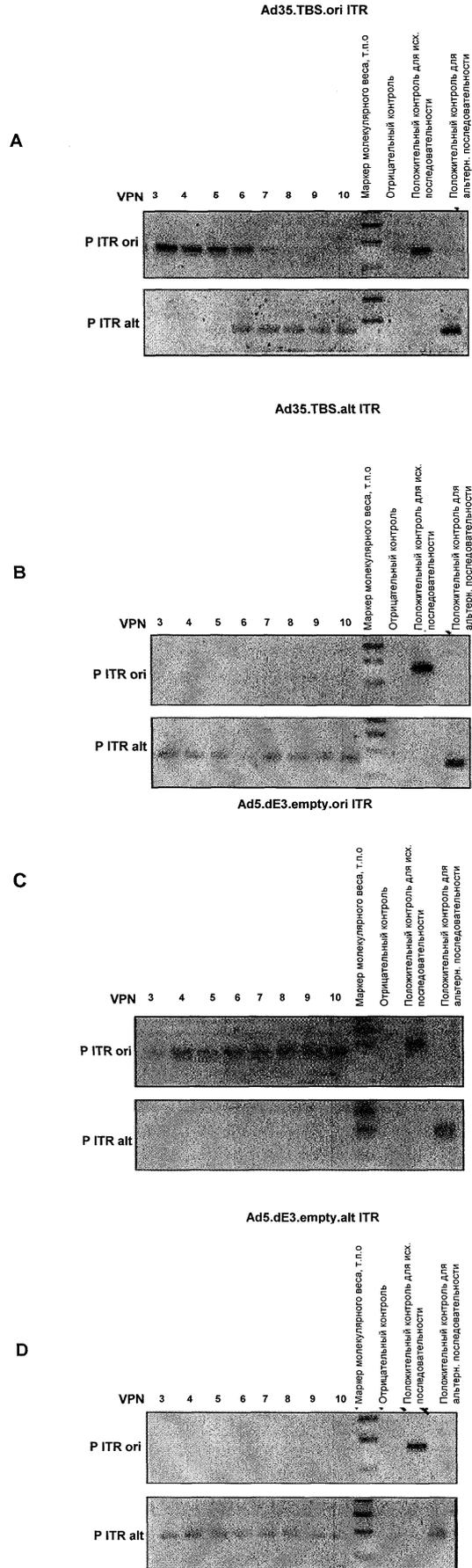
12. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что рекомбинантный аденовирус человека представляет собой аденовирус серотипа 5, 26, 35, 49 или 50.

13. Способ по любому из пп.9-12, отличающийся тем, что рекомбинантный аденовирус человека представляет собой аденовирус серотипа 26 или 35.

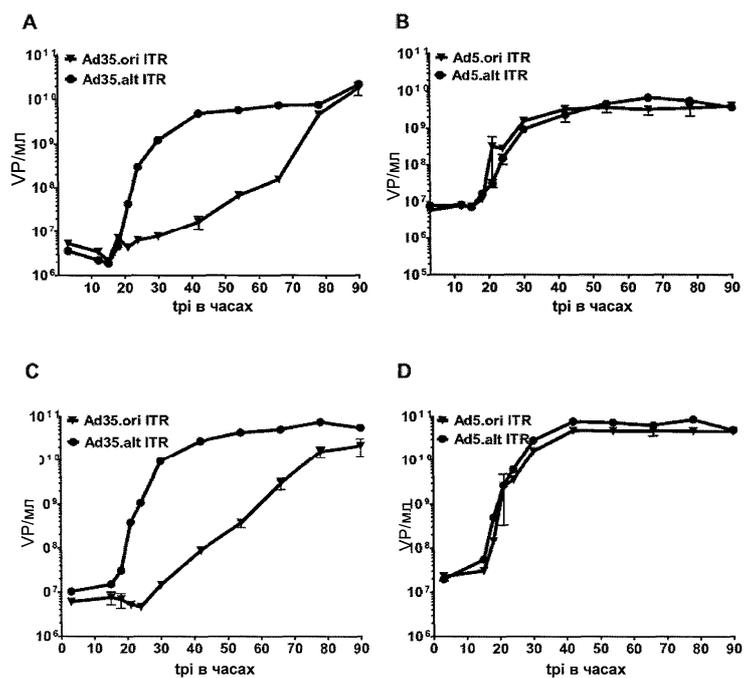
14. Способ по любому из пп.9-13, отличающийся тем, что в рекомбинантном аденовирусе делетирована по меньшей мере часть участка E1.

15. Способ по любому из пп.9-14, дополнительно включающий очистку рекомбинантного аденовируса.

16. Способ по любому из пп.9-16, отличающийся тем, что стадию б) осуществляют в биореакторе.



Фиг. 1



Фиг. 2

