



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.09

(21) Номер заявки
201690545

(22) Дата подачи заявки
2014.10.24

(51) Int. Cl. **A61K 35/761** (2015.01)
C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ АДЕНОВИРУСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ТРАНСГЕНЫ

(31) 1318880.0; 1318885.9; 1322851.5;
1401159.7; 1406470.3
(32) 2013.10.25; 2013.10.25; 2013.12.23;
2014.01.23; 2014.04.10

(33) GB

(43) 2016.09.30

(86) PCT/EP2014/072919

(87) WO 2015/059303 2015.04.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПСАЙОКСУС ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Чемпион Брайан Роберт, Браун Элис
Клэр Ноэль, Фишер Керри Дэвид,
Николсон Тамара (GB)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-2005118825
KUHN IRENE ET AL.: "Directed evolution
generates a novel oncolytic virus for the
treatment of colon cancer", PLOS ONE, vol.
3, no. 6, 18 June 2008 (2008-06-18), pages
e2409/1-e2409/11, XP009107025, ISSN: 1932-6203,
DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0002409, page 2,
right-hand column, paragraph 4, figure 2, page 6,
left-hand column, last paragraph - page 7, left-hand
column, paragraph 1

WO-A2-2006060314

WO-A2-2005086922

ALEXA FRENTZEN ET AL.: "Anti-
VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded
by oncolytic vaccinia virus significantly enhances
antitumor therapy", PROCEEDINGS OF THE
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol.
106, no. 31, 4 August 2009 (2009-08-04), pages
12915-12920, XP002678052, ISSN: 0027-8424,
DOI:10.1073/PNAS.0900660106, abstract, figure 2

J.D. DIAS ET AL.: "Targeted cancer
immunotherapy with oncolytic adenovirus coding
for a fully human monoclonal antibody specific for
CTLA-4", GENE THERAPY, 2011, XP055015331,
ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2011.176,
abstract, figure 1, page 6, right-hand column, last
paragraph - page 7, left-hand column, line 3

HERMISTON T.: "GENE DELIVERY
FROM REPLICATION-SELECTIVE VIRUSES:
ARMING GUIDED MISSILES IN THE WAR
AGAINST CANCER", JOURNAL OF CLINICAL
INVESTIGATION, vol. 105, no. 9, 1 May
2000 (2000-05-01), pages 1169-1172, XP000999854,
ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI9973, the whole
document

LOTTA KANGASNIEMI: "IMPROVING
ONCOLYTIC ADENOVIRAL THERAPIES FOR
GASTROINTESTINAL CANCERS AND TUMOR
INITIATING CELLS", 1 January 2010 (2010-01-01),
pages 1-70, XP055168686, Retrieved from the
Internet:URL: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/20501/improvin.pdf?sequence=1> [retrieved
on 2015-02-10], page 25, paragraph 3 - page 27,
paragraph 1, page 18, line 5 - line 12

WO-A2-2005107474

(57) Изобретение относится к способным к репликации онколитическим аденовирусам группы В, содержащим трансгены, а также к их применению в терапии рака, в частности, в составе композиции.

Настоящее изобретение относится к модифицированному онколитическому аденовирусу (АВ) группы В, способному к репликации, например, несущему по меньшей мере один трансген, включая терапевтический и/или репортерный трансген, в частности, такому как аденовирус серотипа 11 или химерный вирус, содержащий фибриллу, пентон и гексон из АВ11, композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащая указанный вирус, применению указанного вируса и вирусных составов, в частности, в лечении, особенно в лечении рака. В область настоящего изобретения также включены способы получения указанного вируса.

Уровень техники

Аденовирусные векторы, имеющие дефект репликации, изучали в течение ряда лет, чтобы определить их способность доставлять трансгены. В основном такие гены встраивали в область Е1 и/или Е3, поскольку эти области генома вируса не являются значимыми для векторов.

Неожиданным является то, что относительно небольшой объем работ был выполнен с использованием альтернативных положений для вставки трансгенов в геном аденовируса. Кроме того, большая часть работ была выполнена на АВ5.

В настоящее время в клинических условиях применяют новое поколение онколитических аденовирусов, способных к репликации. Эти вирусы не нуждаются в дополняющих клеточных линиях для репликации. Область Е1 представляет собой область, необходимую для репликации вируса, в то время как область Е3 теоретически может быть использована в качестве места для встраивания трансгена, поэтому возможность вставки трансгена в другие положения, помимо указанной области, могла бы обеспечить преимущества. Однако модификации вируса следует выполнять с осторожностью, чтобы не нарушать жизненный цикл вируса и/или полезные свойства вируса, такие как его терапевтические свойства.

Энаденотуцирев (EnAd) представляет собой химерный онколитический аденовирус, ранее известный как EnAd (WO 2005/118825), содержащий фибриллу, пентон и гексон из АВ11p, следовательно, он является вирусом подгруппы В. Указанный вирус содержит химерную область Е2В, которая содержит ДНК из АВ11p и АВ3. В EnAd удалена практически вся область Е3 и часть области Е4. Следовательно, указанный вирус имеет существенное пространство в геноме для встраивания дополнительного генетического материала, оставаясь при этом жизнеспособным. Кроме того, поскольку EnAd представляет собой аденовирус подгруппы В, ранее выработанный иммунитет к этому вирусу у человека менее распространен, чем, например, в отношении АВ5. Другие примеры химерных онколитических вирусов, содержащих фибриллу, пентон и гексон АВ11, включают OvAd1 и OvAd2 (см. WO 2006/060314).

Как представляется, EnAd предпочтительно инфицирует опухолевые клетки, быстро реплицируется в этих клетках и вызывает их лизис. Эта последовательность событий, в свою очередь, может вызывать воспалительные иммунные реакции, побуждая тем самым организм также бороться с раком. Была выдвинута гипотеза о том, что эффективность EnAd отчасти связана с быстрой репликацией вируса в условиях *in vivo*.

Наряду с тем, что EnAd селективно лизует опухолевые клетки, существует возможность придания ему дополнительных полезных свойств, например повышение терапевтической активности указанного вируса или уменьшение побочных эффектов вируса путем встраивания трансгенов, например трансгена, который кодирует сигнальный белок клетки или антитело, или трансгена, который кодирует фактор, стимулирующий белок(и), участвующий(ие) в передаче сигналов в клетке.

Эффективное "вооружение" вируса ДНК, кодирующей некоторые белки, которые могут экспрессироваться внутри раковой клетки, может обеспечить возможность применения собственных защитных сил организма для более эффективной борьбы с опухолевыми клетками, например, делая клетки более видимыми для иммунной системы, или путем доставки терапевтического гена/белка преимущественно к опухолевым клеткам-мишеням.

Помимо этого, возможность вставки в геном трансгенов, которые являются репортерами, может помочь при проведении клинических или доклинических исследований.

Важно отметить, что экспрессия трансгенов не оказывает нежелательного влияния на репликацию или другие полезные свойства вируса. Следовательно, ген или гены должны быть встроены в положение, которое не вызывает нарушения способности к репликации и других полезных свойств вируса. Помимо этого, геном аденовирусов плотно упакован, и поэтому может быть трудно найти подходящее место для встраивания трансгенов. Это также ограничивает размер трансгенов, которые могут быть встроены.

В терапевтических продуктах важно точно контролировать характеристики активного агента так, чтобы агент был подробно охарактеризован и мог быть воспроизводимо получен. Известные в данной области техники системы, в которых используют случайно встраиваемые транспозоны, малоприменимы для применения в фармацевтических продуктах, поскольку трансген встраивается в геном вируса случайным образом и может оказывать влияние на сайт вставки. Замена генов, вставленных с помощью транспозона, альтернативными генами также может быть затруднена.

Следовательно, желательной является разработка надежных и воспроизводимых способов создания нагруженных аденовирусов, в которые может быть встроено широкий спектр трансгенов.

Авторы настоящего изобретения разработали способ "вооружения" аденовируса, пригодный для встраивания широкого спектра трансгенов под контролем эндогенного или экзогенного промотора, обес-

печивающего получение жизнеспособного, стабильного, пригодного для выделения вируса, который экспрессирует трансген в опухолевых клетках. Способ является надежным и воспроизводимым, и его можно тщательно контролировать.

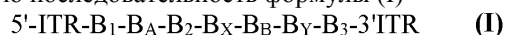
Трансген расположен в непосредственной близости от гена (рядом с ним), кодирующего белок фибриллы, на 5'-конце и/или 3'-конце гена, который не оказывает нежелательного влияния на стабильность вируса.

Авторы настоящего изобретения установили, что сложные белки в виде антител или фрагментов антител и сигнальных белков клетки могут быть вставлены в установленном месте в геном аденовирусов, например вирусов группы В, таких как АВ11 и вирусы, полученные из АВ11, и успешно экспрессированы, например, под контролем эндогенного промотора Е4 или основного промотора поздних генов, так, что белок экспрессируется и репликация вируса не нарушается.

Плаزمид, разработанная авторами настоящего изобретения, обеспечивает новые сайты рестрикции в геноме аденовируса, которые можно применять для вставки кассет с трансгеном вблизи гена L5 (фибрилла), чтобы обеспечить вирусы согласно настоящему изобретению. В другом варианте плазмиды, содержащие трансгены или кассеты с трансгеном в указанных положениях сайтов вставки, могут быть напрямую полностью синтезированы без стадии клонирования и, следовательно, без необходимости использования сайтов рестрикции.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложен онколитический аденовирус группы В, способный к репликации, содержащий нуклеотидную последовательность формулы (I)



в которой B₁ содержит структурный элемент: E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит структурный элемент E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ представляет собой связь или содержит структурный элемент E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции и/или один или более трансгенов;

B_B содержит структурный элемент L5;

B_Y содержит кассету, содержащую трансген и акцепторную последовательность сплайсинга; и

B₃ представляет собой связь или содержит структурный элемент E4,

при этом указанная кассета находится под контролем эндогенного промотора, выбранного из промотора E4 и основного промотора поздних генов.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения аденовирус согласно настоящему изобретению дополнительно содержит не кодирующую последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность ДНК, которая гибридизуется с указанной последовательностью в жестких условиях.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения аденовирус согласно настоящему изобретению содержит акцепторную последовательность сплайсинга, которая выбрана из CAGG, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения указанная кассета в положении B_Y дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения кассета в положении B_Y дополнительно содержит пептид 2A с высокой эффективностью саморасщепления.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения кассета в положении B_Y дополнительно содержит последовательность Козак.

В одном из вариантов реализации аденовирус согласно настоящему изобретению кассета в положении B_Y дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения кассета в положении B_Y дополнительно содержит сайт рестрикции на 3'-конце последовательности указанной кассеты и/или на 5'-конце последовательности указанной кассеты.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения кассета в положении B_Y содержит трансген, который кодирует антитело или его связывающий фрагмент, причем указанное антитело или его связывающий фрагмент является специфичным в отношении OX40, лиганда OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, лиганда CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS, лиганда ICOS, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT, CD160, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения кассета в положении B_Y содержит трансген, который кодирует цитокин, причем указанный цитокин выбран из группы, содержащей IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TNF-α, TGF-β, лимфотоксина α (LTA) и GM-CSF.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения кассета в положении B_Y содержит трансген, который кодирует хемокин, причем указанный хемокин выбран из группы, содержащей IL-8, CCL5,

CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CRTH2.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения аденовирус согласно настоящему изобретению содержит последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 73.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X содержит сайт рестрикции, например 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например 1 или 2 сайта. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена и один или более сайтов рестрикции, например 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, в том случае, когда сайты рестрикции фланкируют ген или последовательность ДНК, содержащую гены, чтобы обеспечить специфичное вырезание гена/генов из генома и/или их замену. В другом варианте сайты рестрикции могут фланкировать каждый ген, например, если в последовательности присутствуют два трансгена, то необходимы три различных сайта рестрикции, чтобы обеспечить селективное вырезание и/или замену генов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более, например все, трансгенов представлены в виде кассеты с трансгеном. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 10. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность SEQ ID NO: 10 прервана, например, трансгеном. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность SEQ ID NO: 10 является непрерывной. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X не содержит сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X представляет собой связь. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X содержит или состоит из одного или более трансгенов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y содержит сайт рестрикции, например 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например 1 или 2 сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена, и один или более сайтов рестрикции, например 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, в том случае, когда сайты рестрикции фланкируют ген или последовательность ДНК, содержащую гены, чтобы обеспечить специфичное вырезание гена/генов из генома и/или их замену. В другом варианте сайты рестрикции могут фланкировать каждый ген, например, если в последовательности присутствуют два трансгена, то необходимы три различных сайта рестрикции, чтобы обеспечить селективное вырезание и/или замену генов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более, например все, трансгенов представлены в виде кассеты с трансгеном. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 11. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность SEQ ID NO: 11 прервана, например, с помощью трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность SEQ ID NO: 11 является непрерывной. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y не содержит сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y представляет собой связь. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y содержит или состоит из одного или более трансгенов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каждый из V_X и V_Y содержит сайт рестрикции, например 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например 1 или 2 сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каждый из V_X и V_Y содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения каждый из V_X и V_Y содержит по меньшей мере один трансген, например 1 или 2 трансгена, и один или более сайтов рестрикции, например 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, в том случае, когда сайты рестрикции фланкируют ген или последовательность ДНК, содержащую гены, чтобы обеспечить специфичное вырезание гена из генома и/или его замену. В другом варианте сайты рестрикции могут фланкировать каждый ген, например, если в последовательности присутствуют два трансгена, то необходимы три различных сайта рестрикции, чтобы обеспечить селективное вырезание и/или замену генов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более, например все, трансгенов представлены в виде кассеты с трансгеном. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X и V_Y содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 соответственно. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X и V_Y не содержат сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_X представляет собой связь и V_Y не является связью. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_Y представляет собой связь и V_X не является связью.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген расположен в В_х. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или кассета с трансгеном расположена в В_у. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или кассета с трансгеном расположены в В_х и В_у, например, трансгены могут быть идентичными или различными в каждом месте.

Предпочтительно трансген в вирусных конструкциях согласно настоящему изобретению вставлен в место, которое удалено из ранних генов, поскольку это уменьшает вероятность влияния на экспрессию генов или скорость репликации вирусов.

В одном независимом аспекте предложен онколитический аденовирус серотипа 11 компетентный по репликации или производное указанного вируса, в котором фибрилла, гексон и капсид представляют собой серотип 11, причем вирусный геном содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, эндогенного по отношению к аденовирусу, выбранного из промотора Е4 и основного промотора поздних генов, так, что трансген не нарушает репликацию вируса, например, в котором последовательность ДНК, кодирующая терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, находится под контролем промотора Е4 или, в другом варианте, под контролем основного промотора поздних генов, в частности, в котором последовательность ДНК, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, расположена после L5 в последовательности генома вируса (т.е. по направлению к 3'-концу последовательности вируса). Предпочтительно использование эндогенного промотора максимально увеличивает количество места, доступного для вставки трансгенов.

Предпочтительно вирус, который находится под контролем указанных промоторов, остается компетентным по репликации и также способен экспрессировать антитело в виде полноразмерного антитела или подходящего связывающего фрагмента или другого белка. Следовательно, антитело или другой белок по выбору будет экспрессироваться раковой клеткой. Применение эндогенного промотора может быть предпочтительным, поскольку он уменьшает размер кассеты с трансгеном, которую необходимо вставить для экспрессии антитела, его фрагмента или другого белка, т.е. кассета может иметь меньший размер, поскольку нет необходимости включать в ее состав экзогенный промотор.

Применение эндогенного промотора в указанном вирусе также может быть предпочтительным для терапевтических целей, поскольку трансген экспрессируется только при репликации вируса, в отличие от конститутивного экзогенного промотора, который будет непрерывно транскрибировать трансген и может привести к нецелесообразной концентрации антитела или фрагмента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия антитела или его фрагмента находится под контролем основного промотора поздних генов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия антитела или его фрагмента находится под контролем промотора Е4.

Согласно одному независимому аспекту предложен онколитический аденовирус серотипа 11 компетентный по репликации или производное указанного вируса, в котором фибрилла, гексон и капсид относятся к серотипу 11, и вирусный геном которого содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, расположенную в части генома вируса, которая экспрессируется в конце цикла репликации вируса и так, что трансген не нарушает репликацию вируса, причем указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, экзогенного по отношению к аденовирусу, например, в котором последовательность ДНК, кодирующая терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, находится под контролем промотора цитомегаловируса (ЦМВ), в частности последовательность ДНК, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, расположена после L5 в последовательности генома вируса (т.е. по направлению к 3'-концу последовательности вируса).

Применение экзогенного промотора может быть предпочтительным, поскольку он может обеспечивать активную и конститутивную экспрессию антитела или его фрагмента, который может быть особенно пригодным в некоторых ситуациях, например, когда пациент имеет очень распространенный рак.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия антитела или его фрагмента находится под контролем промотора ЦМВ.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экзогенный промотор связан с указанной последовательностью ДНК, например, является частью кассеты экспрессии, кодирующей антитело или его фрагмент.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность ДНК, кодирующая антитело или его фрагмент, расположена после гена L5 в последовательности вируса. Предпочтительно авторы настоящего изобретения установили, что различные трансгены могут быть вставлены в В_х и/или В_у под контролем экзогенного или эндогенного промотора, не оказывая нежелательного воздействия на жизненный цикл вируса или стабильность вектора.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген является частью кассеты с трансгеном, содержащей по меньшей мере одну кодирующую последовательность (т.е. по меньшей мере один трансген) и необязательно один или более элементов, независимо выбранных из:

- (i) регулятора экспрессии генов, такого как экзогенный промотор или акцепторная последователь-

ность сплайсинга;

(ii) последовательности ДНК участка внутренней посадки рибосомы (IRES);

(iii) последовательности ДНК, кодирующей пептид 2А с высокой эффективностью саморасщепления;

(iv) последовательности ДНК, кодирующей последовательность полиаденилирования; и

(v) их комбинаций.

Следовательно, в одном варианте реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном содержит (i), или (ii), или (iii), или (iv).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном содержит (i) и (ii), или (i) и (iii), или (i) и (iv), или (ii) и (iii), или (ii) и (iv), или (iii) и (iv).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном содержит (i) и (ii) и (iii), или (i) и (ii) и (iv), или (i) и (iii) и (iv), или (ii) и (iii) и (iv).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном содержит (i) и (ii) и (iii) и (iv).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или кассета с трансгеном содержит последовательность Козак, которая принимает участие в трансляции мРНК, например, в начале кодирующей последовательности белка.

Предложенный в настоящем документе вирус является компетентным по репликации.

В настоящем изобретении также предложена онколитическая терапевтическая композиция, содержащая в эффективном количестве вирус в соответствии с настоящим изобретением, в частности фармацевтическая композиция, например, содержащая аденовирус в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В настоящем изобретении также дополнительно предложено применение аденовируса или композиции в соответствии с настоящим изобретением в лечении рака.

Подробное описание изобретения

В настоящем документе термин "трансген" относится к гену, который был вставлен в последовательность генома, причем указанный ген не является природным для вируса (экзогенный) или обычно не обнаруживается в данном конкретном месте в вирусе. Примеры трансгенов приведены ниже. В настоящем документе трансген также включает функциональный фрагмент гена, который представляет собой часть гена, который при вставке пригоден для выполнения функции или основной части функции полно-размерного гена.

В настоящем документе термины "трансген" и "кодирующая последовательность" используются взаимозаменяемо применительно к вставкам в вирусный геном, если из контекста не следует иное. В настоящем документе термин "кодирующая последовательность" означает, например, последовательность ДНК, кодирующую функциональную РНК, пептид, полипептид или белок. Как правило, кодирующая последовательность представляет собой кДНК для трансгена, которая кодирует представляющую интерес функциональную РНК, пептид, полипептид или белок. Представляющая интерес функциональная РНК, пептиды, полипептид и белок описаны ниже.

Очевидно, что геном вируса содержит кодирующие последовательности ДНК. Эндогенные (природные гены) гены в геномной последовательности вируса не рассматриваются как трансген применительно к настоящему описанию, если они не были модифицированы с помощью рекомбинантных методов так, что они находятся в неприродном положении или в неприродной среде.

Согласно одному варианту реализации в настоящем документе термин "трансген" относится к сегменту ДНК, содержащему ген, или последовательности кДНК, которая была выделена из одного организма и введена в другой организм, т.е. вирус согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения такой неприродный сегмент ДНК может сохранять способность производить функциональную РНК, пептид, полипептид или белок.

Следовательно, в одном варианте реализации вставленный трансген кодирует человеческий или гуманизированный белок, полипептид или пептид.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставленный трансген кодирует нечеловеческий белок, полипептид или пептид (например, белок, полипептид или пептид млекопитающего, не относящегося к человеку) или молекулу РНК, например, мыши, крысы, кролика, верблюда, ламы или аналогичных видов. Предпочтительно вирусы согласно настоящему изобретению обеспечивают транспортировку трансгенов внутрь раковой клетки. Соответственно, ответы, которые развиваются у пациента-человека на последовательность (например, белок) из вида, отличного от человека, могут быть сведены к минимуму с помощью указанной внутриклеточной доставки.

Последовательность ДНК может содержать более одного трансгена, например 1, 2, 3 или 4 трансгена, например 1 или 2 трансгена.

Кассета с трансгеном может содержать более одного трансгена, например 1, 2, 3 или 4 трансгена, например 1 или 2 трансгена.

В одном или более вариантах реализации кассета имеет структуру, приведенную на одной или более фигурах или в примерах.

В настоящем документе термин "кассета с трансгеном" относится к последовательности ДНК, кодирующей один или более трансгенов в виде одной или более кодирующих последовательностей и один или более регуляторных элементов.

Кассета с трансгеном может кодировать одну или более последовательностей моноцистронных и/или полицистронных мРНК.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или кассета с трансгеном кодирует моноцистронную или полицистронную мРНК, и, например, кассета пригодна для встраивания в геном аденовируса в месте, которое находится под контролем эндогенного промотора или экзогенного промотора, или их комбинации.

В настоящем документе моноцистронная мРНК относится к молекуле мРНК, кодирующей одну функциональную РНК, пептид, полипептид или белок.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном кодирует моноцистронную мРНК.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном, применительно к кассете, кодирующей моноцистронную мРНК, означает сегмент ДНК, необязательно содержащий экзогенный промотор (который представляет собой регуляторную последовательность, которая будет определять, где и когда трансген активен) или сайт сплайсинга (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, когда молекула мРНК будет расщеплена сплайсосомай), кодирующую последовательность (т.е. трансген), как правило, полученную из кДНК белка, представляющего интерес, необязательно содержащий сигнальную последовательность полиаденилирования и последовательность терминатора.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном может кодировать одну или более последовательностей полицистронных мРНК.

В настоящем документе термин "полицистронная мРНК" относится к молекуле мРНК, кодирующей две или более функциональные РНК, пептидов или белков или их комбинацию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном кодирует полицистронную мРНК.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном, применительно к кассете, кодирующей полицистронную мРНК, содержит сегмент ДНК, необязательно содержащий экзогенный промотор (который представляет собой регуляторную последовательность, которая будет определять, где и когда трансген активен) или сайт сплайсинга (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, когда молекула мРНК будет расщеплена сплайсосомай), две или более кодирующие последовательности (трансгенов), как правило, полученных из кДНК белка или пептида, представляющего интерес, например, в котором каждая кодирующая последовательность отделена с помощью IRES или пептида 2A. Кассета может необязательно содержать последовательность полиаденилирования и последовательность терминатора после последней кодирующей последовательности, которая будет транскрибироваться.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном кодирует моноцистронную мРНК, за которой расположена полицистронная мРНК. В другом варианте реализации кассета с трансгеном кодирует полицистронную мРНК, за которой расположена моноцистронная мРНК.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека. В настоящем документе термины "аденовирус", "серотип" или "серотип аденовируса" относятся к любому аденовирусу, который может быть отнесен к любому более чем из 50 известных в настоящее время серотипов аденовирусов, которые классифицируются на подгруппы A-F, а также распространяется на любые неидентифицированные или неклассифицированные в настоящее время серотипы аденовирусов. См., например, Strauss, "Adenovirus infections in humans", в The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, p. 451-596 (1984) и Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication", в Fields Virology, Vol. 2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, p. 2265-2267 (2001), как показано в табл. 1.

Таблица 1

Подгруппа	Серотип аденовируса
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 50
E	4
F	40, 41

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой вирус подгруппы B, например, независимо выбранный из группы, включающей или состоящей из AB3, AB7, AB11, AB14, AB16, AB21, AB34 и AB51, например AB11, в частности AB11p (штамм Slobitski). В одном варианте реализации настоящего изобретения аденовирус согласно настоящему изобретению имеет капсид, например гексон, и/или фибриллу аденовируса подгруппы B, такого как AB11, в частности

AB11p. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой AB11 или имеет фибриллу, и/или гексон, и/или пентон из AB11, например AB11p.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус не является вирусом группы А.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус не является вирусом группы С. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус не является аденовирусом АВ5. В настоящем документе АВ5 относится к известным аденовирусам, обозначенным как серотип 5, он не распространяется на генетически модифицированные вирусы, которые содержат последовательности из АВ5. В одном варианте реализации настоящего изобретения вирус согласно настоящему изобретению не содержит капсида АВ5.

В одном варианте реализации настоящего изобретения аденовирус согласно настоящему изобретению является химерным. В том случае, если аденовирус является химерным, для определения серотипа будут использованы характеристики внешнего капсида. В настоящем документе термин "химерный" относится к вирусу, который содержит ДНК по меньшей мере двух различных серотипов вирусов, включая различные серотипы в пределах одной и той же группы.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус содержит фибриллу, белки гексона и пентона одного и того же серотипа, например AB11, в частности AB11p, например, обнаруженные в положениях 30812-31789, 18254-21100 и 13682-15367 геномной последовательности AB11p, при этом нуклеотидные положения приведены по отношению к последовательности с идентификационным номером GenBank ID 217307399 (номер доступа: GC689208).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой энаденотуцирев (также известный как EnAd и ранее как EnAd). В настоящем документе энаденотуцирев относится к химерному аденовирусу, содержащему последовательность согласно SEQ ID NO: 12. Указанный вирус представляет собой онколитический химерный аденовирус компетентный по репликации, который имеет улучшенные терапевтические свойства по сравнению с аденовирусами дикого типа (см., WO 2005/118825). EnAd содержит химерную область E2B, которая содержит ДНК из AB11p и AB3, и делеции в E3/E4. Структурные изменения в энаденотуциреве привели к получению генома, размер которого приблизительно на 3,5 тыс. п.н. меньше, чем геном AB11p, обеспечивая тем самым дополнительное "пространство" для встраивания трансгенов.

OvAd1 и OvAd2 также представляют собой химерные аденовирусы, аналогичные энаденотуциреву, которые также содержат дополнительное "пространство" в геноме (см., WO 2008/080003). Следовательно, в одном варианте реализации настоящего изобретения аденовирус представляет собой OvAd1 или OvAd2.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус является онколитическим. В настоящем документе термин "онколитический аденовирус" означает аденовирус, который предпочтительно вызывает гибель раковых клеток, в сравнении с нераковыми клетками.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус является апоптотическим, т.е. он ускоряет запрограммированную гибель клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус является цитолитическим. Цитолитическая активность онколитических аденовирусов согласно настоящему изобретению может быть определена в типичных линиях опухолевых клеток, и данные, преобразованные в оценку активности, например, с использованием аденовируса, принадлежащего к подгруппе С, такого как АВ5, используют в качестве стандарта (т.е. присваивают величину активности 1). Подходящим способом определения цитолитической активности является количественное исследование с использованием MTS (см. пример 4, фиг. 2 из WO 2005/118825, которая включена в настоящее описание посредством ссылки).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус является некролитическим, т.е. указанный вирус вызывает или ускоряет некроз клеток или иммуногенную гибель клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения некролитическая гибель клеток является предпочтительной, поскольку она инициирует, индуцирует иммунные реакции у пациентов (хозяев).

Если из контекста не следует иное, в настоящем документе аденовирус относится к вирусу, компетентному по репликации, а также к вирусным векторам, дефектным по репликации.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус является компетентным по репликации. Вирус, компетентный по репликации, применительно к настоящему описанию относится к вирусу, который обладает всеми необходимыми молекулярными комплексами для репликации в клетках в условиях *in vitro* и в условиях *in vivo*, т.е. без помощи упаковывающей клеточной линии. Вирусный вектор, например, содержащий делеции в области E1, способный к репликации в дополняющей упаковывающей клеточной линии, не является вирусом, компетентным по репликации применительно к настоящему описанию.

Вирусные векторы являются дефицитными по репликации и нуждаются в упаковывающей клетке, которая обеспечивает дополнительный ген для репликации.

В настоящем документе термин "геном аденовируса" означает последовательность ДНК, кодирующую структурные белки и элементы, имеющие отношение к функции/жизненному циклу аденовируса.

Все геномы аденовирусов человека, исследованные на сегодняшний день, имеют одинаковую общую организацию, т.е. гены, кодирующие специфические функции, расположены в одном и том же месте в вирусном геноме (в настоящем документе они называются структурными элементами). Каждый конец вирусного генома содержит короткую последовательность, известную как инвертированный концевой повтор (или ITR), который необходим для репликации вируса. Вирусный геном содержит пять ранних транскрипционных блоков (E1A, E1B, E2, E3 и E4), три запаздывающих ранних блока (IX, IVa2 и поздний блок E2) и один поздний блок (основной поздний), который подвергается процессингу с образованием пяти семейств поздних мРНК (L1-L5). Белки, кодируемые ранними генами, в первую очередь участвуют в репликации и модуляции ответа клетки-хозяина на инфекцию, в то время как поздние гены кодируют вирусные структурные белки. Обозначение ранних генов начинается с буквы E, и обозначение поздних генов начинается с буквы L.

Геном аденовирусов плотно упакован, т.е. содержит небольшую некодирующую последовательность, вследствие этого может быть трудно найти подходящее место для вставки трансгенов. Авторы настоящего изобретения выявили две области ДНК, в которых допустимо наличие трансгенов, в частности выявленные сайты пригодны для встраивания сложных трансгенов, таких как те, которые кодируют антитела. Иными словами, трансген экспрессируется без нежелательного воздействия на жизнеспособность, природные свойства, такие как онколитические свойства, или репликацию вируса.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический или частично онколитический вирус в соответствии с настоящим изобретением может быть получен в результате делеции в области E4 и/или E3, например, в указанном вирусе частично удалена область E4 или полностью удалена область E3 или в другом варианте частично удалена область E4 (такая как E4orf4) и полностью удалена область E3, например, как проиллюстрировано в последовательностях, раскрытых в настоящем описании.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус, раскрытый в настоящем документе, является химерным. В настоящем документе термин "химерный вирус" относится к вирусу, который содержит ДНК из двух или более различных серотипов и обладает свойствами онколитического вируса.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус представляет собой EnAd или его активное производное, которое сохраняет важные полезные свойства вируса. EnAd раскрыт в WO 2005/118825 (включенной в настоящее описание посредством ссылки), и полноразмерная последовательность указанного вируса приведена в SEQ ID NO: 12. Химерная область E2B раскрыта в настоящем документе в виде последовательности SEQ ID NO: 47.

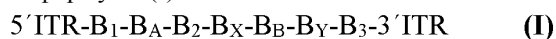
Альтернативные онколитические вирусы включают OvAd1 и OvAd2, которые раскрыты как последовательности SEQ ID NO: 2 и 3 соответственно, в WO2008/080003 и включены в настоящее описание посредством ссылки.

Предпочтительно аденовирусы согласно настоящему изобретению проявляют профили вирусной активности, например, в отношении репликации и/или инфекционности, которые аналогичны профилям для EnAd после инфицирования множества различных линий клеток рака толстой кишки в условиях *in vitro*.

Структурные элементы аденовирусов.

Настоящее изобретение также относится к новым последовательностям вирусов или вирусным компонентам/структурам, таким как плазмиды, раскрытым в настоящей заявке.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (I)



в которой B₁ содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ представляет собой связь или содержит E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

B_B содержит L5;

B_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

B₃ представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из B_X и B_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (I), в которой

B₁ содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 представляет собой связь или содержит E3;

V_X представляет собой связь;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (I), в которой

V_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 представляет собой связь или содержит E3;

V_X представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B представляет собой L5;

V_Y представляет собой связь;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ia)



в которой V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 представляет собой связь или содержит E3;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и по меньшей мере один из них содержит трансген или сайт рестрикции, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ia), в которой

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 представляет собой связь или содержит E3;

V_X представляет собой связь;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и по меньшей мере один из них содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ia), в которой

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 представляет собой связь или содержит E3;

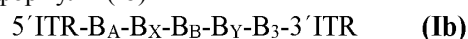
V_X представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5; V_Y представляет собой связь;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ib)



в которой V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ib), в которой

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_X представляет собой связь; V_B содержит L5; V_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ib), в которой

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_X представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5; V_Y представляет собой связь;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ic)

5' ITR- V_A - B_2 - V_X - V_B - V_Y -3' ITR (Ic)

в которой V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой E3;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ic), в которой

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 содержит E3;

V_X представляет собой связь;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ic), в которой

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой E3;

V_X представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген или сайт рестрикции, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Id)

5' ITR- B_1 - V_A - V_X - V_B - V_Y - B_3 -3' ITR (Id)

в которой B_1 содержит E1A, E1B или E1 A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или

более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5; V_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген, сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Id), в которой

V_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A представляет собой E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_X представляет собой связь;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген, сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, в качестве трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Id), в которой

V_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_X представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь;

V_3 представляет собой связь или содержит E4,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген, сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ie)

5'ITR- B_1 - B_A - B_2 - B_X - B_B - B_Y -3'ITR (Ie)

в которой V_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 содержит E3;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген, сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ie), в которой

V_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 содержит E3;

V_X представляет собой связь; V_B содержит L5;

V_Y представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген, сайт рестрикции или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус содержит геном, содержащий последовательность формулы (Ie), в которой

V_1 содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 содержит E3;

V_X представляет собой последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансгенов или оба указанных элемента;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь,

причем по меньшей мере один из V_X и V_Y не является связью и содержит трансген, сайт рестрикции

или оба указанных элемента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено соединение формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) или (Ie), в котором B_X и B_Y не является связью, и содержит трансген, сайт рестрикции или оба указанных элемента, например, оба B_X и B_Y представляют собой трансген.

Связь относится к ковалентной связи, соединяющей одну последовательность ДНК с другой последовательностью ДНК, например, соединяющей один участок генома вируса с другим. Следовательно, в настоящем описании, если переменная в формуле (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) или (Ie) представляет собой связь, то компонент или элемент, представленный связью, отсутствует, т.е. удален.

Поскольку структура аденовирусов в целом является сходной, элементы, приведенные ниже, обсуждаются с точки зрения структурных элементов и широко используемой номенклатуры, применимой к ним, которые известны специалисту в данной области техники. В настоящем документе после упоминания элемента следует упоминание последовательности ДНК, кодирующей элемент, или последовательности ДНК, кодирующей аналогичный структурный белок элемента в аденовирусе. Последнее имеет значение из-за избыточности кода ДНК. Для получения оптимальных результатов, возможно, следует рассмотреть предпочтительные кодоны, используемые вирусами.

Любой структурный элемент аденовируса, используемый в вирусах согласно настоящему изобретению, может содержать или состоять из природной последовательности или может иметь сходство с ней по меньшей мере на 95%, например 96, 97, 98, 99 или 100%, на участке определенной длины. Исходная последовательность может быть модифицирована для удаления 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% генетического материала. Специалисту в данной области техники известно, что при внесении изменений рамки считывания вируса не должны быть нарушены так, чтобы нарушилась экспрессия структурных белков.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения данный элемент представляет собой полноразмерную последовательность, т.е. полноразмерный ген. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения данный элемент меньше полноразмерного и сохраняет аналогичную или соответствующую функцию, что и полноразмерная последовательность.

Согласно одному варианту реализации данного элемента, который является необязательным в конструкции согласно настоящему изобретению, последовательность ДНК может быть меньше полноразмерной и не имеет функциональности.

Структурные гены, кодирующие структурные или функциональные белки аденовируса, как правило, связаны некодирующими областями ДНК. Соответственно, существует определенная свобода действий в отношении положения, в котором можно "разрезать" геномную последовательность структурного элемента, представляющего интерес (особенно в его некодирующей области), для вставки трансгена в вирусы согласно настоящему изобретению. Таким образом, для целей настоящего описания элемент будет рассматриваться как исходный структурный элемент в той степени, в которой он соответствует своему назначению и не кодирует посторонний материал. Как следствие, в случае необходимости, ген будет ассоциирован с подходящими некодирующими областями, например, обнаруженными в природной структуре вируса.

Следовательно, в одном варианте реализации вставка, такая как ДНК, кодирующая сайт рестрикции и/или трансген, вставлена в некодирующую область геномной ДНК вируса, такую как интрон или межгенная последовательность. С учетом вышесказанного некоторые некодирующие области аденовируса могут иметь функцию, например в альтернативном сплайсинге, регуляции транскрипции или регуляции трансляции, и это, возможно, должно быть принято во внимание.

Сайты, выявленные в настоящем документе, которые связаны с областью L5, подходят для вставки различных последовательностей ДНК, кодирующих сложные молекулы, такие как молекулы РНК-интерференции, цитокины, одноцепочечные или мультимерные белки, такие как антитела.

В настоящем документе термин "ген" относится к кодирующим и любым некодирующим последовательностям, связанным с ними, например интронам и экзонам, связанным с ними. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ген содержит или состоит только из ключевых структурных компонентов, например кодирующей области.

Ниже следует обсуждение, относящееся к конкретным структурным элементам аденовирусов.

Последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) являются общими для всех известных аденовирусов и были названы так вследствие их симметрии, и представляют собой вирусные хромосомы, содержащие точки начала репликации. Другим свойством этих последовательностей является их способность образовывать шпильку.

В настоящем документе термин "5'-ITR" относится к части или полноразмерному ITR на 5'-конце аденовируса, который сохраняет функцию ITR при включении в аденовирус в соответствующем месте. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 5'-ITR содержит или состоит из последовательности, имеющей в длину от приблизительно 1 до 138 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12, или последовательности, которая на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична указанной последовательности по всей длине, в частности последовательности, содержащей от приблизительно 1 до 138 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе термин "3'-ITR" относится к части или полноразмерному ITR на 3'-конце

аденовируса, который сохраняет функцию ITR при включении в аденовирус в соответствующем месте. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 3'-ITR содержит или состоит из последовательности, которая содержит в длину от приблизительно 32189 до 32326 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12, или последовательности, которая на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична указанной последовательности по всей длине, в частности последовательности, содержащей от приблизительно 32189 до 32326 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе B_1 относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E1A аденовируса, часть или всю область E1B аденовируса и независимо часть или всю область E1A и E1B аденовируса.

В том случае, если B_1 представляет собой связь, последовательности E1A и E1B будут исключены из вируса. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения B_1 представляет собой связь, и, следовательно, вирус является вектором.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения B_1 дополнительно содержит трансген. В данной области техники известно, что область E1 может включать трансген, который может быть встроен в область E1 с нарушением ее структуры (т.е. в "середине" последовательности), или часть или вся область E1 может быть удалена, чтобы обеспечить больше места для вставки генетического материала.

В настоящем документе термин "E1A" относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E1A аденовируса. Под областью E1A в данном случае подразумевают полипептид/белок E1A. Область E1A может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном E1A, содержит консервативные или неконсервативные замены аминокислот так, что он имеет функцию, аналогичную таковой для дикого типа (т.е. соответствующего немутированного белка); повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа; или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа или их комбинацию, в зависимости от конкретного случая.

В настоящем документе термин "E1B" относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E1B аденовируса (т.е. полипептид или белок), указанная область может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном/областью E1B, содержит консервативные или неконсервативные замены аминокислот так, что он имеет функцию, аналогичную таковой для дикого типа (т.е. соответствующего немутированного белка); повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа; или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа или их комбинацию, в зависимости от конкретного случая.

Следовательно, область B_1 может быть модифицированной или немодифицированной относительно области E1 дикого типа, такой как E1A и/или E1B дикого типа. Специалист может легко определить, присутствуют ли области E1A и/или E1B либо указанные области (частично) удалены или мутированы.

В настоящем документе "дикий тип" относится к известному аденовирусу. Известный аденовирус представляет собой тот, который был идентифицирован и получил название, независимо от того, доступна ли последовательность.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения B_1 содержит последовательность от 139 до 3932 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе область B_A относится к последовательности ДНК, кодирующей области E2B-L1-L2-L3-E2A-L4, включая любые некодирующие последовательности, в зависимости от конкретного случая. Как правило, эта последовательность не будет содержать трансген. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность по существу аналогична или идентична непрерывной последовательности из известного аденовируса, например серотипа, указанного в табл. 1, в частности вируса группы В, например AB3, AB7, AB11, AB14, AB16, AB21, AB34, AB35, AB51 или их комбинации, такого как AB3, AB11 или их комбинации. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 содержит эти элементы и другие структурные элементы, связанные с областью, например, B_A , как правило, будет включать последовательность, кодирующую белок IV2a, например, будет иметь следующий вид: IV2A-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область E2B является химерной. Иными словами, область E2B содержит последовательности ДНК из аденовирусов двух или более различных серотипов, например из AB3 и AB11, такого как AB11p. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область E2B содержит последовательность от 5068 до 10355 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12, или последовательность, которая на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична указанной последовательности по всей длине.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения E2B в компоненте B_A содержит последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 47 (которая соответствует последовательности SEQ ID NO: 3, раскрытой в WO 2005/118825).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения B_A содержит последовательность от 3933 до 27184 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе область E3 относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область E3 аденовируса (т.е. белок/полипептид), область E3 может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном E3, содержит консервативные или неконсервативные замены аминокислот так, что он имеет функцию, которая аналогична таковой для дикого типа (соответствующего немутированного белка); повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа, или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа или их комбинацию, в зависимости от конкретного случая.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область E3 получена из серотипа аденовируса, приведенного в табл. 1, или их комбинации, в частности серотипа группы В, например АВ3, АВ7, АВ11 (в частности, АВ11р), АВ14, АВ16, АВ21, АВ34, АВ35, АВ51 или их комбинации, например АВ3, АВ11 (в частности, АВ11р) или их комбинации.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область E3 частично удалена, например, удалена на 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5%.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В₂ представляет собой связь, при этом ДНК, кодирующая область E3, отсутствует.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ДНК, кодирующая область E3, может быть заменена или прервана трансгеном. В настоящем документе область E3, замененная трансгеном, включает замену части или всей области E3 трансгеном.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область В₂ содержит последовательность от 27185 до 28165 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В₂ состоит из последовательности от 27185 до 28165 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе область В_х относится к последовательности ДНК вблизи 5'-конца гена L5 в В_в. В настоящем документе термин "в непосредственной близости" или "вблизи" по отношению к 5'-концу гена L5 относится к: смежному положению (прилегающему) с 5'-концом гена L5 или некодирующей области, исходно связанной с ним, т.е. положению, примыкающему или прилегающему к 5'-концу гена L5 или некодирующей области, исходно связанной с ним. В другом варианте термин "в непосредственной близости" или "вблизи" может относиться к положению вблизи гена L5 так, что между областью В_х и 5'-концом гена L5 не существует кодирующих последовательностей.

Следовательно, в одном варианте реализации область В_х соединена непосредственно с основанием L5, которое представляет, например, начало кодирующей последовательности гена L5.

Следовательно, в одном варианте реализации область В_х соединена непосредственно с основанием L5, которое представляет, например, начало некодирующей последовательности, или соединена непосредственно с некодирующей областью, связанной с L5 в природных условиях. В настоящем документе некодирующая область, связанная в природных условиях с L5, относится к части всех некодирующих областей, которая является частью гена L5 или является смежной с ним, но не является частью другого гена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область В_х содержит последовательность SEQ ID NO: 10. Указанная последовательность представляет собой искусственную некодирующую последовательность, в которую может быть вставлена последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или кассету с трансгеном), сайт рестрикции или их комбинацию. Указанная последовательность является предпочтительной, поскольку она действует как буфер, который обеспечивает некоторую гибкость в отношении точного местоположения трансгена, при этом сводя к минимуму нежелательное воздействие на стабильность и жизнеспособность вируса.

Вставка(и) может происходить в любом месте в пределах последовательности SEQ ID NO: 10, на 5'-конце, 3'-конце или в любой точке на участке от 1 до 201 п.н., например, между парами оснований

1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12,
 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26,
 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, 34/35, 35/36, 36/37, 37/38, 38/39, 39/40,
 40/41, 41/42, 42/43, 43/44, 44/45, 45/46, 46/47, 47/48, 48/49, 49/50, 50/51, 51/52, 52/53, 53/54,
 54/55, 55/56, 56/57, 57/58, 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 63/64, 64/65, 65/66, 66/67, 67/68,
 68/69, 69/70, 70/71, 71/72, 72/73, 73/74, 74/75, 75/76, 76/77, 77/78, 78/79, 79/80, 80/81, 81/82,
 82/83, 83/84, 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 88/89, 89/90, 90/91, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96,
 96/97, 97/98, 98/99, 99/100, 100/101, 101/102, 102/103, 103/104, 104/105, 105/106, 106/107,
 107/108, 108/109, 109/110, 110/111, 111/112, 112/113, 113/114, 114/115, 115/116, 116/117,
 117/118, 118/119, 119/120, 120/121, 121/122, 122/123, 123/124, 124/125, 125/126, 126/127,
 127/128, 128/129, 129/130, 130/131, 131/132, 132/133, 133/134, 134/135, 135/136, 136/137,
 137/138, 138/139, 139/140, 140/141, 141/142, 142/143, 143/144, 144/145, 145/146, 146/147,
 147/148, 148/149, 150/151, 151/152, 152/153, 153/154, 154/155, 155/156, 156/157, 157/158,
 158/159, 159/160, 160/161, 161/162, 162/163, 163/164, 164/165, 165/166, 166/167, 167/168,
 168/169, 169/170, 170/171, 171/172, 172/173, 173/174, 174/175, 175/176, 176/177, 177/178,
 178/179, 179/180, 180/181, 181/182, 182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188,
 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195, 195/196, 196/197, 197/198, 198/199,
 199/200 или 200/201.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область ВХ содержит последовательность SEQ ID NO: 10 с последовательность ДНК, вставленной между положениями 27 и 28 п.н. или в месте между положениями 28192 и 28193 п.н. последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка представляет собой вставку сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции и по меньшей мере один трансген, например один, два или три трансгена, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения два сайта рестрикции фланкируют один или более, например два трансгена (например, в кассете с трансгеном). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, если ВХ содержит два сайта рестрикции, то указанные сайты рестрикции отличаются друг от друга. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более указанных сайтов рестрикции в ВХ являются неприродными для конкретного генома аденовируса, в который они были вставлены. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более указанных сайтов рестрикции в ВХ отличаются от других сайтов рестрикции, расположенных в другом месте в геноме аденовируса, например отличаются от природных сайтов рестрикции и/или сайтов рестрикции, введенных в другие части генома, например сайта рестрикции, введенного в ВУ. Следовательно, в одном варианте реализации сайт или сайты рестрикции обеспечивают специфичное разрезание ДНК в указанном участке.

Предпочтительно использование "уникальных" сайтов рестрикции обеспечивает селективность и контроль места разрезания генома вируса путем использования только соответствующего фермента рестрикции.

В настоящем документе термин "специфичное разрезание" относится к использованию фермента, специфичного для сайта рестрикции, чтобы разрезать вирус только в нужном месте, как правило, в одном месте, хотя в некоторых случаях разрез может происходить в двух местах. В настоящем документе термин "два места" рестрикции относится к двум сайтам рестрикции, расположенным в непосредственной близости друг от друга, которые сконструированы для разрезания одним и тем же ферментом (т.е. не могут быть разграничены друг от друга).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции представляет собой последовательность SEQ ID NO: 55.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ВХ содержит последовательность от 28166 до 28366 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ВХ представляет собой связь.

В настоящем документе ВВ относится к последовательности ДНК, кодирующей область L5. В настоящем документе область L5 относится к последовательности ДНК, содержащей ген, кодирующий полипептид/белок фибриллы, в зависимости от конкретного случая. Ген/область фибриллы кодирует белок фибриллы, который является основным компонентом капсида аденовирусов. Фибрилла участвует в распознавании рецепторов и обеспечивает способность аденовируса селективно связываться и инфицировать клетки.

В вирусах согласно настоящему изобретению фибрилла может быть получена из любого серотипа аденовируса и аденовирусов, которые являются химерными в результате замены фибриллой фибриллы одного из различных известных серотипов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фибрилла получена из вируса группы В, в частности, АВ11, такого как АВ11р.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область В_γ содержит последовательность от 28367 до 29344 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе последовательность ДНК по отношению к В_γ относится к последовательности ДНК, расположенной в непосредственной близости от 3'-конца гена L5 области В_γ. В настоящем документе термин "в непосредственной близости" или "вблизи" по отношению к 3'-концу гена L5 относится к смежному положению (непрерывному) с 3'-концом гена L5 или некодирующей области, исходно связанной с ним, т.е. положению, соединенному или примыкающему к 3'-концу гена L5 или его некодирующей области, исходно связанной с ним (т.е. всей или части некодирующей последовательности, эндогенной для L5). В другом варианте термин "в непосредственной близости" или "вблизи" может относиться положению, расположенному вблизи гена L5, так, что между областью В_γ и 3'-концом гена L5 отсутствуют кодирующие последовательности.

Следовательно, в одном варианте реализации область В_γ присоединена непосредственно к основанию L5, которое представляет собой "конец" кодирующей последовательности.

Следовательно, в одном варианте реализации область В_γ присоединена непосредственно к основанию L5, которое представляет собой "конец" некодирующей последовательности, или присоединена непосредственно к некодирующей области, исходно связанной с L5.

В настоящем документе термины "исходный" и "природный" используются взаимозаменяемо. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область В_γ содержит последовательность SEQ ID NO: 11. Указанная последовательность представляет собой некодирующую последовательность, в которую может быть вставлена последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или кассету с трансгеном), сайт рестрикции или их комбинацию. Указанная последовательность является предпочтительной, поскольку она действует как буфер, который обеспечивает некоторую гибкость в отношении точного местоположения трансгена, при этом сводя к минимуму нежелательное воздействие на стабильность и жизнеспособность вируса.

Вставка(и) может происходить в любом месте в пределах последовательности SEQ ID NO: 11, на 5'-конце, 3'-конце или в любой точке участка от 1 до 35 п.н., например, между парами оснований 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34 или 34/35.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В_γ содержит последовательность SEQ ID NO: 11, содержащую последовательность ДНК, которая вставлена между положениями 12 и 13 п.н., или в место, соответствующее положению между 29356 и 29357 п.н. в последовательности SEQ ID NO: 12. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка представляет собой вставку сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два, или три трансгена, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сайт рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 19 п.н., содержащую 2 сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции представляет собой вставку сайта рестрикции размером 9 п.н., содержащую 1 сайт рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения два сайта рестрикции фланкируют один или более, например, два трансгена (например, в кассете с трансгеном). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, если область В_γ содержит два сайта рестрикции, то указанные сайты рестрикции отличаются друг от друга. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более указанных сайтов рестрикции в В_γ являются

неприродными (например, уникальными) в конкретном геноме аденовируса, в который они были вставлены. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более указанных сайтов рестрикции в В_У отличаются от других сайтов рестрикции, расположенных в другом месте в геноме аденовируса, например, отличаются от природных сайтов рестрикции или сайтов рестрикции, введенных в другие части генома, например, В_Х. Следовательно, в одном варианте реализации сайт или сайты рестрикции обеспечивают специфичное вырезание ДНК в этом участке.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка сайта рестрикции представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 54.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В_У содержит последовательность от 29345 до 29379 п.н. последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В_У представляет собой связь.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка расположена после 12 п.н. в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка расположена приблизительно в положении 29356 п.н. последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вставка представляет собой кассету с трансгеном, содержащую один или более трансгенов, например 1, 2 или 3, например 1 или 2 трансгена.

В настоящем документе область Е4 относится к последовательности ДНК, кодирующей часть или всю область Е4 аденовируса (т.е. область полипептида/белка), которая может быть мутирована так, что белок, кодируемый геном Е4, содержит консервативные или неконсервативные замены аминокислот и имеет функцию, аналогичную таковой для дикого типа (соответствующего немутированного белка); повышенную функцию по сравнению с белком дикого типа; сниженную функцию, например, отсутствие функции по сравнению с белком дикого типа, или имеет новую функцию по сравнению с белком дикого типа или их комбинацию, в зависимости от конкретного случая.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область Е4 частично удалена, например, удалено 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5% области. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения область Е4 содержит последовательность от 32188 до 29380 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В₃ представляет собой связь, т.е. Е4 отсутствует.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения В₃ содержит последовательность от 32188 до 29380 п.н. из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В настоящем документе используемые диапазоны номеров указаны с учетом конечных точек.

Специалист в данной области техники поймет, что элементы в формулах, представленных в настоящей заявке, таких как формулы (I), (Ia), (Ib), (Ic), (Id) и (Ie), являются смежными и могут включать некодирующие последовательности ДНК, а также гены и кодирующие последовательности ДНК (структурные элементы), упомянутые в настоящей заявке. В одном или более вариантах реализации формулы согласно настоящему изобретению предназначены для описания природной последовательности в геноме аденовируса. Применительно к формулам согласно настоящему изобретению, специалист в данной области техники поймет, что формулы относятся к основным элементам, характеризующим соответствующую часть генома, и не предназначены для исчерпывающего описания геномного участка ДНК.

В настоящем документе каждая из областей Е1А, Е1В, Е3 и Е4 независимо относится к дикому типу и его эквивалентам, мутированным или частично удаленным формам каждой области, описанным в настоящем документе, в частности, последовательностям дикого типа из известного аденовируса. В настоящем документе термин "вставка" относится к последовательности ДНК, которая вставлена на 5'-конце, 3'-конце или в пределах конкретного эталонного сегмента последовательности ДНК так, что вставка прерывает эталонную последовательность. Указанная эталонная последовательность представляет собой эталонную последовательность, которая используется в качестве опорной точки, относительно которой расположена вставка. Применительно к настоящему описанию вставка, как правило, происходит в пределах любой из последовательностей SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. Вставка может представлять собой вставку сайта рестрикции, кассеты с трансгеном или обоих указанных элементов. В том случае, если последовательность прервана, вирус по-прежнему будет содержать исходную последовательность, но, как правило, она будет состоять из двух фрагментов, фланкирующих вставку.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или кассета с трансгеном не содержит встраиваемый транспозон с фиксацией положения, такой как транспозон TN7 или его часть. В настоящем документе транспозон TN7 относится к встраиваемому транспозону с фиксацией положения, описанному в WO 2008/080003.

Сайты рестрикции.

Сайты рестрикции в местах, раскрытых в настоящем документе (например, в В_Х и/или В_У), можно применять в вирусах и конструкциях согласно настоящему изобретению, таких как плазмиды, поскольку они обеспечивают быстрое и, например, селективное изменение трансгена, если сайты рестрикции вокруг трансгена(ов) являются уникальными.

В настоящем документе термин "уникальный" относится только к одному появлению во всем вирусе или конструкции.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или кассета с трансгеном содержит сайт рестрикции на каждом конце, обеспечивая тем самым возможность замены кассеты.

Сайт рестрикции представляет собой положение в последовательности ДНК, которое может быть вырезано ферментом рестрикции, обычно фермент специфичен в отношении последовательности. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сайт рестрикции содержит от 3 до 22 пар оснований, например от 4 до 22, например 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22 пары оснований. Примеры сайтов рестрикции, разрезаемых ферментами рестрикции, включают, но не ограничиваются ими:

последовательность GCGGCCGC, которая разрезается NotI и CciNI, оставляющими липкие 5'-концы GGCC;

последовательность GGCCGGCC, которая разрезается FseI и RgiI, оставляющими липкие 3'-концы CCGG;

последовательность GCGATCGC, которая разрезается AsiSI, RgaI, SgfI и SfaAI, оставляющими липкие 3'-концы AT;

последовательность CCTGCAGG, которая разрезается SbfI, SdaI и Sse8387I, оставляющими липкие 3'-концы TGCA;

последовательность TGATCA, которая разрезается Bell, FbaI, Ksp221 и BsiQ1, оставляющими липкие 5'-концы GATC;

последовательность CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG [SEQ ID NO: 74], которая разрезается I-CreI, оставляющим липкие 3'-концы GTGA;

последовательность TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA [SEQ ID NO: 75], которая разрезается I-CeuI, оставляющим липкие 3'-концы CTAA;

последовательность TAGGGATAACAGGGTAAT [SEQ ID NO: 76], которая разрезается I-SceI, оставляющим липкие 3'-концы ATAA;

последовательность GCCCGGGC, которая разрезается SrfI, оставляющим тупые концы;

последовательность GTTTAAAC, которая разрезается MssI и PmeI, оставляющими тупые концы;

последовательность ATTTAAAT, которая разрезается SwaI и SmlI, оставляющими тупые концы;

последовательность GGCGCGCC, которая разрезается AscI, PaeAI и SgsI, оставляющими липкие 5'-концы CGCG.

Другие ферменты рестрикции, которые разрезают аналогичные сайты распознавания, также могут быть пригодны.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более сайтов рестрикции в В_X и В_Y независимо выбраны из сайта рестрикции, специфичного для фермента, описанного в настоящем документе, например NotI, FseI, AsiSI, SgfI и SbfI, в частности, вставленные сайты рестрикции различаются, например сайты, специфичные для NotI, и сайты, специфичные для FseI, расположены в В_X, а SgfI и SbfI расположены в В_Y.

Как уже обсуждалось выше, в одном варианте реализации В_X и/или В_Y не содержит сайт рестрикции. Предпочтительно вирусы и конструкции согласно настоящему изобретению могут быть получены без рестрикционных сайтов, например, с использованием синтетических методик. Указанные методики обеспечивают большую гибкость в создании вирусов и конструкций. Помимо этого, авторы настоящего изобретения установили, что свойства вирусов и конструкций не ослабевают, если они получены с помощью синтетических методик.

Промоторы.

В настоящем документе термин "промотор" означает область ДНК, которая инициирует транскрипцию конкретного гена или генов. Промоторы, как правило, расположены проксимально по отношению к генам, транскрипцию которых они инициируют, на той же цепи и в направлении 5'-конца (т.е. 5') на ДНК. Применительно к положению в последовательности термин "проксимальный" означает достаточно близкое положение, чтобы функционировать в качестве промотора. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения промотор находится в пределах 100 п.н. относительно сайта начала транскрипции. Соответственно, в настоящем документе эндогенный промотор относится к промотору, который присутствует в природных условиях (т.е. является нативным) в аденовирусе (или конструкции), в которую вставлен трансген. В одном или более вариантах реализации использованный эндогенный промотор представляет собой природный промотор вируса в его исходном местоположении в геноме вируса, в частности, он является основным или единственным промотором, используемым при экспрессии трансгена или трансгенов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения эндогенный промотор, используемый для усиления трансляции и необязательно транскрипции трансгена, является единственным, т.е. указанный промотор является единственным, интегрированным в геном аденовируса, и ранее не был введен с помощью рекомбинантных методик.

В настоящем документе термин "под контролем эндогенного промотора" относится к положению, в котором трансген/кассета с трансгеном вставлена в соответствующей ориентации, чтобы находиться под

контролем указанного эндогенного промотора. Иными словами, в том случае, если промотор находится на антисмысловой цепи, кассета вставлена, например, в антисмысловой ориентации.

С учетом вышесказанного гены могут быть экспрессированы в одной из двух ориентаций. Тем не менее, как правило, одна ориентация обеспечивает повышенные уровни экспрессии по сравнению с другой ориентацией для данного (конкретного) трансгена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета находится в смысловой ориентации. Иными словами, кассета транскрибируется в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета находится в антисмысловой ориентации. Иными словами, кассета транскрибируется в направлении от 3'-конца к 5'-концу.

Эндогенные промоторы в вирусе можно, например, применять с использованием гена, кодирующего трансген и акцепторную последовательность сплайсинга. Следовательно, в одном варианте реализации кассета будет содержать акцепторную последовательность сплайсинга, если она находится под контролем эндогенного промотора. Следовательно, в одном варианте реализации кодирующая последовательность, например последовательность, кодирующая антигено или его антигенсвязывающий фрагмент, дополнительно содержит акцепторную последовательность сплайсинга.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген, трансгены или кассета с трансгеном находятся под контролем промотора E4 или основного промотора поздних генов, такого как основной промотор поздних генов (промотор ML).

В настоящем документе термин "под контролем" означает, что трансген активируется, т.е. транскрибируется в соответствии с управляющими сигналами конкретного промотора.

В настоящем документе термин "основной промотор поздних генов" (промотор ML или MLP) относится к промотору аденовируса, который контролирует экспрессию "поздно экспрессируемых" генов, таких как ген L5. MLP является промотором "смысловой цепи". Иными словами, промотор воздействует на гены, которые расположены после промотора в направлении от 5'-конца к 3'-концу. В настоящем документе основной промотор поздних генов относится к исходному основному промотору поздних генов, расположенному в геноме вируса.

В настоящем документе промотор E4 относится к аденовирусному промотору области E4. Область E4 представляет собой антисмысловую область, поэтому промотор представляет собой антисмысловой промотор. Иными словами, промотор расположен перед областью E4 в направлении от 3'- к 5'-концу. В связи с этим любая кассета с трансгеном, которая находится под контролем промотора E4, возможно, должна быть ориентирована соответствующим образом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета, которая находится под контролем промотора E4, находится в антисмысловой ориентации. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета находится под контролем промотора E4 в смысловой ориентации. В настоящем документе промотор E4 относится к исходному промотору E4, расположенному в геноме вируса.

Следовательно, в одном варианте реализации предложен онколитический аденовирус серотипа 11 компетентный по репликации (например, AB11p) или его вирусное производное, в котором фибрилла, гексон и капсид относятся к серотипу 11 (например, AB11p), причем вирусный геном содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антигено или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, эндогенного по отношению к аденовирусу, выбранного из промотора E4 и основного промотора поздних генов (т.е. промотора E4 или основного промотора поздних генов), так, что трансген не нарушает репликацию вируса, например, промотора, связанного с областью L5 (т.е. расположенного в направлении 5'- или 3'-конца относительно указанной области), например, расположенного в направлении 3'-конца относительно L5 в геноме вируса, например, как показано в последовательностях, приведенных в SEQ ID NO: 1-9, 46, 48-53, 56-63, 66-69 и 72-73.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения эндогенный промотор вводят в вирусный геном в желаемом месте с помощью рекомбинантных методик, например, вводят в виде кассеты с трансгеном. Однако применительно к настоящему изобретению такое расположение, как правило, будет упоминаться как экзогенный промотор.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном содержит экзогенный промотор. В настоящем документе термин "экзогенный промотор" относится к промотору, не являющемуся природным для аденовируса, в который встраивают трансген. Как правило, экзогенные промоторы получены из других вирусов или представляют собой промоторы млекопитающих. В настоящем документе экзогенный промотор означает элемент ДНК, обычно расположенный в направлении 5'-конца относительно представляющего интерес гена, который регулирует транскрипцию этого гена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения регулятор экспрессии гена представляет собой экзогенный промотор, например промотор ЦМВ (цитомегаловируса), СВА (промотор куриного бета-актина) или PGK (промотор фосфоглицераткиназы 1), например промотор ЦМВ.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный экзогенный промотор ЦМВ имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 13. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный экзогенный промотор PGK имеет нуклеотид-

ную последовательность согласно SEQ ID NO: 14. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный экзогенный промотор CBA имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 15.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен онколитический аденовирус серотипа 11, компетентный по репликации (например, AB11p), или его вирусное производное, в котором фибрилла, гексон и капсид получены из серотипа 11 (например, AB11p), причем вирусный геном содержит последовательность ДНК, кодирующую терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, расположенный в части генома вируса, которая экспрессируется позже в конце цикла репликации вируса и так, что трансген не нарушает репликацию вируса, при этом указанная последовательность ДНК находится под контролем промотора, экзогенного по отношению к аденовирусу (например, промотора ЦМВ). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность ДНК, кодирующая антитело или фрагмент, связана с областью L5, как описано в настоящем документе в другом месте.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экзогенный промотор представляет собой промотор антигенпредставляющих клеток. В настоящем документе промотор антигенпредставляющих клеток относится к промотору гена, который селективно экспрессируется антигенпредставляющими клетками, такими как дендритные клетки или макрофаги. Такие гены включают, но не ограничиваются ими, FLT-3, лиганд FLT-3, TLR, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, лиганд GITR, IFN- α 2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, рецептор TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 или CD304; медиаторы процессинга и представления антигена, такие как CTIIA или GILT. Следовательно, в одном варианте реализации экзогенный промотор подходит для селективной экспрессии трансгенов в указанных антигенпредставляющих клетках.

Другие регуляторные последовательности

В настоящем документе термин "регулятор экспрессии генов" (или регулятор/регуляторный элемент) относится к генетическому элементу, такому как промотор, энхансер или акцепторная последовательность сплайсинга, который играет определенную роль в экспрессии генов, как правило, путем инициирования или усиления транскрипции или трансляции.

В настоящем документе термины "акцепторная последовательность сплайсинга", "сплайс-акцептор" или "сайт сплайсинга" относятся к регуляторной последовательности, определяющей, когда молекула мРНК будет распознана небольшими ядерными рибонуклеопротеинами сплайсосомного комплекса. После сборки сплайсосомы катализирует сплайсинг между акцепторным сайтом сплайсинга молекулы мРНК и донорным сайтом сплайсинга, расположенным в направлении 5'-конца относительно акцепторного сайта, с образованием зрелой молекулы мРНК, которая может быть транслирована для синтеза отдельного полипептида или белка.

В настоящем изобретении могут быть использованы акцепторные последовательности сплайсинга различного размера, которые могут быть описаны как короткий сплайс-акцептор (малый), сплайс-акцептор (средний) и разветвленный сплайс-акцептор (большой).

В настоящем документе термин "SSA" означает короткий сплайс-акцептор, как правило, содержащий только сайт сплайсинга, например, имеющий в длину 4 пары оснований. В настоящем документе термин "SA" означает сплайс-акцептор, как правило, содержащий короткий сплайс-акцептор и полипиримидиновый участок, например, имеющий в длину 16 пар оснований. В настоящем документе термин "bSA" означает разветвленный сплайс-акцептор, как правило, содержащий короткий сплайс-акцептор, полипиримидиновый участок и точку ветвления, например, имеющий в длину 26 пар оснований.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сплайс-акцептор, использованный в конструкциях согласно настоящему изобретению, приведен в SEQ ID NO: 16-18. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения SSA имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 16. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения SA имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 17. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения bSA имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 18. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения акцепторная последовательность сплайсинга независимо выбрана из группы, включающей:

TGCTAATCTT CCTTCTCTC

TTCAGG (SEQ ID NO: 18), CCTTCTCTCTT CAGG (SEQ ID NO: 17) и CAGG (SEQ ID NO: 16).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения непосредственно после сайта сплайсинга (т.е. в направлении от 5'-конца к 3'-концу) расположена консенсусная последовательность Козак, содержащая CCACC. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения сайт сплайсинга и последовательность Козак разделены участком, содержащим не более чем 100 или менее пар оснований. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность Козак содержит нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 45.

Как правило, если кодирующая последовательность находится под контролем эндогенного или экзогенного промотора (например, эндогенного промотора), то последовательность Козак расположена непосредственно перед указанной кодирующей последовательностью. Начало кодирующей области обозначается иницирующим кодоном (AUG), например, применительно к последовательности (gcc)gccRccAUGg [SEQ ID NO: 77] начало кодирующих последовательностей обозначено основаниями, выделенными жирным шрифтом. Строчная буква обозначает общие основания в этом положении (которые, тем не менее, могут различаться), и заглавные буквы указывают на высококонсервативные основания, т.е. последовательность "AUGG" является константной или редко, почти никогда, подвергается изменению; "R" указывает на то, что в этом положении, как правило, наблюдается пурин (аденин или гуанин), и последовательность в квадратных скобках (gcc) имеет неизвестное значение. Следовательно, в одном варианте реализации изобретения иницирующий кодон AUG включен в последовательность Козак.

В настоящем документе последовательность ДНК участка внутренней посадки рибосомы относится к последовательности ДНК, кодирующей последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). В настоящем документе IRES означает нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает инициацию трансляции последовательности матричной РНК (мРНК), включая инициацию, которая начинается в пределах последовательности мРНК. Указанный способ инициации особенно полезен, если кассета кодирует полицистронные мРНК. Использование IRES приводит к получению полицистронной мРНК, которая транслируется в несколько отдельных белков или пептидов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность ДНК участка внутренней посадки рибосомы имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 19. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конкретная последовательность IRES используется в геноме только один раз. Однократное использование IRES может обеспечивать преимущества в отношении стабильности генома.

В настоящем документе термины "пептид 2A с высокой эффективностью саморасщепления" или "пептид 2A" относятся к пептиду, который эффективно расщепляется после трансляции. Подходящие пептиды 2A включают P2A, F2A, E2A и T2A. Авторы настоящего изобретения заметили, что в случае однократного использования конкретной последовательности ДНК, кодирующей данный пептид 2A, аналогичная конкретная последовательность ДНК не может быть использована повторно. Тем не менее, избыточность кода ДНК может быть использована для получения последовательности ДНК, которая транслируется в аналогичный пептид 2A. Использование пептидов 2A может обеспечить особенное преимущество, если кассета кодирует полицистронную мРНК. Использование пептидов 2A приводит к получению одной транслируемой полипептидной цепи, которая подвергается посттрансляционным модификациям с получением нескольких отдельных белков или пептидов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный кодируемый пептид P2A имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 25. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный кодируемый пептид F2A имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 26. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный кодируемый пептид E2A имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованный кодируемый пептид T2A имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 28.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мРНК или каждая мРНК, кодируемая трансгеном, содержит/содержат последовательность сигнала полиаденилирования, например, как правило, в конце последовательности мРНК, например, как показано в последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 20. Следовательно, один вариант реализации трансгена или кассеты с трансгеном содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую последовательность сигнала полиаденилирования.

В настоящем документе термины "поли(A)", "сигнал полиаденилирования" или "последовательность полиаденилирования" означают последовательность ДНК, как правило, содержащую сайт AATA-АА, которая после транскрипции может быть распознана полибелковым комплексом, расщепляющим и присоединяющим полиадениновую последовательность к синтезируемой молекуле мРНК.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность полиаденилирования имеет нуклеотидную последовательность согласно SEQ ID NO: 20.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения конструкция не включает последовательность полиаденилирования. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения регулятор экспрессии гена представляет собой акцепторную последовательность сплайсинга.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность, кодирующая белок/полипептид/пептид, такой как антитело или фрагмента антитела, дополнительно содержит сигнал полиаденилирования.

Кодируемые трансгенами последовательности.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген или транс гены независимо кодируют белок, пептид, молекулу РНК, например, молекулу РНК. Предпочтительно трансген может

быть доставлен внутрь клетки и затем может быть транскрибирован и, при необходимости, транслирован. Примеры генетического материала, кодируемого трансеном, включают, например, антитела или их связывающие фрагменты, хемокины, цитокины, иммуномодуляторы, ферменты (например, способные конвертировать пролекарство в активный агент) и молекулы РНК-интерференции.

В настоящем документе пептид относится к аминокислотной последовательности, содержащей от 2 до 50 остатков, например от 5 до 20 остатков. В настоящем документе полипептид относится к аминокислотной последовательности, содержащей более 50 остатков без третичной структуры, в частности без вторичной и третичной структуры. Белок относится к аминокислотной последовательности, содержащей более 50 остатков, имеющей вторичную и/или третичную структуру, в частности вторичную и третичную структуру.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кодирующая последовательность кодирует терапевтическую РНК, терапевтический пептид, терапевтический полипептид или терапевтический белок (т.е. представляет собой терапевтический ген).

В настоящем документе термин "терапевтический ген" означает ген, кодирующий молекулу, которую можно применять для лечения, облегчения или предотвращения заболевания, например ген экспрессирует терапевтический белок, полипептид, пептид или РНК, которая по меньшей мере замедляет, останавливает или обращает прогрессирование заболевания, такого как рак.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения молекула, кодируемая трансеном, при транскрипции или трансляции в клетке, такой как раковая клетка, увеличивает выработку сигналов опасности клеткой. В настоящем документе термин "сигналы опасности" относится к различным молекулам, вырабатываемым клетками, подвергающимися травме, стрессу или неапоптотической гибели, которые действуют как сигналы тревоги, например стимулируя прямую реакцию клеток врожденной иммунной системы, а также служат для усиления активации клеток адаптивной иммунной системы.

Известно, что микросреда опухоли часто изменяется так, что природные иммунные реакции человека подавляются. Следовательно, возможность повторного запуска иммунных реакций внутри опухоли потенциально является очень перспективной в лечении рака.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кодируемый терапевтический пептид или белок предназначен для секреции во внеклеточную среду. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения функциональная РНК, пептид, полипептид или белок, такой как антитело, высвобождаются во внешнюю микросреду клетки, например в супернатант культуры, или в условиях *in vivo*: в ткань, строму, кровоток, кровеносную и/или лимфатическую систему.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения пептид, полипептид или белок, кодируемый трансеном, содержит сигнальную последовательность. В настоящем документе термин "сигнальный пептид" относится к короткой пептидной последовательности, содержащей 13-36 остатков, расположенной на N-конце белков, которая способствует включению белка в секреторный путь для секреции или мембранной экспрессии. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения лидерная последовательность (сигнальный пептид) имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 21 или 22.

В другом варианте реализации кодируемый терапевтический пептид или белок, такой как антитело, предназначен для экспрессии в закрепленной на мембране форме на поверхностной мембране клетки, например, путем включения кодируемого трансмембранного домена в указанный белок или сайта для прикрепления липидного мембранного якоря.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения функциональная РНК, пептид, полипептид или белок, такой как антитело, высвобождается из клетки, инфицированной аденовирусом, например, путем активной секреции или в результате лизиса клеток. Следовательно, в одном варианте реализации изобретения аденовирус лизирует клетку, высвобождая тем самым функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, такой как антитело.

В другом варианте реализации кодируемый терапевтический пептид или белок, такой как антитело, предназначен для удержания в интактной клетке.

Предпочтительно функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, например антитела, экспрессируемые аденовирусами согласно настоящему изобретению, можно детектировать в ткани в условиях *in vivo* в виде мРНК (см. фиг. 16, 41C) и белка антитела (см. фиг. 17A, 35B). Помимо этого, экспрессируемая функциональная РНК, пептид или белок, такой как антитело, может связываться со своим лигандом при исследовании с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) (см. фиг. 17B). Также функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, такой как антитело, можно детектировать на ранних этапах (в течение 3 суток после инфицирования, см. фиг. 18B), и экспрессия поддерживается в течение нескольких недель (см. фиг. 17 и 18B).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирусы согласно настоящему изобретению экспрессируют функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, например антитела, в течение приблизительно 3 или более суток инфекции, например в пределах приблизительно 36, 48, 60 или 72 ч или, например, 2, 3, 4, 5 или 6 суток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирусы согласно настоящему изобретению экспрессируют функциональную РНК, пептид, полипептид или белок, например антитела, в течение нескольких недель, например приблизительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель, например в течение 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 или 42 суток.

Предпочтительно уровень экспрессии функциональной РНК, пептида или белка, например уровень экспрессии антитела, является достаточно высоким, чтобы обеспечить возможность детектирования функциональной РНК, пептида, полипептида или белка, такого как антитело, в крови (см. фиг. 19, 35B).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения функциональная РНК, пептид или белок, например, антитела, экспрессируемые аденовирусом согласно настоящему изобретению, поступают в кровоток и/или лимфатическую систему.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус согласно настоящему изобретению представляет собой онколитический вирус, который имеет повышенный терапевтический индекс в отношении раковых клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кодирующая последовательность кодирует функциональную РНК, например, терапевтическую РНК.

В настоящем документе термин "функциональная РНК" относится к РНК, которая имеет функцию, отличную от кодирования белка или пептида, и включает, например, конструкции РНК, подходящие для ингибирования или снижения активности генов, включая молекулы РНК-интерференции, такие как малые шпилечные РНК (мшРНК) и микроРНК (миРНК). В настоящем документе термин "малая шпилечная РНК" относится к короткой РНК-шпильке, которая представляет собой последовательность РНК, образующую крутой шпилька-образный поворот, который может быть использован для подавления экспрессии гена-мишени с помощью РНК-интерференции (РНК-интерференция). В настоящем документе термин "микроРНК" (миРНК) относится к небольшой некодирующей молекуле РНК (содержащей приблизительно 22 нуклеотида), которая осуществляет свою функцию путем спаривания оснований с комплементарными последовательностями в молекуле мРНК, чтобы регулировать экспрессию генов на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. Нити мРНК, связанные с микроРНК, подавляются, поскольку они не могут больше транслироваться рибосомами с образованием белков, и такие комплексы часто активно расформируются клеткой.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген кодирует белок. В настоящем документе белок включает белковый лиганд, белковый рецептор или молекулу антитела.

В настоящем документе белковый лиганд относится к поверхностным мембранным белкам клетки или секретируемым белкам и их связывающим фрагментам, которые связываются или иным образом взаимодействуют с клеточными рецепторами, чтобы оказать влияние на функцию клетки, например, путем стимулирования внутриклеточной передачи сигналов и модулирования транскрипции генов в клетке. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессируемый белок модифицирован так, чтобы экспрессироваться на поверхности клетки и/или секретироваться из клетки.

В одном варианте кодируемый белок представляет собой фермент, например коллагеназу, матриксную металлопротеиназу (например, ММП-2 или 14) или т.п.

Подходящие антитела и фрагменты антител могут быть агонистическими или антагонистическими и включают те, которые обладают противораковой активностью, и те, которые модифицируют ответы клетки-хозяина на рак, например: антитело-агонист или антитело-антагонист или фрагмент антитела может уменьшить васкуляризацию или нормализовать васкуляризацию опухоли. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело-агонисты или другие кодируемые белки могут сделать клетку-хозяина более заметной для врожденного и адаптивного иммунного ответа хозяина, например, путем экспрессии антигенов, сигналов опасности, цитокинов или хемокинов, чтобы привлечь и активировать иммунную систему, или путем связывания с костимулирующими молекулами или молекулами сигнальных путей контрольных точек для усиления адаптивных иммунных ответов.

В настоящем документе термины "терапевтическое антитело" или "антигенсвязывающий фрагмент" относятся к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые при встраивании в онколитический вирус оказывают благоприятное влияние на течение патологического процесса у пациента, например на рак, который лечат.

В настоящем документе термин "благоприятное влияние" относится к желаемому и/или предпочтительному действию антитела, которое экспрессируется в условиях *in vivo*.

Классы терапевтических антител и антигенсвязывающих фрагментов включают антитела к EGF, антитела к VEGF, антитела к PDGF, антитела к CTLA, антитела к PD1, антитела к PDL1 и антитела к FGF.

Зарегистрированные терапевтические антитела, подходящие для встраивания в вирусы согласно настоящему изобретению, включают абциксимаб, адалимумаб, алеmtзумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб ведотин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаб, даклизумаб, денозумаб, экулизумаб, эфаликсумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибригумаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб, муромонаб-CD3, офатумумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тозиту-

моаб и трастуумаб.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательности вариабельных областей используемого антитела или фрагмента антитела гомологичны или идентичны на величину от 95 до 100% последовательностям вариабельных областей бевацизумаба (также известного как авастин®), например гомологичны или идентичны на 96, 97, 98 или 99%.

Подходящими для включения в вирусы согласно настоящему изобретению также являются кодирующие последовательности антител и их связывающих фрагментов, которые одобрены для лечения рака, например трастуумаба, тозитумаба, ритуксимаба, панитумаба, офатумаба, ипилиумаба, ибритуумаба тиуксетана, гемтуумаба, деносуаба, цетуксимаба, брентуксимаба ведотина, авастина и адалимумаба.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательности вариабельных областей используемого антитела или фрагмента антитела гомологичны или идентичны на величину от 95 до 100% последовательностям вариабельных областей известного антитела или антитела, раскрытого в настоящем описании.

В настоящем документе термин "молекула антитела" включает антитела и их связывающие фрагменты.

В настоящем документе термин "антитело" в целом относится к полноразмерному антителу и биспецифичным или полиспецифичным формам, содержащим такое антитело.

Антигенсвязывающий фрагмент включает фрагмент антитела, способный нацелено воздействовать на антиген с аналогичной, сопоставимой или более высокой специфичностью по сравнению с исходным "антителом", из которого он был получен. Фрагменты антител включают Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентные антитела, бис-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитопсвязывающие фрагменты любого из указанных выше (см., например, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы создания и производства описанных фрагментов антител хорошо известны в данной области техники (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Другие фрагменты антител, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают фрагменты Fab и фрагменты Fab', описанные в международных заявках на патент WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171. Поливалентные антитела могут иметь несколько видов специфичности, например могут быть биспецифичными или могут быть моноспецифичными (см., например, WO 92/22853, WO 05/113605, WO 2009/040562 и WO 2010/035012).

В настоящем документе термин "специфичный" предназначен для обозначения антитела или его фрагмента, который распознает только антиген, в отношении которого он специфичен, или для обозначения антитела или его фрагмента, который имеет значительно более высокую аффинность связывания с антигеном, в отношении которого он специфичен, по сравнению с его аффинностью связывания с антигенами, в отношении которых он не является специфичным, например в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз более высокую аффинность связывания.

Известные антитела или связывающие фрагменты антител можно применять для создания альтернативных форм антител, содержащих аналогичные CDR или аналогичные вариабельные области, например, полноразмерное антитело может быть легко преобразовано во фрагмент Fab, Fab' или scFv.

Широкий спектр различных форм антител можно применять в конструкциях согласно настоящему изобретению, включая молекулы антител из животных, не относящихся к человеку, молекулы антител человека, молекулы гуманизированных антител и молекулы химерных антител.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или его связывающий фрагмент является моноклональным. Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области техники, таким как методика гибридом (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), методика триом, методика создания гибридом на основе человеческих В-клеток (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) и методика EBV-гибридом (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, p. 77-96, Alan RLiss, Inc., 1985).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или связывающий фрагмент не является человеческим, т.е. полностью нечеловеческого происхождения. Нечеловеческие антитела пригодны для использования, поскольку антитела и фрагменты могут быть доставлены в раковую клетку с помощью вируса.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело является химерным, например имеет человеческую константную область (области) и нечеловеческие вариабельные области.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или связывающий фрагмент является человеческим, т.е. имеет полностью человеческое происхождение.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело или связывающий фрагмент является гуманизированным. Гуманизированные антитела (которые включают CDR-привитые антитела) представляют собой молекулы антител, содержащие одну или более гипервариабельных областей (CDR) из видов, отличных от человека, и каркасный участок из молекулы иммуноглобулина человека

(см., например, патент США № 5585089; WO 91/09967). Следует принять во внимание, что может потребоваться только перенос остатков, определяющих специфичность, из областей CDR, а не полноразмерной CDR (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Гуманизированные антитела необязательно могут дополнительно содержать один или более остатков каркаса, полученных из вида, отличного от человека, например, из которого получены CDR.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кодирующая последовательность кодирует тяжелую цепь антитела, легкую цепь антитела или фрагмент антитела. В настоящем документе тяжелая цепь (HC) относится к большой полипептидной субъединице антитела. В настоящем документе легкая цепь (LC) относится к малой полипептидной субъединице антитела. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения легкая цепь антитела содержит домен CL, каппа или лямбда типа.

Антитела, пригодные для применения в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники. Антигенный полипептид/белок, включая гибридные белки, в том числе клетки, экспрессирующие (в результате рекомбинантных модификаций или в природных условиях) полипептид (например, активированные Т-клетки), можно использовать для получения антител, которые специфично распознают антиген. Полипептид может представлять собой "зрелый" полипептид или его биологически активный фрагмент или его производное.

Полипептиды, которые можно использовать для иммунизации животного-хозяина, могут быть получены с помощью способов, которые хорошо известны в данной области техники, из генетически модифицированных клеток-хозяев, содержащих системы экспрессии, или они могут быть выделены из природных биологических источников. В настоящем документе термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Указанные термины используются как синонимы, если не указано иное. Антигенный полипептид в некоторых случаях может быть частью более крупного белка, такого как гибридный белок, например гибридный с аффинной меткой.

Антитела, которые вырабатываются против антигенного полипептида, могут быть получены, если требуется иммунизация животного, путем введения полипептидов животному, предпочтительно животному вида, отличного от человека, с использованием хорошо известных и стандартных протоколов, см., например, Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Многие теплокровные животные, такие как кролики, мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи, могут быть иммунизированы. Однако наиболее подходящими, как правило, являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Антитела, пригодные для применения в соответствии с настоящим изобретением, также могут быть получены с использованием способов создания антител из одиночных лимфоцитов, путем клонирования и экспрессии кДНК вариативных областей иммуноглобулинов, полученных из отдельных лимфоцитов, отобранных для получения специфичных антител с помощью, например, способов, описанных в работе Babcock, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15):7843-78481; и в международных заявках на патент WO 92/02551; WO 2004/051268 и WO 2004/106377.

Скрининг антител можно выполнять с использованием количественных способов исследований для измерения связывания с антигеном и/или количественных способов исследований для измерения способности оказывать антагонистическое воздействие на рецептор. Примером количественного исследования связывания является ИФА, в частности, с использованием гибридного белка (необязательно содержащего репортер), который иммобилизован на планшетах, и с использованием конъюгированного вторичного антитела для детектирования антитела к антигену, связанному с гибридным белком.

Домены константной области молекулы антитела согласно настоящему изобретению, если они присутствуют, могут быть выбраны с учетом предполагаемой функции молекулы антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены константной области могут представлять собой домены IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В частности, если молекула антитела предназначена для терапевтического применения и необходимы эффекторные функции антитела, могут быть использованы домены константной области IgG человека, в частности, изоформы IgG1 и IgG3. В другом варианте, если молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не требуются, например, только для агонистической активности или для направленной нейтрализации, могут быть использованы изоформы IgG2 и IgG4. Следует принять во внимание, что также можно использовать варианты последовательностей указанных доменов константной области. Например, можно использовать молекулы IgG4, в котором серин в положении 241 был заменен пролином, описанные в работе Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30(1), 105-108.

Для некоторых функций антитела, например для доставки сигналов активации к клеткам, несущим молекулу-мишень антитела, таким как клетки иммунной системы, предпочтительным может быть использование закрепленных в мембране вариантов антитела так, что антитело будет экспрессироваться на поверхности экспрессирующей клетки. Описанные связывающие молекулы, экспрессируемые на поверхности клетки, обеспечивают эффективные многомерные взаимодействия с сигнальной молекулой-мишенью на поверхности другой клетки, что увеличивает эффективность доставки сигналов активации от молекулы-мишени в клетку-реципиент.

Предпочтительно аденовирусы согласно настоящему изобретению могут экспрессировать полно-размерные антитела и фрагменты scFv антител.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения последовательность, кодирующая антитело или фрагмент антитела, содержит или дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы. В настоящем документе последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES) означает нуклеотидную последовательность, которая обеспечивает инициацию трансляции в середине последовательности матричной РНК (мРНК).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кодируемые терапевтические белки или пептиды представляют собой белки, полипептиды или пептиды, специфичные в отношении мишени.

В настоящем документе термин белки или пептиды, специфичные в отношении мишени, относится к самим белкам-мишеням, или различным белкам или пептидам, которые непосредственно связываются (например, являются специфичными в отношении мишени) или иным образом изменяют уровни белков-мишеней или пептидов-мишеней. Примером первого варианта является цитокин, тогда как примером второго варианта является антитело к этому цитокину.

Мишени, представляющие интерес, как правило, относятся к конкретным клеткам, клеточным путям, антигенам или сигнальным путям, связанным с заболеванием, в частности с раком. Мишень, в зависимости от контекста, также относится к мРНК или аналогичным молекулам, транскрибируемым с гена, кодирующего белок или полипептид, которые, например, можно ингибировать с помощью такой технологии как РНК-интерференция. Следовательно, применительно к молекулам РНК, например РНК-интерференции, мишенью является мРНК, которая кодируется геном указанной мишени.

Примеры мишеней, представляющих интерес, включают, но не ограничиваются ими, стимулирующие корецепторы Т-клеток и их лиганды, молекулы корецепторов, ингибирующих сигнальные пути иммунной контрольной точки Т-клеток, и их лиганды, рецепторы и их лиганды, экспрессируемые регуляторными Т-клетками, супрессорными клетками миелоидного происхождения и иммуносупрессорными иммунными клетками, рецепторы и их лиганды дендритных клеток и антигенпредставляющих клеток, медиаторы процессинга антигена и его представления, цитокины и рецепторы цитокинов, хемокины и рецепторы хемокинов, факторы транскрипции и регуляторы транскрипции, молекулы внутриклеточного транспорта и регуляторы функции клетки, рецепторы и продукты опухолевых клеток и микросреды опухоли, внутриклеточные ферменты опухолевых клеток, такие как IDO, антигены для распознавания иммунными клетками.

Следовательно, согласно одному варианту реализации в настоящем документе термин "мишень" относится к белку или полипептиду, который можно, например, ингибировать, нейтрализовать или активировать, например, с помощью антитела или его связывающего фрагмента, в зависимости от конкретного случая. Применительно к цитокинам мишень относится непосредственно к цитокину или антителу или его связывающему фрагменту, специфичному в отношении цитокина. Следовательно, вирус может кодировать и экспрессировать непосредственно цитокин, поскольку его высвобождение может стимулировать иммунные ответы "хозяина". Применительно к лигандам мутированные формы лиганда могут кодироваться вирусом, который конкурирует с природным лигандом за связывание с рецептором. Мутированный лиганд может иметь повышенную аффинность связывания в отношении рецептора, например, так, что он имеет низкую скорость диссоциации, занимая тем самым рецептор и увеличивая или уменьшая эффективность передачи сигналов с его участием. В другом варианте активность мутированного лиганда может быть уменьшена по сравнению с лигандом дикого типа, снижая тем самым связывание и общую активность передачи сигналов через указанный рецептор по сравнению с природным лигандом.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус или конструкция в соответствии с настоящим изобретением кодирует пролекарство, иммуномодулятор и/или фермент.

В настоящем документе термин "пролекарство" означает молекулу, которую вводят в виде неактивного (или частично активного) производного, которое затем превращается в организме в активный фармакологический агент, часто с помощью обычных метаболических процессов. Пролекарство играет роль предшественника предполагаемого лекарственного препарата. Фермент, превращающий пролекарство, выполняет функцию фермента, который превращает пролекарство в его фармакологически активную форму.

В настоящем документе термин "иммуномодулятор" означает модулятор иммунного ответа. Функция иммуномодуляторов заключается в корректировке иммунного ответа до желаемого уровня, например, при стимуляции иммунитета, подавлении иммунитета или индукции иммунологической толерантности.

В настоящем документе термин "фермент" означает вещество, которое действует в качестве катализатора в живых организмах, регулируя скорость протекания химических реакций, оставаясь при этом неизменным в ходе указанных процессов.

Ниже представлено исчерпывающее обсуждение типичных целевых пептидов/полипептидов и белков.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой одну или более мишеней, независимо выбранных из группы, включающей CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2,

VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT или CD160, например CTLA-4, PD-1, PD-L1 и PD-L2. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело или его связывающий фрагмент, который специфичен в отношении одного элемента из перечисленных. Следовательно, в одном варианте реализации трансген или кассета с трансгеном кодирует антитело или фрагмент антитела, специфичный в отношении CTLA-4, PD-1, PD-L1 или PD-L2. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует антитело или фрагмент антитела, специфичный в отношении CTLA-4, PD-1, PD-L1 или PD-L2.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело представляет собой антитело-ингибитор контрольной точки, например, антитело к PD-L1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует полноразмерное антитело к PD-L1 человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия полноразмерного антитела к PD-L1 человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как основной промотор поздних генов (MLP), в частности, в положении В_У. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует фрагмент scFv антитела к PD-L1 человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия фрагмента scFv антитела к PD-L1 человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как основной промотор поздних генов, в частности, в положении В_У.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела к PD-L1, кодируемого вирусом или конструкцией согласно настоящему изобретению, представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 30. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи антитела к PD-L1 представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 33 или 34. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) антитела к PD-L1 представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 32. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность константной области легкой цепи антитела к PD-L1 представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 35. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фрагмента scFv антитела к PD-L1 представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 37.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен вирус или конструкция в соответствии с настоящим изобретением, кодирующая антитело или его связывающий фрагмент, для полноразмерного антитела или scFv, специфичного в отношении CTLA-4, например, описанного в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой одну или более мишеней, независимо выбранных из группы, состоящей из CD16, CD25, CD33, CD332, CD127, CD31, CD43, CD44, CD162, CD301a, CD301b и галектина-3. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело или его связывающий фрагмент, специфичный в отношении указанных мишеней, например, полноразмерное антитело или scFv.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень, например, которая может подвергаться нацеленному воздействию антитела или связывающего фрагмента, представляет собой одну или более мишеней, независимо выбранных из группы, включающей FLT-3, лиганд FLT-3, TLR, лиганды TLR, CCR7, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, лиганд GITR, IFN- α 2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, рецептор TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 и CD304.

Некоторые лиганды TLR обладают способностью стимулировать иммунные ответы и, например, могут быть использованы в качестве адъювантов. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус кодирует и секретирует лиганд TRL.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень выбрана из медиатора процессинга и представления антигена, например STPA или GILT.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень, например, которая может подвергаться нацеленному воздействию антитела или связывающего фрагмента, представляет собой раковую мишень.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой одну или более мишеней, независимо выбранных из группы, включающей OX40, лиганд OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, лиганд CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS или лиганд ICOS, например CD40 и лиганд CD40.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном кодирует лиганд, содержащий CD40, или лиганд CD40, или антитело, фрагмент антитела, или мшПНК, нацеленную на CD40 или лиганд CD40. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует лиганд, содержащий CD40, или лиганд CD40, или антитело, фрагмент антитела или мшПНК, нацеленную (специфичную в отношении) на CD40 или лиганд CD40.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой одну

или более мишеней, независимо выбранных из группы, включающей IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , TGF- β , лимфотоксин α (LTA) и ГМ-КСФ.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном кодирует антитело или фрагмент антитела, специфичный в отношении IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , TGF- β или лимфотоксина α (LTA). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , TGF- β или лимфотоксин α (LTA).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность IFN- γ представляет собой SEQ ID NO: 41. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность IFN- α представляет собой SEQ ID NO: 42. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность TNF- α представляет собой SEQ ID NO: 40.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой хемокин, например, один или более хемокинов, независимо выбранных из группы, включающей IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CCR2.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кассета с трансгеном кодирует антитело или фрагмент антитела, специфичный в отношении CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 или CXCR4. Применительно к хемокинам мишень включает хемокин, который кодируется и экспрессируется вирусом, например, для индукции или усиления иммунных ответов на рак.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует антитело или фрагмент антитела, специфичный в отношении CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 или CXCR4.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой одну или более мишеней, независимо выбранных из группы, состоящей из членов семейств STAT3, STAT1, STAT4, STAT6, CTIP1, MyD88 и NF κ B, например, белок является мишенью ингибитора, например антитела или его связывающего фрагмента, или мРНК, которая транскрибируется с соответствующего гена, ингибируется под действием такого механизма как РНК-интерференция.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой Hsp70 или регулятор выживаемости и гибели клеток, такой как сурвивин, например, белок является мишенью ингибитора, например, антитела или его связывающего фрагмента, или мРНК, которая транскрибируется с соответствующего гена, ингибируется таким механизмом как РНК-интерференция.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой одну или более мишеней, независимо выбранных из группы, включающей амфигулин, BTC, NRG1a, NRG1b, NRG-3, TGF α , LRIG1, LRIG3, EGF, EGF-L6, эпиген, HB-EGF, EGFR, HER2, HER3 и HER4, например, белок является мишенью ингибитора, например антитела или его связывающего фрагмента, или мРНК, которая транскрибируется с соответствующего гена, ингибируется таким механизмом как РНК-интерференция.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой лиганд или рецептор для одного или более соединений, независимо выбранных из группы, включающей hedgehog, FGF, IGF, Wnt, VEGF, TNF, TGF β , PDGF и Notch.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует антитело или фрагмент антитела, специфичный в отношении VEGF. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антитело представляет собой антитело к VEGF, например антитело, содержащее аминокислотную последовательность антитела бевацизумаба или его эквивалента. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует полноразмерное антитело к VEGF человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия полноразмерного антитела к VEGF человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как основной промотор поздних генов (MLP), в частности, в положении В γ . Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аденовирус экспрессирует фрагмент scFv антитела к VEGF человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения экспрессия фрагмента scFv антитела к VEGF человека находится под контролем эндогенного промотора, такого как основной промотор поздних генов, в частности, в положении В γ . Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность VH цепи антитела к VEGF представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 29. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к VEGF представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 33 или 34. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность VL цепи антитела к VEGF представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 31. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к VEGF представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 32.

довательность константной области легкой цепи антитела к VEGF представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 35. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 36.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой IDO.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мишень представляет собой антиген для распознавания иммунными клетками для одного или более белков или пептидов, независимо выбранных из группы, включающей иммуногенные белки из инфекционных организмов, такие как антигены цитомегаловируса, антигены вируса гриппа, поверхностный антиген гепатита В и основные антигены гепатита В, дифтерийный анатоксин, Ctm197, анатоксин столбняка; пептиды, полученные из антигенов, которые являются известными эпитопами Т-клеток или антител, или генетически модифицированные материалы или мультимеры указанных антигенов; белки опухолевого происхождения, играющие роль антигенов; пептиды, полученные из указанных антигенов, которые являются известными эпитопами Т-клеток или антител; и генетически модифицированные материалы или мультимеры указанных антигенов, например WT1, MUC1, LMP2, идиотип, HPV E6&E7, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, немутированный p53, мутированный p53, NY-ESO-1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, gp100, CEA, MelanA/MART1, мутированный Ras, протеиназу 3 (PR1), bcr-abl, тирозиназу, сурвивин, PSA, hTERT, в частности WT1, MUC1, HER-2/Neu, NY-ESO-1, сурвивин или hTERT.

Специалист в данной области техники поймет, что вследствие избыточности кодонов для последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют данную аминокислотную последовательность, существует множество вариантов, что молчащие мутации оснований нуклеиновой кислоты являются допустимыми, и в область настоящего изобретения включены все последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют конкретную аминокислотную последовательность, определенную в любой из SEQ ID NO.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения пептид, полипептид или белок, кодируемый трансеном, представляет собой мимеотоп. В настоящем документе термин "мимеотоп" представляет собой молекулу, часто пептид, которая имитирует структуру эпитопа. Последнее свойство вызывает иммунный ответ, аналогичный тому, который вызывает эпитоп. Антитело для данного эпитопа антигена будет распознавать мимеотоп, имитирующий данный эпитоп. Мимеотопы обычно получают из библиотек фагов с помощью биопэннинга. Разрабатываются вакцины, в которых используются мимеотопы. Следовательно, антитела с известной специфичностью можно использовать для скрининга библиотек (например, пептидные библиотеки в фаговом дисплее - например, библиотеки последовательностей антител или библиотеки пептидов, не являющихся антителами, в частности, те, которые оптимизированы для получения пептидов с более стабильными трехмерными конформациями). Получение мимеотопов подробно описано в данной области техники (см. Tribbick G., Rodda S. Combinatorial methods for discovery of peptide ligands which bind to antibody-like molecules. *J. Mol. Recognit.* 2002 15(5):306-10; Masuko T., Ohno Y., Masuko K., Yagi H., Uejima S., Takechi M., Hashimoto Y. Towards therapeutic antibodies to membrane oncoproteins by a robust strategy using rats immunized with transfectants expressing target molecules fused to green fluorescent protein. *Cancer Sci.* 2011 102(1):25-35).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения мимеотоп или другие разработанные вакцинные антигены кодируются трансеном и экспрессируются, для того чтобы индуцировать иммунный ответ у пациента-реципиента, при этом индуцированные антитела оказывают желаемое терапевтическое действие. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения гибридные белки GFP-пептид, содержащие пептидные последовательности из желаемого лиганда человека, применяют для индукции аутоиммунных ответов на антитела, например, пептидная область PD-L1, которая, как известно, является важной для связывания с молекулой-мишенью, PD-1, может быть генетически связана с GFP или другими высокоиммуногенными чужеродными белковыми носителями так, что гуморальный иммунный ответ на указанный пептид включает антитела, которые перекрестно реагируют с нативной молекулой PDL1 и блокируют тем самым взаимодействие PD-L1:PD-1 способом, который аналогичен таковому при прямом кодировании антитела к PDL1. Концепции для вакцин, индуцирующих аутоиммунные ответы на терапевтические антитела, подробно описаны в данной области техники (см. Spohn G., Bachmann M.F. Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. *Expert Opin Biol Ther.* 2003, 3(3):469-76; Link A., Bachmann M.F. Immunodrugs: breaking B- but not T-cell tolerance with therapeutic anticytokine vaccines. *Immunotherapy*, 2010, 2(4):561-74; Delavallée L., Assier E., Semerano L., Bessis N., Boissier M.C. Emerging applications of anticytokine vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008, 7(10):1507-17).

В одном или более вариантах реализации использованный трансен кодирует последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 29-44, 67 и 70-71.

Предпочтительно аденовирусы согласно настоящему изобретению экспрессируют и высвобождают варианты антител и другие белки, такие как цитокины, кодируемые трансеном согласно настоящему изобретению, в культуральный супернатант в условиях *in vitro* или в строме опухолевой ткани в условиях *in vivo* (см. фиг. 4-8, 11-12, 16-19, 28-29, 33, 35, 38-40, 42-43, 47, 49, 51).

Лидерные последовательности могут способствовать высвобождению кодируемых белков/полипептида или пептида из раковой клетки. Следовательно, в одном варианте реализации кодируемый "белок" содержит лидерную последовательность. В настоящем документе термин "лидерная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, расположенной между последовательностью промотора и кодирующей областью, которая может регулировать экспрессию генов на уровне транскрипции или трансляции.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения кодирующая последовательность кодирует пептид. В настоящем документе термин "пептид" относится к аминокислотной цепи, которая не является полноразмерным функциональным белком. Как правило, фрагмент представляет собой тот, который сохраняет некоторые или все функции белка, или может быть распознан иммунной системой, например, пептиды, содержащие 8 или более аминокислот, которые могут быть распознаны Т-клетками.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения трансген кодирует ген-репортер, например, визуализирующий агент, включая биолуминесцентные, флуоресцентные визуализирующие агенты (включая активируемые флуоресцентные визуализирующие агенты), такие как люцифераза, GFP или EGFP или красный флуоресцентный белок.

В настоящем документе термин "ген-репортер" или "репортерная последовательность" означает последовательность гена или ДНК, которая производит продукт, легко детектируемый в эукариотических клетках, и может быть использована в качестве маркера для определения активности другого гена, с которым ДНК указанного гена была прочно связана или комбинирована. Гены-репортеры придают клеткам или организмам, экспрессирующим их, характеристики, которые легко выявить и измерить, или представляют собой селективные маркеры. Гены-репортеры часто используют в качестве индикатора поглощения или экспрессии определенного гена клеткой или популяцией организмов. Примеры распространенных генов-репортеров включают, но не ограничиваются ими, ген, кодирующий LacZ, люциферазу, GFP, EGFP, неомифосфотрансферазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, симпортер натрия/йодида (NIS), нитроредуктазу (например, NfsA, NfsB), внутриклеточные металлопротеины, HSV1-tk или рецептор эстрогена.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения генетический материал (в частности, трансген) не кодирует или не экспрессирует ген-репортер, такой как визуализирующий агент, люциферазу, GFP или EGFP.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения аминокислотная последовательность NIS представляет собой последовательность согласно SEQ ID NO: 67.

Вирусы в соответствии с настоящим изобретением могут быть изучены для определения предпочтительного конкретного типа опухоли путем изучения их литической способности в панели опухолевых клеток, например, линии клеток опухоли толстой кишки включают HT-29, DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 и Colo320DM. Любые доступные линии клеток опухоли толстой кишки также будут пригодны для проведения такой оценки.

Линии клеток простаты включают клетки DU145 и PC-3. Линии клеток поджелудочной железы включают клетки Рапс-1. Линии клеток опухоли молочной железы включают линию клеток MDA231, и линии клеток яичников включают линию клеток OVCAR-3. Линии гемопоэтических клеток включают, но не ограничиваются ими, В-лимфоидные клетки Raji и Daudi, эритробластоидные клетки K562, миелоидные клетки U937 и Т-лимфоидные клетки HSB2. Также можно использовать другие доступные линии опухолевых клеток.

В область настоящего изобретения также включены новые последовательности, раскрытые в настоящей заявке. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус описан в любой из последовательностей, раскрытых в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 1-9, SEQ ID NO: 48-53, SEQ ID NO: 56-63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68-69 и SEQ ID NO: 72-73.

Составы.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим составам вируса, описанным в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен жидкий состав для парентерального введения, например для инфузии или инъекции, онколитического вируса, способного к репликации в соответствии с настоящим изобретением, который характеризуется тем, что состав обеспечивает дозу в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц в объеме дозы.

Парентеральный состав означает состав, не предназначенный для доставки через желудочно-кишечный тракт. Типичные парентеральные способы доставки включают инъекцию, имплантацию или инфузию. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения состав обеспечен в форме для болюсного введения.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения парентеральный состав обеспечен в форме раствора для инъекции. В настоящем документе термин "инъекция" включает внутривенную, подкожную, внутриопухолевую или внутримышечную инъекцию. В настоящем документе инъекция означает введение жидкости в организм через шприц. В одном варианте реализации настоящего изобретения способ согласно настоящему изобретению не включает внутриопухолевую инъекцию.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения парентеральный состав обеспечен в форме, пригодной для инфузии.

В настоящем документе термин "инфузия" означает введение жидкостей с более медленной скоростью с помощью капельницы, инфузионного насоса, шприцевого инфузионного насоса или аналогичного устройства. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения инфузию вводят в течение периода времени от 1,5 до 120 мин, например в течение приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или 115 мин.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения одна доза состава имеет объем менее 100 мл, например 30 мл, чтобы обеспечить возможность введения с помощью шприцевого инфузионного насоса.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения инъекцию вводят в виде медленной инъекции, например, в течение периода от 1,5 до 30 мин.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения состав предназначен для внутривенного введения (в/в). Внутривенный путь введения является особенно эффективным для доставки онколитического вируса, поскольку он обеспечивает быстрый доступ к большинству органов и тканей и является особенно полезным для лечения метастазов, например сформировавшихся метастазов, в частности тех, которые расположены в областях с обильным кровоснабжением, таких как печень и легкие.

Терапевтические составы, как правило, будут стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть изготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другого парентерального состава, пригодного для введения человеку, и может быть изготовлена в виде предварительно заполненного устройства, такого как шприц или флакон, в частности, в виде однократной дозы.

Состав, как правило, будет содержать фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, например нетоксичный, изотонический носитель, который совместим с вирусом и в котором вирус является стабильным в течение необходимого периода времени.

Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, а также жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования диспергирующего агента или поверхностно-активного вещества, такого как лецитин, или неионогенного поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80 или 40. Наличие в дисперсиях поверхностно-активного вещества может облегчить поддержание требуемого размера частиц. Примеры изотонических агентов, входящих в состав композиции, включают сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения использованные парентеральные составы могут содержать один или более из следующих компонентов: буфер, например, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту, фосфатный буфер и/или трис-буфер, сахар, например, декстрозу, маннозу, сахарозу или аналогичное соединение, соль, такую как хлорид натрия, хлорид магния или хлорид калия, детергент, такой как неионное поверхностно-активное вещество, такое как *brjji*, PS-80, PS-40 или аналогичное соединение. Состав также может содержать консервант, такой как ЭДТА или этанол или комбинацию ЭДТА и этанола, которые, как полагают, предотвращают один или более путей возможного разрушения состава.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения состав будет содержать очищенный онколитический вирус в соответствии с настоящим изобретением, например, от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу, например от 1×10^{10} до 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения концентрация вируса в составе находится в диапазоне от 2×10^8 до 2×10^{14} вирусных частиц/мл, например 2×10^{12} вирусных частиц/мл.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения парентеральный состав содержит глицерин.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения состав содержит онколитический аденовирус, описанный в настоящем документе, HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту), глицерин и буфер.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения парентеральный состав содержит вирус в соответствии с настоящим изобретением, HEPES, например, в концентрации 5 mM, глицерин, например, 5-20% (об./об.), соляную кислоту, например, для корректировки показателя pH в диапазоне 7-8, и воду для инъекций.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения 0,7 мл вируса в соответствии с настоящим изобретением в концентрации 2×10^{12} вирусных частиц/мл изготавливают в буфере, содержащем 5 mM HEPES, 20% глицерина с конечным значением pH 7,8.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения состав обеспечен в виде состава для местного применения, включая ингаляцию.

Подходящие препараты для ингаляций включают порошки для ингаляций, дозированные аэрозоли, содержащие газы-вытеснители, или растворы для ингаляций, не содержащие газы-вытеснители. Порошки для ингаляций в соответствии с настоящим изобретением, как правило, содержат вирус, описанный в настоящем документе, с физиологически приемлемым вспомогательным веществом.

Порошки для ингаляций могут содержать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси. Предпочтительным является использование моно- или дисахаридов, тогда как лактозу или глюкозу используют главным образом, но не исключительно, в виде их гидратов.

Частицы для осаждения в легких должны иметь размер частиц менее 10 мкм, например, 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности, от 1 до 5 мкм. Размер частиц, несущих вирус, имеет первостепенное значение, и, соответственно, в одном варианте реализации вирус в соответствии с настоящим изобретением может быть адсорбирован или абсорбирован на частице, такой как частица лактозы заданного размера.

Газы-распылители, которые можно использовать для получения аэрозолей для ингаляций, известны в данной области техники. Подходящие газы-распылители выбраны из группы, включающей углеводороды, такие как н-пропан, н-бутан или изобутан, и галогенсодержащие углеводороды, такие как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные газы-распылители можно использовать по отдельности или в виде смесей.

Особенно подходящие газы-распылители включают галогенированные производные алканов, выбранные из группы TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из вышеуказанных галогенированных углеводородов особенно подходящими являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси. Аэрозоли для ингаляций, содержащие газы-распылители, также могут содержать другие ингредиенты, такие как соразтворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (сурфактанты), антиокислители, смазывающие материалы и средства для регулирования показателя pH. Все перечисленные ингредиенты известны в данной области техники.

Аэрозоли для ингаляций, содержащие газы-распылители, в соответствии с настоящим изобретением могут содержать вплоть до 5% по массе активного вещества.

Аэрозоли в соответствии с настоящим изобретением содержат, например, от 0,002 до 5% по массе, от 0,01 до 3% по массе, от 0,015 до 2% по массе, от 0,1 до 2% по массе, от 0,5 до 2% по массе или от 0,5 до 1% по массе активного ингредиента.

В другом варианте местное введение в легкие также можно осуществлять с помощью введения жидкого раствора или суспензии состава, например, с использованием устройства, такого как небулайзер, например небулайзер, соединенный с компрессором (например, небулайзер Pari LC-Jet Plus(R), соединенный с компрессором Pari Master (R) производства Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, Вирджиния, США).

Вирус согласно настоящему изобретению можно доставлять в виде дисперсии в растворителе, например, в виде раствора или суспензии, например, описанных выше для парентеральных составов. Вирус можно суспендировать в соответствующем физиологическом растворе, например физиологическом солевом растворе или других фармакологически приемлемых растворителях или буферных растворах. Буферные растворы, известные в данной области техники, могут содержать от 0,05 до 0,15 мг динатриевой соли ЭДТА, от 8,0 до 9,0 мг NaCl, от 0,15 до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды, чтобы достичь показателя pH от приблизительно 4,0 до 5,0.

Терапевтические составы в виде суспензии или раствора также могут содержать одно или более вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области техники и включают буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Состав, как правило, будет обеспечен по существу в стерильной форме с использованием стерильных способов производства.

Обеспечение стерильной формы может включать изготовление и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для получения состава, асептическое суспендирование антитела в стерильном забуференном растворе растворителя и распределение состава в стерильные сосуды с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

В настоящем изобретении могут быть предложены составы согласно настоящему изобретению для введения с помощью небулайзера, например, в виде единичных стандартных доз (например, герметичные пластиковые контейнеры или флаконы), упакованные в конверты из фольги. Каждый флакон содержит единичную дозу в объеме, например, 2 мл буферного растворителя/раствора.

Лечение.

Согласно другому аспекту в область настоящего изобретения включен вирус или содержащий его состав, описанный в настоящем документе, для применения в лечении, в частности лечении рака.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ лечения предназначен для применения в лечении опухолей.

В настоящем документе термин "опухоль" обозначает патологическую массу ткани, образующуюся в результате чрезмерного деления клеток, которое является неконтролируемым и прогрессирующим, также называемую новообразование. Опухоли могут быть доброкачественными (не раковые) или злокачественными. Опухоль включает все формы рака и метастазов.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой плотную опухоль. Плотная опухоль может быть локализованной или метастазирующей.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения опухоль имеет эпителиальное происхождение.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой злокачественное новообразование, такое как колоректальный рак, гепатома, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак щитовидной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи или рак легких.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения опухоль представляет собой колоректальное злокачественное новообразование.

В настоящем документе термин "злокачественный" означает раковые клетки.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический аденовирус применяют в лечении или предупреждении метастазирования.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения способ или состав в соответствии с настоящим изобретением применяют в лечении рака с лекарственной устойчивостью.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус вводят в комбинации с введением дополнительного вида лечения или терапии рака.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен вирус или состав в соответствии с настоящим изобретением для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака, например рака, описанного выше.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества вируса или состава в соответствии с настоящим изобретением пациенту, нуждающемуся в этом, например пациенту-человеку.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения онколитический вирус или состав в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации с другим видом терапии.

В настоящем документе термин "в комбинации" включает введение онколитического вируса перед, одновременно и/или после лечения или терапии рака.

Терапия рака включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, нацеленную терапию и/или химиотерапию. В настоящем документе лечение рака относится к лечению с использованием терапевтического соединения или биологического агента, например, антитела, предназначенного для лечения рака и/или его поддерживающей терапии.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вид лечения рака выбран из любого другого вида противораковой терапии, включая химиотерапевтический агент, нацеленный противораковый агент, радиотерапию, радиоизотопную терапию или любую их комбинацию.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус согласно настоящему изобретению, такой как онколитический аденовирус, можно применять в качестве предварительного лечения при терапии, такой как операция (неoadъювантная терапия), чтобы уменьшить опухоль, для лечения метастаз и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования. Онколитический аденовирус можно применять после терапии, такой как операция (адъювантная терапия), для лечения метастаз и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования.

В настоящем документе одновременное введение представляет собой введение дополнительного вида лечения рака, в то же время или примерно в то же время, что и состава онколитического аденовируса. Другой вид лечения может быть частью одного и того же состава или может быть введен в виде отдельного состава.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус вводят в комбинации с введением химиотерапевтического агента.

В настоящем документе термин "химиотерапевтический агент" предназначен для обозначения специфических противоопухолевых химических агентов или лекарственных препаратов, которые селективно разрушают злокачественные клетки и ткани, например химиотерапевтические агенты включают алкилирующие агенты, антиметаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы, а также другие противоопухолевые агенты. Другие примеры химиотерапии включают лечение с использованием доксорубина, 5-фторурацила (5-ФУ), паклитаксела, капецитабина, иринотекана и платинов, таких как цисплатин и оксалиплатин. Предпочтительная доза может быть выбрана врачом на основании

характера рака, который лечат.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения терапевтический агент представляет собой ганцикловир, который может облегчить контроль иммунного ответа и/или васкуляризации опухоли.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения один или более видов лечения, используемых в соответствии со способом согласно настоящему изобретению, является метрономным, т.е. представляет собой непрерывное или частое лечение низкими дозами противораковых лекарственных препаратов, которое обычно применяют одновременно с другими способами терапии.

Онколитические аденовирусы подгруппы В, в частности АВ11, и полученные из них вирусы, такие как EnAd, могут оказывать выраженное синергетическое действие с химиотерапевтическими агентами, поскольку, как представляется, механизм их действия в значительной степени не зависит от апоптоза, вызывая гибель раковых клеток с помощью преимущественно некролитического механизма. Более того, подавление иммунитета, которое происходит во время химиотерапии, может позволить онколитическому вирусу функционировать с большей эффективностью.

В настоящем документе терапевтическая доза относится к количеству вируса, такого как онколитический аденовирус, которое является подходящим для достижения желаемого терапевтического действия при применении в соответствии с подходящей схемой лечения, например, облегчает симптомы или условия заболевания. Дозу можно рассматривать как терапевтическую дозу при лечении рака или метастазов, когда количество вирусных частиц может быть достаточным, чтобы привести к следующим результатам: замедление или остановка роста опухоли или метастазов, или уменьшение размера опухоли или метастазов и/или увеличение продолжительности жизни пациента. Величину подходящих терапевтических доз, как правило, подбирают с учетом баланса между терапевтическим действием и переносимой токсичностью, например, если побочный эффект и токсичность являются приемлемыми с учетом клинической пользы, достигнутой при использовании указанной терапии.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус или терапевтическую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением (включая составы, содержащих их) вводят еженедельно, например в течение 1-й недели дозу вводят на 1, 3, 5 сутки с последующим введением 1 дозы каждую следующую неделю.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус или терапевтическую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением (включая составы, содержащие их) вводят в течение двух или трех недель, например, в течение 1-й недели введение осуществляют на 1, 3 и 5 сутки, на 2-й или 3-й неделе введение также осуществляют на 1, 3 и 5 сутки. Указанную схему дозирования можно повторять необходимое количество раз.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирус или терапевтическую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением (включая составы, содержащие их) вводят ежемесячно.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вирусы и конструкции в соответствии с настоящим изобретением получают с помощью рекомбинантных методик. Специалист в данной области техники поймет, что геном аденовируса, несущий трансгены, может быть изготовлен с помощью других технических средств, включая синтез полного генома или плазмиды, содержащей часть всего генома. Специалист в данной области техники поймет, что при синтезе генома область вставки может не содержать нуклеотиды сайта рестрикции, поскольку они являются артефактами встраивания генов с использованием способов клонирования.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения геном аденовируса, несущий трансгены, является полностью синтетическим, например, в соответствии с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 63.

В область настоящего изобретения также включен аденовирус формулы (I) или ее подформулы, который получен или может быть получен в результате вставки трансгена или кассеты с трансгеном.

В настоящем документе термин "является" означает "содержащий".

Применительно к настоящему описанию "содержащий" следует интерпретировать как "включая".

Варианты реализации настоящего изобретения, включающие определенные признаки/элементы, также предназначены для расширения до альтернативных вариантов реализации изобретения "состоящий из" или "по существу состоящий из" соответствующих элементов/признаков.

При наличии технической возможности варианты реализации настоящего изобретения можно комбинировать.

Технические ссылки, такие как патенты и заявки, включены в настоящее описание посредством ссылки. Любые варианты реализации, указанные в настоящем документе в конкретном и явном виде, могут служить основой правовой оговорки как по отдельности, так и в комбинации с другим одним или более вариантами реализации.

Настоящее изобретение далее описано с помощью нижеследующих примеров, приведенных исключительно в иллюстративных целях, которые ссылаются на прилагаемые фигуры.

Описание фигур

На фиг. 1 приведены результаты трансфекции и амплификации вирусных частиц NG-135 в клетках HEK293 после трансфекции геномом вируса NG-135.

Клетки HEK293 трансфицировали очищенной геномной ДНК NG-135 и контролировали выработку вируса путем наблюдения цитопатогенного действия (ЦПД). На изображениях, полученных с помощью микроскопии (А-Е), показано, что ЦПД, которое характеризуется образованием бляшек в монослое клеток, можно было наблюдать через 144 ч после трансфекции, вирус собирали через 216 ч после инфицирования (Е). Собранный вирус амплифицировали в клетках HEK293 и собирали, если ЦПД можно было наблюдать через 72 ч (F-G), затем подвергали амплификации во второй раз и собирали, если ЦПД можно было наблюдать через 48 ч (H-I).

На фиг. 2 приведены результаты трансфекции и амплификации вирусных частиц NG-74 в клетках HEK293 после трансфекции геномом вируса NG-74.

Клетки HEK293 трансфицировали очищенной геномной ДНК NG-74 и контролировали выработку вируса путем наблюдения цитопатогенного действия (ЦПД). На изображениях, полученных с помощью микроскопии (А-J), показано, что ЦПД, которое характеризуется образованием бляшек в монослое клеток, можно было наблюдать через 336 ч после трансфекции, вирус собирали через 384 ч после инфицирования (J). Собранный вирус амплифицировали в клетках HEK293 (K-R) и собирали, если ЦПД можно было наблюдать через 240 ч (R), а затем амплифицировали во второй (S-V), третий (W-X), четвертый (Y-Z) и пятый раз (@) и собирали, когда наблюдали значительное ЦПД.

На фиг. 3 приведены результаты трансфекции и амплификации вирусных частиц NG-73 в клетках HEK293 после трансфекции геномом вируса NG-73.

Клетки HEK293 трансфицировали очищенной геномной ДНК NG-73 и контролировали выработку вируса путем наблюдения цитопатогенного действия (ЦПД). На изображениях, полученных с помощью микроскопии (А-G), показано, что ЦПД, которое характеризуется образованием бляшек в монослое клеток, можно было наблюдать через 144 ч после трансфекции, вирус собирали через 192 ч после инфицирования. Собранный вирус амплифицировали в клетках HEK293 (H) и затем амплифицировали во второй (I-L) и третий (M) раз и собирали, когда наблюдали значительное ЦПД.

На фиг. 4 приведены результаты детектирования с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) антитела к VEGF, секретируемого клетками HEK293, инфицированными NG-135.

Клетки HEK293 инфицировали в условиях *in vitro* в течение 72 ч контрольным вирусом, NG-47 или вирусом NG-135, экспрессирующим антитело к VEGF. Уровни человеческих антител IgG1 к VEGF в культуральных супернатантах измеряли с помощью ИФА с использованием планшетов, покрытых VEGF человека, и детектирующего антитела к IgG-Fc человека (А). Уровни антител определяли количественно с использованием стандартной кривой для очищенного человеческого антитела к VEGF, бевацизумаба (В).

На фиг. 5 приведены результаты детектирования антитела к VEGF, секретируемого из клеток HEK293, инфицированных NG-135, с помощью вестерн-блоттинга.

HEK293 клетки инфицировали в условиях *in vitro* в течение 24 ч вирусом NG-135, экспрессирующим антитело к VEGF. Уровни человеческого антитела IgG1 к VEGF в супернатантах культур оценивали с помощью вестерн-блоттинга, используя детектирующее антитело к IgG человека.

На фиг. 6 приведена стандартная кривая для очищенного человеческого антитела к VEGF, бевацизумаба.

Очищенное человеческое антитело к VEGF, бевацизумаб, серийно разводили и количественно оценивали с помощью ИФА, используя планшеты, покрытые VEGF человека. Количественная оценка позволила установить концентрации, необходимые для получения стандартной кривой для бевацизумаба, для использования в ИФА.

На фиг. 7 приведены результаты детектирования фрагмента scFv антитела к VEGF, секретируемого из клеток HEK293, инфицированных NG-76, с помощью вестерн-блоттинга.

Клетки HEK293 инфицировали вирусом NG-76, культивировали в течение 24 или 44 ч и затем оценивали экспрессию scFv к VEGF с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к гексагистидиновой метке для выявления кодируемого продукта scFv.

На фиг. 8 приведены результаты детектирования фрагмента scFv антитела к VEGF, секретируемого из клеток карциномы толстой кишки, инфицированных NG-76 или NG-78, с помощью вестерн-блоттинга.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 инфицировали вирусами EnAd, NG-76 или NG-78, культивировали в течение 22, 46 или 70 ч и затем оценивали экспрессию scFv к VEGF с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к гексагистидиновой метке для детектирования кодируемого продукта scFv (А).

На фиг. 9 приведены результаты оценки репликации вируса NG-76 через 48 ч после инфицирования клеток HT-29.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 инфицировали с использованием 10 или 1 вирусной частицы NG-76 на клетку (частиц/клетку), культивировали в течение 48 ч и затем оценивали экспрессию

вирусного генома с помощью кПЦР.

На фиг. 10 приведены схемы, на которых показана конструкция кассет с трансгеном, кодирующих антитело к VEGF.

Последовательности полноразмерного антитела (тяжелые и легкие цепи) или фрагментов scFv антитела к VEGF были вставлены в геном EnAd2.4 между сайтами рестрикции Sbf и Sgf, расположенными в направлении 3'-конца относительно гена вируса L5 (нить).

На фиг. 11 приведены результаты, свидетельствующие о том, что репликация и экспрессия генов вируса NG-135 сравнимы с таковыми для EnAd в линиях клеток карциномы толстой кишки.

Линии клеток карциномы толстой кишки человека HT-29 и DLD инфицировали в условиях *in vitro* EnAd или NG-135 и культивировали в течение 3 суток. Оценивали репликацию вируса (измеряли с помощью количественной оценки вирусной ДНК с использованием кПЦР) и экспрессию генов вируса (гексон) (измеряли с помощью оценки количества вирусной РНК с использованием кПЦР-ОТ). Для обоих вирусов были получены сопоставимые данные (А и В).

На фиг. 12 приведены данные, указывающие на детектируемые уровни экспрессии гена, кодирующего антитело к VEGF, в линии клеток карциномы толстой кишки, инфицированных NG-135. Линии клеток карциномы толстой кишки человека HT-29 и DLD инфицировали в условиях *in vitro* EnAd или NG-135, культивировали в течение 3 суток и затем оценивали экспрессию антитела к VEGF путем измерения РНК в клетках с помощью кПЦР-ОТ.

На фиг. 13 показано, что антитело к VEGF присутствует в супернатантах линий клеток карциномы толстой кишки, инфицированных NG-135, и может связываться с hVEGF-165.

Линии клеток карциномы толстой кишки человека HT-29, DLD и HCT-116 инфицировали в условиях *in vitro* EnAd или NG-135 и культивировали в течение 3 суток. Уровни человеческого антитела IgG1 к VEGF в супернатантах культур измеряли с помощью ИФА с использованием планшетов, покрытых VEGF человека, и детектирующего антитела к области Fc IgG человека. Уровни антител были определены количественно с использованием стандартной кривой для очищенного человеческого антитела к VEGF, бевацизумаба.

На фиг. 14 показано, что фрагмент scFv антитела к VEGF, присутствует в супернатантах линий клеток карциномы толстой кишки, инфицированных NG-76, и может связываться с hVEGF-165.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 инфицировали вирусами EnAd, NG-76 или NG-78, культивировали в течение 22, 46 или 70 ч и затем оценивали экспрессию фрагмента scFv антитела к VEGF с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к гексагистидиновой метке для детектирования кодируемого продукта scFv (А). Экспрессию фрагмента scFv в клетках мезонефроса человека оценивали с помощью ИФА по связыванию с VEGF. Специфичность экспрессированного фрагмента scFv в отношении VEGF подтверждали с помощью ингибирования связывания с VEGF путем включения низкой концентрации очищенного человеческого антитела к VEGF, бевацизумаба, при проведении ИФА (В).

На фиг. 15 приведены данные, свидетельствующие о том, что репликация вируса NG-135 сопоставима с таковой для EnAd в модели подкожного ксенотрансплантата с имплантированными клетками DLD.

Клетки карциномы толстой кишки человека DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135. Репликацию вируса в опухолях оценивали на 3, 7 (А, n=4 на каждую временную точку) или 28 сутки после инфицирования (В, n = 10) с помощью кПЦР.

На фиг. 16 приведены уровни экспрессии гена, кодирующего антитело к VEGF, детектированные в модели подкожной опухоли DLD, обработанной NG-135.

Клетки карциномы толстой кишки человека DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu, и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135. Уровни экспрессии гена гексона вируса (А) и гена, кодирующего тяжелые цепи антитела к VEGF (В) (мРНК), оценивали с помощью кПЦР-ОТ РНК опухолевой ткани на 3 и 7 сутки после обработки.

На фиг. 17 приведены данные, свидетельствующие о том, что антитело к VEGF экспрессируется в модели подкожной опухоли DLD, обработанной NG-135.

Клетки карциномы толстой кишки человека DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц EnAd (n=4) или NG-135 (n=8). Опухоли иссекали на 28 сутки после инфицирования, гомогенизировали и растворимые экстракты оценивали с помощью ИФА для определения общего содержания IgG1 человека (А) и антитела к VEGF (В). К экстрактам одной из опухолей EnAd добавляли 8 нг/мл человеческого антитела к VEGF (бевацизумаба) в качестве положительного контроля при проведении каждого ИФА.

На фиг. 18 показано, что инфицирование модели подкожного ксенотрансплантата вирусом NG-135 приводит к экспрессии антитела к VEGF и репликации вируса в опухолях HCT-116.

Клетки карциномы толстой кишки человека HCT-116 имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц

EnAd или NG-135. Опухоли иссекали на 3, 7 и 14 сутки ($n=5$ на каждую временную точку). Репликацию вируса оценивали с помощью кПЦР (А) и тканевую экспрессию антитела к VEGF (IgG1 человека) определяли с помощью ИФА с использованием антитела к IgG человека (В).

На фиг. 19 приведены данные, свидетельствующие о том, что антитело к VEGF можно детектировать в периферическом кровотоке через 28 суток после обработки ксенотрансплантатной модели опухоли вирусом NG-135.

Клетки карциномы толстой кишки человека DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135. Уровни антитела к VEGF в периферическом кровотоке мышей, имеющих опухоли, количественно оценивали с помощью ИФА с использованием антитела к IgG1 человека. Величины оптической плотности при длине волны 450 нм после вычитания неспецифического сигнала приведены на панели (А), концентрацию антитела к VEGF количественно оценивали с помощью стандартной кривой для очищенного человеческого антитела к VEGF, бевацизумаба (В).

На фиг. 20 схематично показаны типичные элементы, которые могут присутствовать в кассете с трансгеном.

На фиг. 21 схематично показаны типичные элементы, кодируемые кассетами с трансгеном.

На фиг. 22 схематично показаны кассеты с трансгеном, кодирующие гены-репортеры.

На фиг. 23 схематично показаны кассеты с трансгеном, кодирующие цитокины.

На фиг. 24 схематично показаны кассеты с трансгеном, кодирующие антитела или домены антител.

На фиг. 25 приведены данные по репликации вируса и экспрессии функционального белка-репортера в линиях клеток карциномы толстой кишки, инфицированных вирусами NG-47 и NG-61.

Клетки линии карциномы толстой кишки человека HT-29 инфицировали в течение 24, 48, 72 или 96 ч вирусами EnAd, или NG-47, или NG-61, которые экспрессируют репортерные белки GFP или люциферазу соответственно. Репликацию вирусов оценивали с помощью кПЦР в каждой временной точке, при этом уровень репликации был сопоставим с таковым для EnAd (А-В). Экспрессию GFP оценивали на основании уровня детектируемой флуоресценции в клеточных лизатах (С).

На фиг. 26 приведены данные, свидетельствующие о том, что онколитическая активность вирусов NG-47 и NG-61 сопоставима с таковой EnAd.

Клетки линии карциномы толстой кишки человека HT-29 инфицировали вирусными частицами EnAd, NG-47 или NG-61. Жизнеспособность инфицированных клеток количественно определяли через 72 ч и наносили на график как процент выживаемости клеток (А-В). Активность обоих вирусов NG-47 и NG-61 была эквивалентна таковой EnAd в линии клеток HT-29 (А-В) и в линиях клеток HT-29, WI38 и MRC5 (С).

На фиг. 27 приведены результаты оценки репликации вируса и экспрессии трансгена в панели вирусов EnAd, экспрессирующих гены-репортеры.

Клетки линии карциномы толстой кишки человека HT-29 инфицировали EnAd или панелью вирусов, которые экспрессируют GFP под контролем экзогенного промотора, ЦМВ, эндогенного основного промотора поздних генов (MLP) или эндогенного промотора E4. Репликацию вируса оценивали через 24, 48, 72 или 96 ч с помощью кПЦР (А) и экспрессию GFP количественно оценивали путем детектирования флуоресценции на планшет-ридере (В).

На фиг. 28 приведены результаты оценки выработки антител к VEGF в линиях клеток карциномы толстой кишки и карциномы легких, инфицированных NG-135.

Линии клеток карциномы толстой кишки человека HT-29 или карциномы легких A549 человека инфицировали в течение 24, 48 или 72 ч вирусными частицами NG-135. Выработку антител оценивали в клеточном супернатанте в каждой временной точке на протяжении 5 мин, 1 или 3 ч с помощью ИФА с использованием антитела к IgG1 (данные для HT-29 представлены на панели А, данные для A549 представлены на панели В). Расчет количества IgG1, которое вырабатывается на 1×10^6 клеток через 24, 48 или 72 ч, приведен в табл. (С).

На фиг. 29 приведены результаты оценки выработки вируса NG-139 и экспрессии TNF- α в линиях клеток карциномы толстой кишки, инфицированных вирусом NG-139. Клетки HT-29 инфицировали вирусом NG-139 в течение 36 ч перед оценкой выработки вируса с помощью визуализации ЦПД и проведением окрашивания для оценки выработки белка вирусного капсида, гексона, с помощью иммуногистохимического метода (ИГХ) (А и В). Выработку TNF- α в супернатантах клеток, инфицированных NG-139, оценивали с помощью ИФА и количественно определяли в таблице, приведенной в (С). Клетки карциномы толстой кишки человека DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu, и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135 с 3 отборами проб. Уровни TNF в опухолях через 15 суток после обработки оценивали с помощью ИФА (D).

На фиг. 30 показана карта структуры генома аденовирусов.

На фиг. 31 приведены результаты оценки репликации вируса NG-61 на 3 сутки и 7 сутки после обработки в модели подкожного ксенотрансплантата с имплантированными клетками DLD.

На фиг. 32 приведены уровни экспрессии трансгена люциферазы в опухолях на 7 сутки после обработки в модели подкожного ксенотрансплантата с имплантированными клетками DLD.

На фиг. 33 приведены результаты оценки репликации вируса NG-135 и экспрессии антитела к VEGF в линиях клеток карциномы толстой кишки, карциномы легких и карциномы яичников.

Линии клеток карциномы HT-29, HCT-116, DLD (толстая кишка), SKOV (яичников) или A549 (легких) инфицировали вирусными частицами NG-135 или EnAd в течение 24-120 ч. Репликацию вирусов оценивали каждые 24 ч с помощью кПЦР и величины максимальной репликации в зависимости от времени наносили на график на панели (А). Выработку антитела к VEGF также измеряли каждые 24 ч с помощью ИФА с использованием антитела к IgG1 человека, и общее содержание антитела, секретируемого в супернатант клеток в каждый момент времени, показано на панели (В).

На фиг. 34 показаны схемы кассет с трансгеном, кодирующих ассоциированный с опухолью антиген, антитела или домены антител.

На фиг. 35 приведены результаты оценки репликации вируса NG-135 и экспрессии антитела к VEGF в эксплантатах, культивируемых в условиях *ex vivo*, подкожных ксенотрансплантатов опухолей HCT-116, инфицированных в условиях *in vivo* с помощью внутриопухолевого введения вируса.

Клетки карциномы толстой кишки человека HCT-116 имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu и в сформированные опухоли вводили 5×10^9 вирусных частиц NG-135. Через 10 суток опухоли иссекали и оценивали уровни вирусного генома (А) и антитела к VEGF (В) до начала культивирования или через 7 суток культивирования в условиях *ex vivo*. Приведены уровни антитела к VEGF в образцах сыворотки крови.

На фиг. 36 приведены результаты оценки репликации вируса NG-135 и его влияния на опухолевые ткани в условиях *in vivo* в мышинной модели опухоли легких A549.

Клетки человека A549 вводили внутривенно мышам линии SCID, чтобы получить узелковые опухоли в легких. Через 8 недель после формирования опухолей, мышам внутривенно вводили вирусы EnAd или NG-135 (5×10^9 частиц) и контролировали их влияние на опухоли в разные моменты времени. Схема дозирования приведена на панели (А). Влияние NG-135 на опухолевую нагрузку в легких (измеренную с помощью кПЦР, специфичной в отношении человеческого гена PTGER2), показано для различных мышей на 3 и 25 сутки после введения препарата на панели (В). На панели (С) приведены уровни вирусных геномов (кПЦР), соотношенные с опухолевой нагрузкой (оценивали с помощью кПЦР, специфичной в отношении человеческого PTGER2). Уровни вирусного генома также оценивали в легких, рассеченных на видимые опухолевые узелки, и в оставшихся тканях легких (D).

На фиг. 37 приведены результаты оценки активности NG-135 и EnAd в мышинной модели ортотопического ксенотрансплантата рака яичников, созданной с использованием клеток карциномы яичников человека SKOV-3, стабильно экспрессирующих люциферазу, которые имплантировали мышам линии CB17-SCID путем внутрибрюшинной инъекции (5×10^6 клеток/мышь). На 22 сутки после имплантации мышей обрабатывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (контроль) или 5×10^7 вирусных частиц EnAd, NG-135 или NG-78, доставленных интраперитонеально, и рост опухоли контролировали по активности люциферазы с зависимости от времени.

На фиг. 38 приведены результаты определения характеристик вируса NG-135 и экспрессированного антитела к VEGF после увеличения масштаба производства и очистки вирусного материала из клеток HEK293, культивируемых в биореакторе. NG-135 был сопоставим по показателям эффективности (А) и репликации (В) со стандартным вирусом EnAd, при этом с течением времени в культуральных супернатантах детектировали увеличение уровней антитела (С). Определение характеристик очищенного антитела с помощью вестерн-блоттинга (D) и Biacore (E) выявило его сопоставимость с выпускаемым в промышленных масштабах антителом к VEGF (авастин).

На фиг. 39 приведены результаты оценки выработки и определения характеристик вирусов EnAd, кодирующих тяжелую и легкую цепи антитела к VEGF, которые соединены саморасщепляющимся пептидом P2A (NG-165), представлены сравнительные данные по вирусной активности (А), репликации (В) и выработке антитела к VEGF для EnAd и NG-135(С).

На фиг. 40 приведены результаты определения характеристик вирусов EnAd, NG-76 и NG-78, кодирующих фрагменты scFv антитела к VEGF под контролем эндогенных или экзогенных промоторов. Оба вируса проявили аналогичную онколитическую активность по сравнению со стандартным EnAd (А и В). Для NG-78 величины непосредственной связывающей активности фрагмента scFv с VEGF в двух фракциях, супернатантах и клеточных лизатах, приведены на панели (С), и результаты исследования конкуренции за связывание с VEGF с коммерческим антителом к VEGF (бевацизумабом) приведены на панели (D).

На фиг. 41 приведены результаты сравнения вирусной активности NG-76 и EnAd у мышей, несущих опухоли, основанные на измерении репликации вируса (А), мПНК гексона (В) и мПНК scFv (С).

На фиг. 42 приведены результаты оценки репликации и экспрессии антитела для вируса NG-135 в клетках HT-29 в зависимости от времени. Секретируемое антитело детектировали через 72 ч для всех исследованных MOI (множественность заражения), однако уровень экспрессии антитела зависит от ис-

ходной величины MOI (A). Показатели выработки антитела и репликации через 24, 48 и 72 ч после инфицирования с использованием 1 или 10 вирусных частиц/клетку приведены на панелях (B-D).

На фиг. 43 приведены результаты оценки репликации NG-135 (A), выработки антитела к VEGF (B) и выработки инфекционных вирусных частиц (C) в клетках карциномы HT-29 и WI38 и MRC5, фибробластах стромы.

На фиг. 44 приведены результаты определения селективной экспрессии репортерного трансгена eGFP, экспрессируемого под контролем экзогенного промотора ЦМВ (NG-47), показанные на панели (B), или эндогенного MLP (NG-107), показанные на панели (D), в первичных дендритных клетках человека. Уровень экспрессии репортерного трансгена eGFP для дендритных клеток, подвергнутых воздействию EnAd, приведен на панели (A), и для неинфицированных контрольных клеток - на панели (C).

На фиг. 45 приведены уровни экспрессии трансгена люциферазы в опухолях и функциональный иммунный ответ на трансген, вирус или опухоль у мышей BALB/c, когда экспрессия трансгена находилась под контролем экзогенного промотора (ЦМВ) (NG-61) или эндогенного промотора MLP (NG-63). В ткани опухоли CT-26, выращенные на боку иммунологически интактных мышей BALB/c, вводили каждый из вирусов и экспрессию люциферазы, которую контролировали путем регистрации люминесцентных изображений с течением времени (A), и Т-клеточные ответы на люциферазу (B), EnAd (C) или антигены опухоли (D) количественно оценивали с помощью ELISPOT.

На фиг. 46 приведены результаты оценки онколитической активности вирусов (A, B) и репликации вирусов (C, D), кодирующих антитела (NG-190) или фрагмент антитела scFv (NG-221) к белку PD-L1, ингибитору системы сигнальных путей иммунной контрольной точки, в сравнении с вирусом EnAd, использованным в качестве стандартного препарата-сравнения.

На фиг. 47 приведены результаты определения характеристик выработки антитела или scFv к PD-L1 (A) и видов активности, направленных на связывание лиганда PD-L1 (B, C, D), в супернатантах клеток HT-29, инфицированных NG190 или NG-221, по сравнению с выработкой и показателями связывания IgG1 для NG-165, вырабатывающего антитело IgG1 к VEGF, в качестве контроля специфичности.

На фиг. 48 приведены величины функциональной активности экспрессированного антитела к PD-L1 в супернатанте клеток A549, инфицированных NG-190, которую оценивали по степени активации Т-клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ), измеренной как количество ИЛ-2 в супернатантах культур. Дендритные клетки, дифференцированные из МНПК двух различных доноров, использовали в качестве стимулирующих клеток с очищенными CD4 Т-клетками, полученными от третьего донора. Усиление Т-клеточного ответа под действием супернатантов, содержащих NG-190, сравнивают с таковым для очищенного моноклонального антитела к PD-L1 и супернатантами культур, инфицированных NG-165.

На фиг. 49 приведены результаты оценки функциональной активности экспрессированного антитела к PD-L1 в супернатанте клеток 293, инфицированных NG-177, по сравнению с NG-135, в качестве контроля специфичности антитела. Оба вируса приводили к выработке сходных уровней IgG1 в клетках 293 (A). Супернатанты NG-177 селективно ингибируют связывание PD-L1 с его лигандом PD1 по сравнению с NG-135 (B), аналогичным образом, супернатанты NG-177 были способны повышать выработку ИЛ-2 в количественном исследовании СКЛ-реакции с использованием моноклонального антитела к PD-L1 в качестве положительного контроля (C).

На фиг. 50 приведены результаты количественного исследования с помощью проточной цитометрии (FACS) активности связывания супернатантов NG-177 с клеточным PD-L1 на поверхности клеток A549, стимулированных интерфероном- γ (ИФН- γ), по сравнению со связыванием очищенного моноклонального антитела к PD-L1 и супернатантов NG-135.

На фиг. 51 приведены результаты определения характеристик вируса EnAd, кодирующего антитело к белку CTLA-4, ингибитору системы сигнальных путей иммунной контрольной точки (NG-242). Репликация вируса была сопоставима с таковой для контрольного EnAd (A). Выработка IgG1 для вируса NG-242 была сопоставима с таковой для NG-135 (B). Функциональная активность антитела к CTLA4 в супернатантах NG242 была показана с помощью непосредственного связывания лиганда (C), по сравнению с контрольными супернатантами NG-165, а также путем ингибирования связывания рекомбинантного CTLA4-Fc с его лигандом B7-1 (D) в экспериментах с использованием ИФА.

На фиг. 52 приведены результаты определения характеристик вирусов, кодирующих ассоциированный с опухолью антиген (TAA), NY-ESO-1 (NG-220). Репликация вируса NG-220 (A) или NG-217 (B) была сопоставима с таковой контрольного вируса EnAd. NY-ESO-1 можно детектировать с помощью вестерн-блоттинга в лизате клеток, инфицированных NG-220, но не в клетках, инфицированных контрольным вирусом EnAd (C).

На фиг. 53 приведены результаты определения характеристик вируса EnAd с уникальными сайтами рестрикции, вставленными в области генома B_x и B_y (NG-185). Онколитическая активность вируса, сопоставленная с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток (A) и репликации вируса (B), была сравнима с таковой для контрольного вируса EnAd.

На фиг. 54 приведены схемы кассет с трансгеном, кодирующих несколько scFv, мшРНК или белок симпортера натрия/йодида.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 - последовательность генома вируса NG-77, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит 5'-концевую разветвленную акцепторную последовательность сплайсинга (bSA), последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, IRES, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 2 - последовательность генома вируса NG-135, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит 5'-концевую короткую акцепторную последовательность сплайсинга (SSA), последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, IRES, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 3 - последовательность генома вируса, содержащая кассету с трансгеном, кодирующую полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит SSA, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, SSA и последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью.

SEQ ID NO: 4 - последовательность генома вируса, содержащая кассету с трансгеном, кодирующую полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит SSA, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, SSA, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 5 - последовательность генома вируса NG-74, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит bSA, последовательность scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 6 - последовательность генома вируса NG-78, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF с С-концевой His₆-меткой, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит bSA, последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую гексагистидиновую последовательность и последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 7 - последовательность генома вируса NG-76, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF с С-концевой His₆-меткой, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит промотор ЦМВ, последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую гексагистидиновую последовательность и последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 8 - последовательность генома вируса NG-73, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит промотор ЦМВ, последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 9 - последовательность генома вируса NG-134, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит промотор ЦМВ, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, IRES, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 10 - последовательность ДНК В_χ, соответствующая и содержащая пары оснований 28166-28366 генома EnAd.

SEQ ID NO: 11 - последовательность ДНК В_γ, соответствующая и содержащая пары оснований 29345-29379 генома EnAd.

SEQ ID NO: 12 - геном EnAd.

SEQ ID NO: 13 - экзогенный промотор ЦМВ.

SEQ ID NO: 14 - экзогенный промотор PGK.

SEQ ID NO: 15 - экзогенный промотор CBA.

SEQ ID NO: 16 - короткий сплайс-акцептор (SSA). Нулевая последовательность.

SEQ ID NO: 17 - сплайс-акцептор (SA).

SEQ ID NO: 18 - разветвленный сплайс-акцептор (bSA).

SEQ ID NO: 19 - последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

SEQ ID NO: 20 - последовательность полиаденилирования.

SEQ ID NO: 21 - лидерная последовательность (HuVH).

SEQ ID NO: 22 - лидерная последовательность (HG3).

SEQ ID NO: 23 - гистидиновая метка.

SEQ ID NO: 24 - метка V5.

- SEQ ID NO: 25 - пептид P2A.
 SEQ ID NO: 26 - пептид F2A.
 SEQ ID NO: 27 - пептид E2A.
 SEQ ID NO: 28 - пептид T2A.
 SEQ ID NO: 29 - аминокислотная последовательность VH цепи антитела к VEGF.
 SEQ ID NO: 30 - аминокислотная последовательность VH цепи антитела к PD-L1.
 SEQ ID NO: 31 - аминокислотная последовательность VL цепи антитела к VEGF.
 SEQ ID NO: 32 - аминокислотная последовательность VL цепи антитела к PD-L1.
 SEQ ID NO: 33 - аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 человека.
 SEQ ID NO: 34 - модифицированная аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 человека.
 SEQ ID NO: 35 - аминокислотная последовательность константной области легкой каппа-цепи человека.
 SEQ ID NO: 36 - аминокислотная последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF.
 SEQ ID NO: 37 - аминокислотная последовательность фрагмента scFv антитела PD-L1.
 SEQ ID NO: 38 - аминокислотная последовательность зеленого флуоресцентного белка.
 SEQ ID NO: 39 - аминокислотная последовательность люциферазы.
 SEQ ID NO: 40 - аминокислотная последовательность человеческого фактора некроза опухоли альфа (TNF- α).
 SEQ ID NO: 41 - аминокислотная последовательность человеческого интерферона- γ (ИФН- γ).
 SEQ ID NO: 42 - аминокислотная последовательность человеческого интерферона- α (ИФН- α).
 SEQ ID NO: 43 - аминокислотная последовательность онкосперматогонального антигена 1 (NY-ESO-1).
 SEQ ID NO: 44 - аминокислотная последовательность человеческого MUC-1.
 SEQ ID NO: 45 - последовательность Козак gscaccatg (нулевая последовательность).
 SEQ ID NO: 46 - последовательность генома вируса NG-177, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующий полноразмерное антитело к PD-L1, которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит промотор ЦМВ, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, IRES, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 47 - последовательность ДНК, соответствующая области E2B генома EnAd (пары оснований 10355-5068).
 SEQ ID NO: 48 - последовательность генома вируса NG-167, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF с С-концевой His₆-меткой, которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-концевую SSA, последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 49 - последовательность генома вируса NG-95, содержащая кассету с трансгеном, кодирующую цитокин, ИФН- γ , которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-концевой промотор ЦМВ, последовательность к ДНК ИФН- γ и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 50 - последовательность генома вируса NG-97, содержащая кассету с трансгеном, кодирующую цитокин, ИФН- α , которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-концевой промотор ЦМВ, последовательность кДНК ИФН- α и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 51 - последовательность генома вируса NG-92, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей цитокин, ИФН- γ , которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-bSA, последовательность к ДНК ИФН- γ и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 52 - последовательность генома вируса NG-96, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей цитокин, ИФН- α , которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-bSA, последовательность кДНК ИФН- α и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 53 - последовательность генома вируса NG-139, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей цитокин TNF- α , которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-SSA, последовательность к ДНК TNF- α и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 54 - вставка сайта рестрикции (В γ).
 SEQ ID NO: 55 - вставка сайта рестрикции (В χ).
 SEQ ID NO: 56 - последовательность генома вируса NG-220, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей ассоциированный с опухолью антиген, NY-ESO-1, которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-концевой промотор PGK, последовательность кДНК NY-ESO-1 и 3'-концевую последовательность поли(A).
 SEQ ID NO: 57 - последовательность генома вируса NG-217, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей ассоциированный с опухолью антиген, NY-ESO-1, которая вставлена в область В γ . Кассета с трансгеном содержит 5'-концевой промотор ЦМВ, последовательность кДНК NY-ESO-1 и

3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 58 - последовательность генома вируса NG-242, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к CTLA-4, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит SSA, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, IRES, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 59 - последовательность генома вируса NG-165, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит SSA, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, последовательность пептида P2A, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 60 - последовательность генома вируса NG-190, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к PD-L1, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит SSA, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, последовательность пептида P2A, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 61 - последовательность генома вируса NG-221, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к PD-L1 с C-концевой His₆-меткой, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит 5'-SSA, последовательность фрагмента scFv антитела к PD-L1 с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую гексагистидиновую последовательность, за которой расположена 3'-концевая последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 62 - последовательность генома вируса NG-258, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит промотор ЦМВ, последовательность тяжелой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью, последовательность пептида P2A, последовательность легкой цепи антитела с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 63 - последовательность генома вируса NG-185, содержащая геном EnAd со вставленными уникальными сайтами рестрикции в областях В_χ и В_γ.

SEQ ID NO: 64 - плазмидная ДНК pNG-33 (pColoAd2.4), содержащая точку начала репликации бактерий (p15A), ген устойчивости к антибиотику (KanR) и последовательность генома EnAd со вставленными уникальными сайтами рестрикции в области В_γ.

SEQ ID NO: 65 - плазмидная ДНК pNG-185 (pColoAd2.6), содержащая точку начала репликации бактерий (p15A), ген устойчивости к антибиотику (KanR) и последовательность генома EnAd со вставленными уникальными сайтами рестрикции в областях В_χ и В_γ.

SEQ ID NO: 66 - последовательность генома вируса NG-SH01, содержащая кассету с трансгеном, кодирующую мшРНК к GAPDH, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит промотор U6 РНК рolIII и ДНК, кодирующую мшРНК.

SEQ ID NO: 67 - аминокислотная последовательность симпортера натрия/йодида (NIS).

SEQ ID NO: 68 - последовательность генома вируса NG-280, содержащая кассету с трансгеном, кодирующую симпортер натрия/йодида (NIS), которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит 5'-SSA, последовательность кДНК NIS и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 69 - последовательность генома вируса NG-272, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv к VEGF и фрагмент scFv антитела к PD-L1, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит SSA, последовательность фрагмента scFv антитела к PD-L1 с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевой гексагистидиновой меткой, последовательность пептида P2A, последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевой V5-меткой и 3'-концевую последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 70 - аминокислотная последовательность VH цепи антитела к CTLA-4.

SEQ ID NO: 71 - аминокислотная последовательность VL цепи антитела к CTLA-4.

SEQ ID NO: 72 - последовательность генома вируса NG-257, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF, которая вставлена в область В_χ. Кассета с трансгеном содержит последовательность bSA, последовательность фрагмента scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую гексагистидиновую метку, за которой расположена 3'-концевая последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 73 - последовательность генома вируса NG-281, содержащая геном EnAd с кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF, которая вставлена в область В_χ, и второй кассетой с трансгеном, кодирующей фрагмент scFv антитела к PD-L1, которая вставлена в область В_γ. Кассета с трансгеном содержит последовательность bSA, фрагмент scFv антитела к VEGF с 5'-концевой лидерной последовательностью и 3'-концевую гексагистидиновую метку, за которой расположена 3'-концевая последовательность поли(A).

SEQ ID NO: 74 - сайт рестрикции, который распознается и разрезается ферментом I-CreI.

SEQ ID NO: 75 - сайт рестрикции, который распознается и разрезается ферментом I-CeuI.

SEQ ID NO: 76 - сайт рестрикции, который распознается и разрезается ферментом I-SceI.

SEQ ID NO: 78-90 - приведены последовательности праймеров.

Примеры

Символ "р", используемый в качестве префикса в обозначении конструкций, указывает на то, что конструкция представляет собой плазмиду.

Примеры 1-6.

Вирусы получали с использованием последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7 и 8, с использованием способов, описанных ниже.

Культура клеток.

Клетки AD293 (Agilent #240085) культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы и добавлением глутамина (Gibco: 10109163), 5 mM L-глутамина, 2 mM пирувата натрия, 1 mM заменимых аминокислот (PAA:M11-003) и пенициллина/стрептомицина (пен/стреп). Указанная среда называется "среда AD293". Для рутинного культивирования клеток среду дополняют 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco: 41965062) и для проведения трансфекции и инфицирования среду дополняют 2% ФБС.

По $1,2 \times 10^6$ клеток AD293/колбу высевали в колбы T-25 за 24 ч до трансфекции так, чтобы плотность при трансфекции составляла ~75% конфлюентности.

Трансфекция вирусного генома.

Концентрацию плазмидной ДНК для плазмид pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-75 и pNG-76 измеряли (табл. 2) и по 7,0 мкг каждой из плазмид линейаризовали с помощью фермента рестрикции AscI в течение 2 ч при 37°C. Расщепленную ДНК разводили 50 мкл воды, не содержащей нуклеаз, и затем очищали с помощью экстракции фенолом/хлороформом. Выделенную ДНК затем преципитировали в течение 16 ч при -20°C в 300 мкл >95% этанола, соответствующего критериям чистоты для молекулярной биологии, и 10 мкл 3 M ацетата натрия. Преципитированную ДНК осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 5 мин и промывали в 500 мкл 70% этанола, перед следующим раундом центрифугирования при 14000 об/мин в течение 5 мин. Чистый осадок ДНК высушивали на воздухе, ресуспендировали в 500 мкл Opti-MEM, содержащей 15 мкл реагента для трансфекции, липофектамина™, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Смесь для трансфекции затем добавляли по каплям в колбу T-25, содержащую клетки AD293. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 2 ч при 37°C 5% CO₂ к клеткам добавляли по 4 мл клеточных сред (DMEM с высоким содержанием глюкозы и с добавлением глутамина, дополненной 2% ФБС), и колбы инкубировали при 37°C, 5% CO₂.

Клетки контролировали ежедневно для выявления цитопатогенного действия (ЦПД) (фиг. 1А-Е, фиг. 2А-Ј, фиг. 3А-Г). После выявления выраженного ЦПД вирус собирали, и моменты времени сбора вируса регистрировали в табл. 2.

Сбор и амплификация вируса.

Клетки в средах суспендировали с помощью пипетирования, чтобы поднять их со дна колбы, и переносили в пробирки Falcon объемом 15 мл.

Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин и супернатант собирали и хранили (~4 мл). Клеточную массу ресуспендировали в 1 мл среды AD293, и вирус собирали с использованием трех циклов замораживания-оттаивания. Для сбора вируса клеточную массу замораживали в жидком азоте, затем оттаивали в водяной бане при 37°C перед центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 мин и собирали супернатант, содержащий вирус. Собранные вирусы использовали для повторного инфицирования клеток AD293, чтобы амплифицировать вирусные материалы. Выработку жизнеспособных вирусов в процессе амплификации подтверждали, если в монослое клеток наблюдали значительное ЦПД (фиг. 1F-Г, фиг. 2K-R, фиг. 3H). Если наблюдали ЦПД, вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Амплификацию в клетках AD293 повторяли вплоть до 5 раз до получения вирусных материалов, которые приводили к значительному ЦПД в монослое клеток в течение 48 ч после инфицирования (фиг. 1H-I, 2S-Z, 2@ фиг. 3I-M, табл. 2).

Очистка вируса.

После амплификации активных вирусных материалов вирусы очищали с помощью двойного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия, чтобы получить вирусные материалы NG-135, NG-73, NG-74, NG-76 и NG-78. Полученные вирусные материалы титровали путем измерения оптической плотности при 260/280 нм (титры представлены в табл. 2).

Таблица 2

Идентиф. номер вируса	SEQ ID NO:	[плазмидная DNA] нг/мл	Детектирование значительного ЦПД	Кол-во циклов амплификации	Титр вируса в градиенте плотности CsCl (вирусных частиц/мл)
NG-135	SEQ ID NO: 2	241	216 часов	2	$1,51 \times 10^{12}$
NG-73	SEQ ID NO: 8	260	192 часа	3	$9,90 \times 10^{10}$
NG-74	SEQ ID NO: 5	253	384 часа	5	$1,09 \times 10^{11}$
NG-76	SEQ ID NO: 7	330	184 часа	2	$9,00 \times 10^{10}$
NG-78	SEQ ID NO: 6	260	312 часов	3	$4,50 \times 10^{11}$

Пример 7. Оценка связывания с VEGF с помощью ИФА.

VEGF-связывающую активность полноразмерного антитела с аминокислотной последовательностью бевацизумаба, секретируемого из клеток, инфицированных вирусом EnAd, содержащим ген SSA-Bev-PA (NG-135), оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Клетки AD293 высевали в концентрации $3,25 \times 10^5$ клеток/мл и культивировали в течение 20 ч. Клетки инфицировали EnAd, содержащим кассету с трансгеном SSA-Bev-PA, или контрольным вирусом EnAd, содержащим кассету с трансгеном SSA-GFP-PA (NG-107) (контроль). Через 44 ч после инфицирования супернатанты инфицированных клеток собирали и очищали центрифугированием.

Планшеты для ИФА (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) покрывали человеческим VEGF-165 (0,5 мкг/мл, R&D Systems, 293-VE-050) в течение ночи при 4°C в карбонатном/бикарбонатном буфере. Планшеты промывали в ФСБ/0,05% твин-20 между всеми последующими этапами связывания. Планшеты блокировали с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20 в течение 1 ч при комнатной температуре.

Очищенные супернатанты инфицированных клеток разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 (в соотношениях 1:2, 1:8, 1:32, 1:128, 1:512, 1:2048). Получали серийное разведение очищенного бевацизумаба (1000-0,0128 нг/мл) и к контрольным супернатантам инфицированных клеток добавляли разведенные образцы бевацизумаба с известной концентрацией 40 и 0,2 нг/мл. Все образцы вносили в планшеты, покрытые VEGF-165, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого вносили конъюгированное с ПХ детектирующее антитело к Fc человека (Abcam, ab97225) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, перед детектированием ПХ с использованием раствора субстрата ПХ, 3,3',5,5'-тетраметилэтилендиамина (TMB, Thermo-Fisher). Для остановки реакции использовали 1 М HCl и интенсивность проявленного окрашивания измеряли при длине волны 450 нм на планшет-ридере. Величины оптической плотности при 450 нм наносили на график для инфекционных супернатантов EnAd и контрольных супернатантов (фиг. 4А), на основании этих данных делали выводы о специфичном связывании секретируемого антитела к VEGF в супернатанте клеток, инфицированных NG-135. Стандартную кривую для бевацизумаба наносили на график (фиг. 6) и концентрации секретируемого антитела к VEGF или образцов с внесенной известной концентрацией бевацизумаба, связанного с VEGF, определяли путем интерполирования из стандартной кривой (фиг. 4В).

Пример 8. Получение вирусов EnAd, кодирующих антитела к VEGF или фрагменты scFv антител к VEGF.

Плазмиду pEnAd2.4 (также называемую в настоящем документе pColoAd2.4, последовательность SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмид pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-76, pNG-78 и pNG-167 путем прямой вставки кассет с трансгеном в уникальные сайты рестрикции pEnAd2.4, расположенные между генами L5 и E4 (область В_У). Способы получения плазмиды приведены в примере 31.

Описание полученных вирусов.

pNG-135 содержит кассету с трансгеном, кодирующую антитело к VEGF, кодируемую путем встраивания VH цепи антитела к VEGF (SEQ ID NO: 29), константной области тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 33), VL цепи антитела к VEGF (SEQ ID NO: 31) и константной области легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 35) в кассету с трансгеном. pNG-73 и pNG-74 содержат кассеты с трансгеном, кодирующие фрагменты scFv антител к VEGF (SEQ ID NO: 36) под контролем экзогенного промотора, ЦМВ (SEQ ID NO: 13) или эндогенного основного промотора поздних генов (MLP) EnAd. pNG-76, pNG-78 и

pNG-167 содержат кассеты с трансгеном, кодирующие фрагменты scFv антител к VEGF (SEQ ID NO: 36) с С-концевой гистидиновой пептидной меткой (SEQ ID NO: 23) под контролем экзогенного промотора, ЦМВ (SEQ ID NO: 13) или эндогенного MLP EnAd. Схемы вставленных кассет с трансгеном в плаزمиды pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-76, pNG-78 и pNG-167 показаны на фиг. 24. Конструкцию плазмид подтверждали путем секвенирования ДНК.

Наработка вирусов.

Плазмиды pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-76 и pNG-78 линейаризовали путем рестрикции с использованием фермента AscI для получения геномов вирусов NG-135 (SEQ ID NO: 2), NG-73 (SEQ ID NO: 8), NG-74 (SEQ ID NO: 5), NG-76 (SEQ ID NO: 7) и NG-78 (SEQ ID NO: 6). Реакционные смеси для проведения рестрикции готовили в соответствии с табл. 3 и рестрикцию осуществляли в течение 2 ч при 37°C.

Таблица 3

Реагент	Объем (мкл)	Поставщик
плазмидная ДНК (~7µg)	~15	
AscI	2,5	NEB R0558S
Буфер 4	5	NEB B7004S
Вода, не содержащая нуклеаз	27,5	Fisher Scientific (BPE 2484-100)

Расщепленную ДНК разводили 50 мкл воды, не содержащей нуклеаз, и затем очищали с помощью экстракции фенолом/хлороформом. Экстрагированную ДНК затем преципитировали в течение 16 ч при -20°C в 300 мкл >95% этанола, соответствующего критериям чистоты для молекулярной биологии, и 10 мкл 3 М ацетата натрия. Преципитированную ДНК осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 5 мин и промывали в 500 мкл 70% этанола перед следующим центрифугированием при 14000 об/мин в течение 5 мин. Чистый осадок ДНК высушивали на воздухе, ресуспендировали в 500 мкл среды Opti-MEM, содержащей 15 мкл реагента для трансфекции липофектамина™, и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Смесь для трансфекции затем вносили по каплям в колбу Т-25, содержащую клетки НЕК293, размноженные до 70% конфлюентности. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 2 ч при 37°C. 5% CO₂ к клеткам добавляли по 4 мл клеточных сред (DMEM с высоким содержанием глюкозы и с добавлением глутамина, дополненная 2% ФБС) и колбы инкубировали при 37°C, 5% CO₂.

Трансфицированные клетки НЕК293 контролировали каждые 24 ч и вносили дополнительные среды каждые 48-72 ч. Нарработку вируса контролировали путем наблюдения значительного цитопатогенного действия (ЦПД) в монослое клеток (фиг. 1А-Е, 2А-Ж и 3А-Г). После детектирования значительного ЦПД вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Собранные вирусы использовали для повторного инфицирования клеток 293, чтобы амплифицировать вирусные материалы. Нарработку жизнеспособных вирусов в процессе амплификации подтверждали путем детектирования значительного ЦПД в монослое клеток (фиг. 1F-G, 2K-RH, 3H). После детектирования ЦПД вирус собирали из клеток 293 с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. Амплификацию в клетках 293 повторяли вплоть до 5 раз до получения вирусных материалов, которые приводили к значительному ЦПД в монослое клеток в течение 48 ч после инфицирования (фиг. 1H-I, 2S-Z, 2@, 3I-M). После амплификации активных вирусных материалов вирусы очищали с помощью двойного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия, чтобы получить вирусные материалы NG-135, NG-73, NG-74, NG-76 и NG-78.

Пример 9. Определение активности вируса NG-135 в сравнении с EnAd в линиях клеток карциномы толстой кишки.

Репликацию вируса NG-135 или EnAd (оценивали с помощью кПЦР), экспрессию генов (оценивали с помощью кПЦР-ОТ) и экспрессию антитела к VEGF (оценивали с помощью ИФА по связыванию с VEGF) сравнивали в линиях клеток карциномы толстой кишки. NG-135 (SEQ ID NO: 2) представляет собой вирус, полученный из EnAd, который содержит кассету с трансгеном, кодирующую антитело к VEGF, расположенную после позднего гена EnAd, L5 (нить). Схема вставленной кассеты приведена на фиг. 10А и 24. Способ наработки вируса NG-135 подробно описан в примере 8. Линии клеток карциномы толстой кишки HCT-116, DLD или HT-29 высевали в 6-луночные планшеты при плотности клеток 7,5×10⁵ клеток/луноку для HCT-116 и DLD или 2×10⁶ клеток/луноку для клеток HT-29. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C, 5% CO₂, перед инфицированием клеток с использованием 100 или 10 вирусных частиц на клетку (ppc) EnAd или NG-135, или клетки оставляли неинфицированными. Количественные исследования проводили через 24, 48 или 72 ч после инфицирования.

Количественное определение вирусной ДНК с помощью кПЦР.

Линии клеток HT-29 и DLD, которые инфицировали в течение 72 ч с использованием 10 частиц/клетку EnAd или NG-135 или оставляли неинфицированными, использовали для количественного

определения вирусной ДНК с помощью кПЦР. Клеточные супернатанты собирали и очищали центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин. Клетки промывали один раз с использованием ФСБ и лизировали путем замораживания-оттаивания при -20°C в 400 мкл/лунку 1× репортерного буфера для лизиса (Promega: E3971). ДНК экстрагировали из 3 мкл клеточного лизата или 10 мкл супернатанта с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую получали с использованием вирусных частиц EnAd ($2,5 \times 10^{10}$ - $2,5 \times 10^5$ вирусных частиц), ДНК экстрагировали с помощью набора Sigma GenElute. Каждый экстрагированный образец или стандарт исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в реакционной смеси, подробно описанной в табл. 4.

Таблица 4

Реагент	Объем/лунку (мкл)
Исходная смесь TaqMan™ Fast Advanced (Lifetech)	5
Прямой праймер EnAd	0,08
Обратный праймер EnAd	0,08
Зонд EnAd	0,02
Вода, не содержащая нуклеаз	2,82
Образец	2
Объем в лунке	10

кПЦР проводили в соответствии с программой, приведенной в табл. 5.

Таблица 5

Кол-во циклов	Температура (°C)	Продолжительность (с)
1	50	120
1	95	20
40	95	1
	60	20

Количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку выявило, что репликация вируса NG-135 или EnAd была сопоставима в обеих линиях клеток, HT-29 и DLD (фиг. 11A). В неинфицированных клетках вирусные геномы не поддавались детектированию (данные не показаны).

Исследование экспрессии вирусных генов (гексон) или генов антитела к VEGF с помощью кПЦР-ОТ.

Линии клеток HT-29 и DLD, которые инфицировали в течение 72 ч с использованием 10 частиц/клетку EnAd или NG-135 либо оставляли неинфицированными, использовали для исследования экспрессии гена гексона или антитела к VEGF с помощью кПЦР-ОТ. Супернатант удаляли из каждой лунки и клетки промывали с использованием ФСБ и затем лизировали в 600 мкл/лунку буфера RLT (Qiagen), содержащего бета-меркаптоэтанол (1:100). Клеточные лизаты очищали центрифугированием в течение 3 мин при 13000 об/мин и затем по 200 мкл лизата использовали для экстракции РНК с использованием набора для экстракции ДНК/РНК/белок AllPrep (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК, выделенной из каждого образца, измеряли и 800 нг использовали для синтеза кДНК с использованием Superscript III First Strand Synthesis SuperMix для кПЦР-ОТ (Life Technologies; 11752-050) в соответствии с протоколом производителя. По 1 мкл каждого образца синтезированной ДНК использовали для исследования с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гексона EnAd, или набора, включающего зонд и специфичные праймеры для антитела к VEGF, в реакционной смеси, подробно описанной в табл. 6.

Таблица 6

Реагент	Объем/лунку (мкл)
Исходная смесь TaqMan™ Fast Advanced (Lifetech)	5
Прямой праймер EnAd	0,08

Обратный праймер EnAd	0,08
Зонд EnAd	0,02
Вода, не содержащая нуклеаз	3,82
Образец	1
Объем в лунке	10

кПЦР проводили в соответствии с программой, приведенной в табл. 5. Количественное определение числа копий ДНК, детектированных с помощью кПЦР, выявило сопоставимые уровни экспрессии позднего гена вируса, гексона, в клетках HT-29 или DLD, инфицированных NG-135 или EnAd (фиг. 11B). Однако экспрессию гена антитела к VEGF детектировали только в клетках HT-29 или DLD, инфицированных вирусом NG-135, который содержит кассету с трансгеном, кодирующую антитело к VEGF (фиг. 12).

Исследование экспрессии антитела к VEGF путем оценки связывания с VEGF методом ИФА.

Линии клеток HT-29, DLD и HCT-116, которые инфицировали в течение 24, 48 или 72 ч с использованием 100 частиц/клетку EnAd или NG-135 либо оставляли неинфицированными, использовали для исследования экспрессии антитела путем оценки связывания с VEGF с помощью ИФА.

Супернатанты культур извлекали из каждой лунки и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин для удаления остатков клеток. Планшеты для ИФА (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) покрывали VEGF-165 человека (0,5 мкг/мл, R&D Systems, 293-VE-050) и блокировали в соответствии со способами, описанными в примере 7. Инфекционные супернатанты разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 (1:2 или 1:4), и получали серийное разведение очищенного антитела к VEGF (1000-0,0128 нг/мл). Все образцы вносили в планшеты, покрытые VEGF-165, и исследовали в соответствии со способами, описанными в примере 7.

Концентрации секретируемого антитела к VEGF, связанного с VEGF, определяли путем интерполирования величин из стандартных кривых. Экспрессия антитела к VEGF увеличивалась с течением времени в клетках HT-29, DLD и HCT вплоть до 72 ч, в этой временной точке в супернатантах всех исследованных линий клеток детектировали сопоставимые уровни экспрессии антитела (фиг. 13).

Пример 10. Количественное определение уровня экспрессии антитела к VEGF в линиях клеток карциномы толстой кишки и карциномы легких.

Линии клеток карциномы толстой кишки HT-29 и карциномы легких A549 высевали в 12-луночные планшеты при плотности 1×10^6 клеток/лунку для HT-29 и 5×10^5 клеток/лунку для клеток A549. Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂ перед инфицированием клеток с использованием 100 вирусных частиц на клетку (частиц/клетку) EnAd или NG-135 либо оставляли неинфицированными. Эксперименты проводили через 24, 48 или 72 ч после инфицирования.

В каждый момент времени супернатанты культур удаляли из каждой лунки и заменяли 400 мкл клеточных культуральных сред. Затем планшеты инкубировали в течение 5 мин, 1 или 3 ч перед отбором из каждой лунки сред и их центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин для удаления остатков клеток. Планшеты для ИФА (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) покрывали в течение 16 ч при 4°C мышинным моноклональным антителом к Fc IgG1 человека (2 мкг/мл, ab1927, Abcam), разведенным в карбонатном/бикарбонатном буфере. Планшеты блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20, перед промывкой с использованием ФСБ/0,05% твин-20. Планшеты промывали 3 раза с использованием ФСБ/0,05% твин-20 между всеми последующими этапами связывания.

Очищенные инфекционные супернатанты разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 (1:2, 1:8, 1:32). Серийное разведение очищенного бевацизумаба (200-0,1 нг/мл) также получали в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20. Образцы и стандарты вносили в покрытые планшеты и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Конъюгированное с ПХ детектирующее антитело к IgG-Fab человека (0,5 мкг/мл, Abcam ab87422) вносили и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед проведением детектирования пероксидазы хрена с использованием раствора субстрата ПХ, 3.3.5.5'-тетраметилэтилдиамин (TMB, Thermo-Fisher). Для остановки реакции использовали 1 М HCl и интенсивность развившегося окрашивания измеряли при длине волны 450 нм на планшет-ридере. Концентрации секретируемого антитела к VEGF в клетках HT-29 (фиг. 28A) и A549 (фиг. 28B) определяли путем интерполирования из стандартных кривых. Данные по оценке общего белка, который, согласно предварительным расчетам, экспрессируется 1×10^6 клеток HT-29 или A549 в течение 24, 48 и 72 ч, обобщены на фиг. 28C.

Пример 11. Экспрессия фрагмента scFv антитела к VEGF в линии клеток карциномы толстой кишки.

Уровни экспрессии фрагмента scFv антитела к VEGF для NG-76 (SEQ ID NO: 7), NG-78 (SEQ ID NO: 6) и EnAd сравнивали в клетках карциномы толстой кишки HT-29 с помощью вестерн-блоттинга. NG-76 и NG-78 представляют собой вирусы, полученные из EnAd, которые содержат кассету с трансгеном, кодирующую фрагмент scFv антитела к VEGF, расположенную после позднего гена EnAd, L5 (нить). Схемы вставленных кассет приведены на фиг. 10B и 10C, и способ наработки вирусов описан

в примере 8.

Клетки HT-29 высевали в 6-луночные планшеты для культивирования при плотности 4×10^6 клеток/лунку и инкубировали в течение 5 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки инфицировали в течение 22, 46 или 70 ч с использованием 50 вирусных частиц NG-76, NG-78 или EnAd на клетку. Среда удаляла из лунок и клетки промывали один раз с использованием ФСБ перед лизированием в 250 мкл буфера для лизиса (150 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 0,5% ДСН, 50 mM Трис-HCl (pH 7,5)), содержащего коктейль ингибиторов протеаз III (Calbiochem: 539134). Лизаты обрабатывали бензоной, чтобы разрушить геномную ДНК и дополнительно разбавляли в соотношении 1:4 в буфере для лизиса, содержащем буфер для образцов NuPAGE LDS и восстанавливающий агент NuPAGE (Life Technologies). Образцы нагревали в течение 10 мин до температуры 70°C перед проведением электрофореза в ДСН-ПААГ с использованием 4-12% бис-трис гелей NuPAGE (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Белки переносили на мембраны ПВДФ с помощью вестерн-блоттинга с использованием модуля для блоттинга Xcell II (Life Technologies). Блокирование и иммуноблоттинг проводили в ФСБ/0,1% твин-20 с добавлением 5% сухого молока и все стадии промывки проводили в ФСБ/0,1% твин-20. Фрагменты scFv антитела к VEGF детектировали с использованием мышиного моноклонального антитела St-His₆ к гексагистидиновой метке на С-конце scFv и детектирование с помощью вторичного антитела проводили с использованием конъюгированного с FIX антитела кролика против IgG мыши. Белки визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции. Экспрессию фрагмента scFv можно детектировать в лизатах клеток HT-29, инфицированных NG-76 или NG-78, но не в клетках, инфицированных EnAd (обозначены как 76, 78 и AB1 соответственно на фиг. 14A). Экспрессия scFv поддавалась детектированию на более ранних сроках, к 22 ч, в клетках, инфицированных вирусом NG-76, в котором экспрессия scFv находится под контролем экзогенного промотора, по сравнению с вирусом NG-78, в котором экспрессия scFv находится под контролем эндогенного основного промотора поздних генов.

Пример 12. Уровни экспрессии фрагмента scFv антитела к VEGF, детектируемые по связыванию с VEGF с помощью ИФА.

Уровни экспрессии фрагмента scFv антитела к VEGF для NG-76 (SEQ ID NO: 7) и EnAd сравнивали в линиях клеток мезонефроза человека путем оценки связывания с VEGF с помощью ИФА или вестерн-блоттинга. Клетки AD293 высевали в 6-луночные культуральные планшеты при плотности 5×10^5 клеток/лунку. Через 24 ч после посева клетки AD293 инфицировали с использованием 100 вирусных частиц на клетку NG-76 или EnAd. Клетки культивировали в течение 72 ч перед отбором из лунок супернатантов и их центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин для удаления остатков клеток. Затем очищенные супернатанты использовали для оценки связывания с VEGF с помощью ИФА или исследования с помощью вестерн-блоттинга. Для проведения ИФА супернатанты разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 в соотношении 1:2, и затем вносили антитело к VEGF в известной концентрации 8 нг/мл или оставляли без добавления антитела. Планшеты для ИФА покрывали VEGF и блокировали в соответствии со способом, описанным в примере 7. В планшеты вносили по 100 мкл/лунку образцов и проводили количественные исследования. После этого вносили антитело для детектирования, конъюгированное с ПХ поликлональное антитело к His-метке (Abcam ab1187), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, перед проведением детектирования пероксидазы хрена с использованием раствора субстрата ПХ, 3,3',5,5'-тетраметилэтилбендиамин (TMB, Thermo-Fisher). Для остановки реакции использовали 1 M HCl и интенсивность развившегося окрашивания измеряли при длине волны 450 нм на планшет-ридере. Величины оптической плотности при 450 нм представляли в графической форме для EnAd, NG-76 и NG-76 + инфекционные супернатанты, содержащие 8 нг/мл антитела к VEGF (фиг. 14B). Специфичность экспрессированного scFv в отношении VEGF в супернатантах клеток, инфицированных NG-76, подтверждали с помощью частичного ингибирования связывания с VEGF путем добавления 8 нг/мл очищенного человеческого антитела к VEGF, бевацизумаба.

Для проведения вестерн-блоттинга супернатанты получали и исследовали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 11. Низкие уровни фрагмента scFv можно детектировать через 24 ч после инфекции, при этом экспрессия значительно увеличивалась к 44 часу (фиг. 7).

Пример 13. Определение активности вируса NG-135 в сравнении с EnAd у мышей, несущих опухоли.

Клетки карциномы толстой кишки DLD или HCT-116 имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu. После того, как опухоли достигали объема ~100 мм³, мышам распределяли на группы и обрабатывали с использованием 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135, которые доставляли путем однократной внутриопухолевой инъекции. В каждое исследование также включали группу неинфицированных контрольных мышей. Опухоли DLD иссекали на 3, 7 или 28 сутки после лечения, и опухоли HCT-116 иссекали на 3, 7 или 14 сутки после лечения.

Исследование репликации генома вируса с помощью кПЦР.

Иссеченные опухоли взвешивали и гомогенизировали в 1× репортерном буфере для лизиса (Promega E3971), содержащем коктейль ингибиторов протеаз III (Calbiochem), разбавленный в соотношении 1:200, при концентрации 100 мкл буфера на 25 мг опухоли. Гомогенаты необработанных опухо-

лей использовали для получения стандартной кривой для вируса EnAd ($2,5 \times 10^{10}$ - $2,5 \times 10^5$ вирусных частиц/образец лизата опухоли). ДНК экстрагировали из 2 мкл каждого образца обработанной опухоли или из 100 мкл каждого стандарта с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute в соответствии с протоколом производителя. Экстрагированные образцы и стандарты исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами кПЦР, подробно описанными в примере 8. Результаты количественного определения числа вирусных геномов на опухоль приведены для опухолей DLD на 3 сутки или 7 сутки после обработки (фиг. 15A) или 28 сутки после обработки (фиг. 15B). Результаты количественного определения числа вирусных геномов на опухоль приведены для опухолей НСТ на 3, 7 или 14 сутки после обработки с использованием EnAd или NG-135 (фиг. 18A). В совокупности эти данные свидетельствуют об отсутствии существенного различия между уровнями репликации вируса EnAd и NG-135 в опухолях НСТ или DLD.

Исследование уровней экспрессии гена вируса (гексон) или гена антитела к VEGF с помощью кПЦР-ОТ.

Исеченные опухоли взвешивали и гомогенизировали в буфере для лизиса RLT (Qiagen), содержащем бета-меркаптоэтанол (Sigma), в концентрации 350 мкл буфера на 20 мг опухоли. РНК экстрагировали из образцов опухолей с использованием мини-набора ДНК/РНК/белок AllPrep (Qiagen) и обрабатывали с использованием набора ДНКаз, не содержащего РНКаз (Qiagen) в соответствии с протоколами производителя. Измеряли концентрацию РНК, выделенной из каждого образца, и 800 нг использовали для синтеза кДНК и проведения кПЦР в соответствии со способами кПЦР-ОТ, подробно описанными в примере 8. Количественное определение числа копий РНК, детектированных с помощью кПЦР, выявило сопоставимые уровни экспрессии позднего гена вируса, гексона, в опухолях DLD, обработанных NG-135 или EnAd, на 3 или 7 сутки после обработки (фиг. 16A). Напротив, экспрессия гена, кодирующего антитело к VEGF (РНК), поддавалась детектированию только в клетках DLD, обработанных вирусом NG-135 (фиг. 16B).

Определение уровня экспрессии антитела к VEGF, детектированного на основании связывания с антителом к IgG1 человека или с VEGF с помощью ИФА.

Лизаты исеченных опухолей, приготовленные для кПЦР (см. выше), также использовали для исследования экспрессии антитела к VEGF с помощью ИФА, используя либо антитело к IgG1 человека (набор Abscam), либо связывание с VEGF. Сыворотку из образцов крови, взятых в месте исечения опухоли, также количественно исследовали для определения наличия IgG1 человека с помощью ИФА.

Перед проведением количественных исследований лизаты опухолей от обработанных и контрольных мышей разводили в соотношении 1:2 в 150 мкл 1× репортерного буфера для лизиса (Promega), содержащего 2% Тритона X-100, кратковременно встряхивали и обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин в ультразвуковой водяной бане. Образцы крови центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин и собирали сыворотку. Получали серийное разведение очищенного антитела к VEGF, бевацизумаба (1000-0,0128 нг/мл), и вносили в известной концентрации в объединенные лизаты от контрольных мышей или образцы сыворотки от необработанных мышей, чтобы получить стандартные кривые для количественного определения.

Определение IgG1 человека с помощью ИФА (Abscam).

Обработанные ультразвуком лизаты из опухолей, обработанных NG-135 или EnAd, дополнительно разводили в соотношении 1:2 в буфере для количественного исследования, и в качестве положительного контроля в образец лизата опухоли мыши, обработанной EnAd, вносили очищенный бевацизумаб в известной концентрации 8 нг/мл. Образцы сыворотки разводили в соотношении 1:2 или 1:5 в буфере для исследования. Все образцы и стандарты затем количественно исследовали для определения присутствия IgG1 человека с использованием набора ИФА Abscam в соответствии с протоколом производителя. Концентрации антитела в опухоли определяли путем интерполирования из стандартных кривых. Экспрессия антитела IgG1 человека поддавалась детектированию в опухолях DLD, обработанных NG-135 и может быть количественно определена через 28 суток после обработки (фиг. 17A) и через 28 суток после обработки в образце сыворотки от мыши, обработанной NG-135 (фиг. 19). Антитело также детектировали во всех опухолях НСТ-116, обработанных NG-135, и количественно определяли через 3, 7 или 14 суток после обработки (фиг. 18B). Экспрессия антитела не поддавалась детектированию в любой опухоли или образцах крови мышей, обработанных EnAd.

ИФА с использованием связывания с VEGF.

Обработанные ультразвуком лизаты из опухолей, обработанных NG-135 или EnAd, дополнительно разводили в соотношении 1:2 в буфере для количественного исследования и в качестве положительного контроля в образец лизата опухоли мыши, обработанной EnAd, вносили очищенный бевацизумаб в известной концентрации 1,6 нг/мл. Планшеты для ИФА (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) покрывали VEGF-165 человека (0,5 мкг/мл) в соответствии со способами, подробно описанными в примере 7. Супернатанты образцов и стандартов вносили в планшеты, покрытые VEGF-165, и количественно исследовали в соответствии со способами, описанными в примере 7. Концентрации

VEGF-связывающего антитела в опухолях определяли путем интерполирования из стандартной кривой. Антитело к VEGF, которое способно связываться с hVEGF-165, поддавалось детектированию в образцах опухолей DLD, обработанных NG-135, но не в образцах, обработанных EnAd (фиг. 17B).

Пример 14. Получение и определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих репортерные гены.

Была получена панель репортерных вирусов, экспрессирующих GFP или люциферазу, в которых экспрессия трансгена находилась под контролем экзогенного вирусного промотора, ЦМВ (NG-47, NG-61), экзогенного промотора млекопитающих, PGK (NG-159), эндогенного основного промотора поздних генов вируса (NG-62, NG-63, NG-93, NG-98, NG-105, NG-106, NG-107, NG-108) или эндогенного промотора ранних генов вируса, E4 (NG-109, NG-110). Все вирусы были получены из EnAd с помощью плазмиды для клонирования pEnAd2.4 (описанной в заявке №GB1322851.5) и содержали кассету с трансгеном, вставленную после позднего гена EnAd, L5 (нить).

Получение вирусов.

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмид pNG-47, pNG-62, pNG-93, pNG-105, pNG-106, pNG-107, pNG-108, pNG-109, pNG-110 и pNG-159 путем непосредственной вставки кассет с трансгеном, кодирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP, SEQ ID NO: 38) в уникальные сайты рестрикции pEnAd2.4, расположенные между генами L5 и E4. Схемы вставленных кассет с трансгеном в плазмидах pNG-47, pNG-62, pNG-93, pNG-105, pNG-106, pNG-107, pNG-108, pNG-109, pNG-110 и pNG-159 приведены в фиг. 22. Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) также использовали для получения плазмид pNG-61 и pNG-63 путем непосредственной вставки кассет с трансгеном, кодирующих люминесцентный белок, люциферазу (SEQ ID NO: 39), в уникальные сайты рестрикции pEnAd2.4. Схемы вставленных кассет с трансгеном в плазмидах pNG-61 и pNG-63 приведены на фиг. 22. Все плазмиды подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Плазмиды, кодирующие репортерные гены, линейаризовали и трансфицировали в клетки HEK293 для наработки вирусных частиц в соответствии со способами "наработки вирусов", подробно описанными в примере 8. Амплифицированные вирусные частицы очищали с помощью двойного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия для получения вирусных материалов: NG-47, NG-62, NG-93, NG-105, NG-106, NG-107, NG-108, NG-109, NG-110, NG-61 NG-63.

Определение характеристик вирусов.

Репликацию вирусов NG-47, NG-62, NG-93, NG-105, NG-106, NG-107, NG-108, NG-109, NG-110 или EnAd (оценивали с помощью кПЦР) и экспрессию гена GFP (оценивали с помощью количественного определения интенсивности флуоресценции) сравнивали в линиях клеток карциномы толстой кишки, HT-29. Линии клеток карциномы толстой кишки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты при плотности клеток 1×10^6 клеток/луночку. Планшеты инкубировали в течение 24 ч, 37°C, 5% CO₂, перед инфицированием клеток с использованием 1 вирусной частицы на клетку (частиц/клетку) каждого из вирусов, описанных выше, или оставляли неинфицированными. Количественные исследования проводили через 24, 48, 72 или 96 ч после инфицирования.

Количественное определение вирусной ДНК с помощью кПЦР.

Клеточные супернатанты собирали и очищали центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин. Клетки промывали один раз с использованием ФСБ и лизировали путем замораживания-оттаивания при -20°C в 400 мкл/луночку однократного репортерного буфера для лизиса (Promega: E3971). ДНК экстрагировали из 1 мкл клеточного лизата или 10 мкл супернатанта с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую получали с использованием вирусных частиц EnAd ($2,5 \times 10^{10}$ - $2,5 \times 10^5$ вирусных частиц) и ДНК экстрагировали с использованием набора Sigma GenElute. Каждый экстрагированный образец или стандарт исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами кПЦР, подробно описанными в примере 9. Результаты количественного определения числа вирусных геномов на клетку приведены для временных точек 24, 48, 72 или 96 ч после инфицирования (фиг. 27A).

Количественное определение уровней экспрессии трансгенов с помощью флуориметрии.

Клеточные лизаты, полученные в соответствии с описанным выше способом, количественно исследовали с использованием 25 мкл размороженного неразбавленного лизата или лизата, разбавленного в соотношении 1:2, 1× репортерным буфером для лизиса (Promega: E971). Уровень флуоресценции GFP в каждой лунке измеряли на планшет-ридере (BioTek Synergy HT). Величины измеренной интенсивности флуоресценции с вычтенным неспецифичным сигналом для образцов, инфицированных в течение 24, 48, 72 или 96 ч, представлены в графической форме на фиг. 27B.

Пример 15. Определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих репортерные гены под контролем экзогенного промотора ЦМВ.

Репликацию вируса (оценивали с помощью кПЦР), онколитическую активность вируса (оценивали с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток) и экспрессию гена-репортера (оценивали по интенсивности флуоресценции) для репортерных вирусов NG-47 и NG-61 сравнивали с

аналогичными показателями для EnAd. Способы наработки и конструирования вирусов NG-47 и NG-61 подробно описаны в примере 14.

Определение характеристик репликации вируса и экспрессии трансгенов.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29, фибробласты линии WI38 или фибробласты линии MRC5 высевали в 6-луночные планшеты при плотности клеток 2×10^6 клеток/луноку. Планшеты инкубировали в течение 18 ч при 37°C, 5% CO₂ перед инфицированием клеток с использованием 1 вирусной частицы на клетку (ppc) EnAd, NG-47 или NG-61. Количественные исследования проводили через 24, 48, 72 или 96 ч после инфицирования. Клеточные супернатанты собирали и очищали с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 1200 об/мин. Клетки промывали один раз с использованием ФСБ и лизировали путем замораживания-оттаивания при -20°C в 400 мкл/луноку 1× репортерного буфера для лизиса (Promega: E3971). ДНК экстрагировали из лизата клеток или супернатанта с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую получали с использованием вирусных частиц EnAd ($2,5 \times 10^{10}$ - $2,5 \times 10^5$ вирусных частиц), и ДНК экстрагировали с использованием набора Sigma GenElute. Каждый экстрагированный образец или стандарт исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd.

Количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку выявило, что репликация NG-47 и NG-61 была сопоставима с таковой для EnAd (помечен как EnAd на фиг. 25 и 26) в клетках HT-29 (фиг. 25A и 25B) и в линиях клеток HT-29, WI38 и MRC5 (фиг. 26C). Лизаты клеток, инфицированных NG-47 и EnAd, полученные в соответствии с описанными выше способами, также использовали для оценки экспрессии трансгена. Относительную интенсивность флуоресценции GFP измеряли на планшет-ридере (BioTek) в неразбавленном лизате или лизате, разбавленном в соотношении 1:2 в 1× репортерном буфере для лизиса (фиг. 25C).

Сравнение онколитической активности вирусов.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 высевали в 96-луночные планшеты при плотности $2,5 \times 10^4$ клеток/луноку. Планшеты инкубировали в течение 4 ч, 37°C, 5% CO₂, перед инфицированием клеток с использованием вирусных частиц EnAd, NG-47 или NG-61 в диапазоне плотности инфицирования 100-0,39 частиц на клетку (ppc). Жизнеспособность клеток HT-29 оценивали с помощью реагента Cell Titre 96 MTS (Promega: G3581) через 72 ч после инфицирования. Количественное определение процента выживания клеток при каждом значении плотности инфицирования выявило, что онколитическая активность NG-47 и NG-61 была сопоставима с таковой для EnAd в клетках HT-29 (фиг. 26A и 26B).

Пример 16. Получение вирусов EnAd, кодирующих антитела к белкам-ингибиторам системы сигнальных путей иммунной контрольной точки.

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмиды pNG-177 путем непосредственной вставки кассеты с трансгеном, кодирующей антитело к PD-L1 человека (YW243.55.S70), между уникальными сайтами рестрикции pEnAd2.4, расположенными между генами L5 и E4. Плазида pNG-177 кодирует VH цепь антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 30), константную область тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 34), VL цепь антитела к VEGF (SEQ ID NO: 32) и константную область легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 35). Схема вставленной кассеты, кодирующей антитело к PD-L1, присутствующей в геноме вируса NG-177 (SEQ ID NO: 46), приведена на фиг. 24.

Пример 17. Получение и определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих цитокины.

Получение вируса.

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмид pNG-92, pNG-95, pNG-96, pNG-97, pNG-139 и pNG-136 путем непосредственной вставки кассет с трансгеном, кодирующих человеческий интерферон-γ (ИФН-γ; (SEQ ID NO: 41; pNG-92 и pNG-95), человеческий интерферон-α (ИФН-α; SEQ ID NO: 42; pNG-96 и pNG-97) или человеческий фактор некроза опухоли альфа (hTNF, SEQ ID NO: 40; pNG-139) в уникальные сайты рестрикции pEnAd2.4, расположенные между генами L5 и E4 (область B_γ). Схемы вставленных кассет с трансгеном в плазидах pNG-92, pNG-95, pNG-96, pNG-97 и pNG-139 приведены на фиг. 23. Конструкцию плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Плазмиды pNG-92, pNG-95 и pNG-139 линеаризовали, чтобы получить геномы NG-92 (SEQ ID NO: 51), NG-95 (SEQ ID NO: 49) и NG-139 (SEQ ID NO: 53). Геномы трансфицировали в клетки HEK293, чтобы наработать вирусные частицы в соответствии со способами "наработки вирусов", подробно описанными в примере 8.

Аmplифицированные вирусные частицы очищали с помощью двойного центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия, чтобы получить вирусные материалы NG-92, NG-95 и NG-139. Нарботку жизнеспособных вирусных частиц NG-139 в процессе амплификации подтверждали с помощью иммуногистохимического окрашивания капсидного белка EnAd, гексона. Клетки HT-29 инфицировали вирусным лизатом в течение 48 ч, затем из лунок удаляли среды и клетки фиксировали в смеси MeOH:ацетон в соотношении 1:1 и окрашивали антителом к аденовирусу (Abcam: ab7428) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки промывали и детектирование с использованием вторичного антитела проводили с помощью ПХ-конъюгированного IgG к иммуноглобулину мыши (Abcam: ab6728).

Белок гексона визуализировали путем добавления субстрата DAB в течение 25 мин. Окрашивание гексона можно детектировать во всех монослоях клеток (фиг. 29А и 29В).

Количественное определение выработки TNF- α в линиях клеток карциномы толстой кишки и модели подкожного ксенотрансплантата карциномы толстой кишки.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 5×10^5 клеток/лунку. Клетки инфицировали с использованием 100 вирусных частиц NG-139 на клетку (ppc) или оставляли неинфицированными. Количественные исследования проводили через 24 или 36 ч после инфицирования.

В каждой временной точке из каждой лунки отбирали супернатанты культур и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин для удаления остатков клеток. Очищенные супернатанты разводили в буфере для исследования и использовали в ИФА для определения TNF- α в соответствии с протоколом производителя. Концентрации секретируемого TNF- α определяли путем интерполирования из стандартных кривых, и полученные величины приведены на фиг. 29С.

Клетки карциномы толстой кишки DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu. После того, как опухоли достигали объема $\sim 100 \text{ мм}^3$, мышей распределяли на группы и обрабатывали с использованием 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-139, которые доставляли с помощью внутриопухолевой инъекции на 0, 3 и 6 сутки. В каждое исследование включали группу неинфицированных контрольных мышей. Опухоли DLD иссекали на 15 сутки после обработки и исследовали для определения выработки TNF- α с помощью ИФА в соответствии с протоколом производителя. Концентрации TNF- α , детектированные в опухолях, определяли путем интерполирования из стандартной кривой, и полученные величины приведены на фиг. 29D.

Пример 18. Исследование репликации вируса и экспрессии антитела к VEGF в линиях клеток карциномы толстой кишки, карциномы яичников и карциномы легких.

Репликацию вируса NG-135 (SEQ ID NO: 2) и EnAd, а также экспрессию антитела к VEGF сравнивали в линиях клеток карциномы толстой кишки (HT-29, HCT116, DLD), карциномы легкого (A549) или карциномы яичников (SKOV3) путем оценки уровней IgG1 человека с помощью ИФА.

Клетки высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 5×10^5 – 1×10^6 клеток/лунку. Через 24 ч после посева линии клеток инфицировали с использованием 100 вирусных частиц на клетку NG-135 или EnAd. Клетки культивировали в течение 24, 48, 72, 96 или 120 ч перед отбором супернатантов из лунок и центрифугированием в течение 5 мин при 1200 об/мин для удаления остатков клеток. Половину супернатанта использовали для оценки выработки антител и другую половину использовали для оценки количества вирусных геномов. Клетки в каждой лунке затем промывали $1 \times \text{ФСБ}$ и лизировали в $1 \times$ репортерном буфере для лизиса (Promega). Лизаты подвергали сублимационному оттаиванию и затем исследовали для оценки репликации вируса.

ДНК экстрагировали из 1–5 мкл клеточного лизата или 10 мкл супернатанта с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую получали с использованием вирусных частиц EnAd ($2,5 \times 10^{10}$ – $2,5 \times 10^5$ вирусных частиц) и ДНК экстрагировали с использованием набора Sigma GenElute. Каждый экстрагированный образец или стандарт исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 9. Максимальный уровень репликации EnAd и NG-135 во всех временных точках в каждой линии клеток представлен в графической форме на фиг. 33А.

Планшеты для ИФА (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) получали путем покрытия мышинным моноклональным антителом к Fc IgG1 человека (ab1927 Abcam) в карбонатном/бикарбонатном буфере в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали между всеми последующими этапами связывания с использованием $\text{ФСБ}/0,05\%$ твин-20. Планшеты блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 3% БСА в $\text{ФСБ}/0,05\%$ твин-20.

Очищенные инфекционные супернатанты разводили в $\text{ФСБ}/3\%$ БСА/ $0,05\%$ твин-20 (1:2, 1:4, 1:16). Получали серийное разведение очищенного бевацизумаба (1000–0,0128 нг/мл) и разводили его. Образцы бевацизумаба с известной концентрацией 8 нг/мл также вносили в контрольные инфекционные супернатанты. Все образцы добавляли к покрытым планшетами и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. В планшеты затем вносили ПХ-конъюгированное детектирующее антитело к Fab человека и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре перед проведением детектирования пероксидазы хрена с использованием раствора субстрата ПХ, 3,3',5,5'-тетраметилэтилендиамина (TMB, Thermo-Fisher). Для остановки реакции использовали 1 М HCl и интенсивность развившегося окрашивания измеряли при длине волны 450 нм на планшет-ридере. Концентрации секретируемого антитела к VEGF определяли путем интерполирования из стандартной кривой для бевацизумаба (фиг. 33В).

Пример 19. Характеристика выработки антител в опухолях, обработанных NG-135.

Клетки карциномы толстой кишки HCT-116 имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu. После того, как опухоли достигали объема $\sim 100 \text{ мм}^3$, мышей распределяли на группы и обрабатывали с использованием 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135, которые достав-

ляли путем внутриопухолевой инъекции. Через 10 суток после обработки опухоли от некоторых животных иссекали, взвешивали и разрезали на срезы массой ~100 мг. Каждый срез помещали в фильтрующую емкость (Nunc) в 12-луночный планшет и затем культивировали в условиях *ex vivo* в течение 7 суток в среде DMEM с добавлением 10% ФБС. Срезы опухолей и культуральные среды *ex vivo* количественно исследовали для определения репликации вирусного генома или экспрессии антител на 0 или 7 сутки после иссечения опухоли. Для измерения уровней циркулирующих антител к VEGF сыворотки отбирали у других животных.

Исследование репликации вирусного генома с помощью кПЦР.

Культуральные среды отбирали из фильтрующих емкостей и окружающих лунок. Для проведения кПЦР образцы сред разводили в соотношении 1:200 в ресуспендирующем буфере из набора для экстракции ДНК Sigma GenElute и иссеченные опухоли или культивированные срезы опухоли гомогенизировали в 1× репортерном буфере для лизиса (Promega E3971), содержащем коктейль ингибиторов протеаз, разбавленный в соотношении 1:200, в концентрации 100 мкл буфера на 25 мг опухоли. Получали стандарты EnAd и экстракцию ДНК и кПЦР проводили в соответствии со способами, подробно описанными в примере 13. Количественное определение числа вирусных геномов на опухоль, проведенное на 0 или 7 сутки после иссечения, выявило увеличение общего количества вирусных геномов на 7 сутки для обоих вирусов, EnAd и NG-135, что свидетельствует о продолжающейся выработке вирусного генома во время культивирования в условиях *ex vivo*. Данные для NG-135 приведены на фиг. 35А.

Исследование экспрессии антител к VEGF с помощью антитела к IgG1 человека.

Гомогенизированные образцы опухоли или неразведенные образцы сред, полученные для кПЦР, использовали для исследования экспрессии антитела методом ИФА с применением антитела к IgG1 человека. Образцы разбавляли в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 в соотношении 1:2 и затем проводили ИФА с использованием антитела к IgG1 человека в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Антитело можно детектировать в опухолях НСТ-116 в момент иссечения (0 сутки), однако количество детектируемого антитела, вырабатываемого опухолями, значительно увеличилось через 7 суток культивирования в условиях *ex vivo* (фиг. 35В). Сыворотки от мышей, взятые на 7 или 14 сутки после инъекции NG-135, которые исследовали методом ИФА с использованием антитела к IgG1 человека, содержали детектируемые уровни антител на 14 сутки (фиг. 35С). Антитела не поддавались детектированию в сыворотках или образцах культур, размноженных в условиях *ex vivo*, полученных от мышей, которые были обработаны EnAd.

Пример 20. Определение характеристик вирусной активности NG-135 в мышинной модели ортотопического ксенотрансплантата карциномы легких.

Клетки карциномы легких A549 вводили внутривенно мышам линии CB17 SCID и обеспечивали развитие опухолей в легких. Через 8 недель после инъекции мышей распределяли на группы и обрабатывали с использованием 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-135, которые доставляли путем внутривенного введения, или оставляли необработанными путем инъекции только ФСБ. Образцы тканей легких и печени собирали у мышей на 3, 11, 18 или 25 сутки после обработки (фиг. 36А). В каждый момент времени любые видимые опухолевые узелки в легких иссекали и объединенные узелки из каждого легкого и оставшиеся ткани легких быстро замораживали в жидком азоте. Ткани легких и опухолевые узелки легких оценивали для определения опухолевой нагрузки клетками A549 и количества вирусных геномов с помощью кПЦР.

Исследование репликации вирусного генома или опухолевой нагрузки клетками A549 с помощью кПЦР.

Иссеченные ткани легких, опухолевые узелки или ткани печени гомогенизировали в 1× репортерном буфере для лизиса.

ДНК экстрагировали из 10-100 мкл гомогенизированных образцов с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute согласно протоколу производителя. Для проведения оценки репликации вирусного генома, образцы и стандартные кривые получали и исследовали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 13. Чтобы оценить опухолевую нагрузку клетками A549, получали стандартную кривую путем внесения известного количества клеток A549 ($2,25 \times 10^6$ - $3,6 \times 10^3$ клеток) в необработанную гомогенизированную ткань легких и затем экстрагировали общую ДНК с использованием набора для экстракции ДНК Sigma GenElute. Экстрагированные стандарты и образцы исследовали для определения опухолевой нагрузки клетками A549 с помощью кПЦР, используя набор, включающий зонд и специфичные праймеры к гену рецептора простагландина Е человека (PTGER2), а также состав реакционной смеси и параметры программы, использованные для кПЦР EnAd, которые подробно описаны в примере 9. Количественное определение опухолевой нагрузки клетками A549 на 3 сутки после обработки выявило аналогичную опухолевую нагрузку клетками A549 у мышей, обработанных NG-135, и контрольных мышей, обработанных ФСБ. Однако на 25 сутки опухолевая нагрузка у мышей, обработанных NG-135, была значительно ниже, чем в контрольной группе, обработанной ФСБ (фиг. 36В). Степень опухолевой нагрузки в легких отдельных мышей коррелировала с величиной репликации вируса (фиг. 36С), причем указанная селективность репликации вируса также была продемонстрирована как

увеличение количества детектируемых вирусных частиц в опухолевых узелках на величину $\sim 2\log$, по сравнению с окружающими тканями легких, которые не имели видимых опухолевых узелков при макроскопическом исследовании (фиг. 36D).

Пример 21. Сравнение активности NG-135 и EnAd в мышинной модели ортотопического ксенотрансплантата рака яичников.

Клетки карциномы яичников SKOV-3, стабильно экспрессирующие люциферазу, имплантировали мышам линии CB17-SCID путем внутрибрюшинной инъекции 5×10^6 клеток/мышь. На 22 сутки после имплантации мышей обрабатывали с использованием ФСБ (контроль) или 5×10^7 вирусных частиц EnAd, NG-135 или NG-78, которые доставляли путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей обследовали дважды в неделю после внутрибрюшинной инъекции 32 мг люциферина с помощью визуализирующего способа, используя камеру для получения изображений IVIS. Значения относительных световых единиц (RLU), использованные в качестве меры опухолевой нагрузки, определяли для фиксированной области, представляющей интерес, в различные моменты времени. Полученные данные свидетельствуют о том, что вирусы EnAd, NG-135 и NG-78 значительно снижают опухолевую нагрузку в этой модели по сравнению с контрольной группой, обработанной ФСБ (фиг. 37).

Пример 22. Определение характеристик вируса NG-135 и экспрессированного антитела к VEGF после увеличения масштаба наработки и очистки вирусного материала из биореактора.

Клетки HEK293 оттаивали и размножали в колбах при постоянном встряхивании, перед размножением культуры до рабочего объема 3 л в сосуде биореактора объемом 5 л с мешалкой (стеклянный сосуд). Параметры контроллера биореактора устанавливали следующим образом: температура 37°C, значение pH 7,4, содержание растворенного кислорода (PK) 50, скорость потока воздуха 100 мл/мин и перемешивание со скоростью 100 об/мин. После того, как система биореактора была уравновешена, первоначальный объем культуральной среды EX-CELL, равный 1,5 л, засеивали клетками HEK293 при жизнеспособной плотности 5×10^5 клеток/мл и затем культуру размножали до рабочего объема 3 л, после размножения клеток до соответствующей плотности культуру инфицировали с использованием MOI, равной 50 частиц NG-135 на клетку. Через 48 ч после инфицирования 3 л культуры собирали и вирус очищали от культуры с помощью способов, ранее установленных для промышленного изготовления вируса EnAd в соответствии с требованиями НИИ (описаны ниже) так, что наработанный вирус NG-135 можно было сравнить с изготовленным ранее вирусом EnAd. Помимо очистки вируса, антитела к VEGF, вырабатываемые инфицированными клетками, также очищали от среды для культивирования клеток, чтобы обеспечить проведение структурных и функциональных исследований для сравнения с клиническим препаратом бевацизумаба, авастинном.

Очистка вируса NG-135.

Вирус NG-135 очищали от культуральной среды биореактора. Собранный материал обрабатывали с использованием бензоназы® для расщепления ДНК клетки-хозяина, а затем концентрировали и заменяли буфер путем фильтрации тангенциальным потоком (TFF) с использованием полуволоконной мембраны с отсечением 500 кДа. На этом этапе фильтрат TFF, который обычно отбрасывают, собирали и использовали для очистки антитела к VEGF (см. ниже). Концентрированный материал, удерживаемый на мембране при TFF, содержащий вирус NG-135, очищали с помощью селективного захвата и элюирования вируса NG-135 с использованием анионообменной хроматографической смолы Sartobind. Буфер очищенного вируса затем заменяли буфером, содержащим 50 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl₂, 5% глицерина, титровали с помощью ВЭЖХ и хранили при -80°C.

Определение характеристик вируса NG-135.

Онколитическую активность (оценивали с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток), репликацию вируса (оценивали с помощью кПЦР) и экспрессию антител (оценивали с помощью ИФА) партии очищенного вируса NG-135 (названной NG-135-BR1) сравнивали с аналогичными параметрами для EnAd или ранее охарактеризованного эталонного материала NG-135.

Для оценки онколитической активности, в сравнении с таковой для EnAd, количественное исследование жизнеспособности клеток проводили в соответствии со способами, подробно описанными в примере 15. Активность очищенного NG-135-BR1 была аналогична активности промышленно изготовленного эталонного материала EnAd (фиг. 38A).

Для оценки репликации вируса или экспрессии антител, клетки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 1×10^6 клеток/луночку, обеспечивали время для адгезии и затем инфицировали с использованием 100 частиц/клетку EnAd, NG-135 или NG-135 -BR1.

Для проведения кПЦР ДНК собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования из клеточных лизатов и супернатантов в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Экстрагированные образцы ДНК исследовали в сравнении со стандартами EnAd с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, описанными в примере 9. Общее количество вирусных геномов, детектированное на протяжении периода инфицирования, было одинаковым для всех испытываемых вирусов (фиг. 38B).

Для оценки экспрессии антитела к VEGF очищенные инфекционные супернатанты развели в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 и затем количественно исследовали с помощью ИФА в сравнении со стандартной кривой для бевацизумаба в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Концентрацию антитела определяли путем интерполирования из стандартной кривой (фиг. 38С).

Очистка антитела к VEGF.

Собранный фильтрат после TFF, содержащий моноклональное антитело к VEGF, концентрировали и заменяли буфер буфером для диафильтрации с применением белка А (200 мМ Na₂PO₄, pH 7,0), используя второй этап TFF с полуволоконной мембраной с отсечением 30 кДа. Концентрированное антитело очищали с помощью хроматографии с использованием белка А на 1 мл колонке с носителем, связанным с белком А, на системе для очистки АКТА. Элюированную фракцию антитела концентрировали с использованием концентратора Amicon Ultra 50 кДа и буфер заменяли буфером для хранения (50 мМ Трис-НСl, 5% глицерин, pH 7,0) с использованием колонки PD10. Концентрация очищенного антитела, определенная путем оценки оптической плотности, составила 0,15 мг/мл, и чистоту подтверждали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ.

Определение характеристик очищенного антитела к VEGF.

Структуру очищенного антитела к VEGF сравнивали с таковой для клинического препарата авастин с помощью вестерн-блоттинга после проведения электрофореза в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, и аффинность антитела к VEGF оценивали с помощью Biacore. Для проведения вестерн-блоттинга 7,5 мкг/мл авастина или 6 мкг/мл очищенного препарата антитела получали в буфере для приготовления образцов NuPAGE LDS. Чтобы получить гели для электрофореза в восстанавливающих условиях, восстанавливающий агент NuPAGE также добавляли к каждому образцу перед нагреванием образцов в течение 10 мин при 70°C. Электрофорез в ДСН-ПААГ проводили с использованием 4-12% бис-трис гелей NuPAGE в соответствии с протоколом производителя. Белки переносили на мембраны из ПВДФ с помощью вестерн-блоттинга с использованием модуля для блоттинга Xcell II. Блокирование и иммуноблоттинг проводили в ФСБ/0,1% твин-20 с добавлением 5% сухого молока. Антитела к VEGF детектировали с помощью ПХ-конъюгированного поликлонального антитела к IgG человека (Promega, W4031). Белки визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL). Детектируемые белковые полосы на блотах, полученных в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, очищенного антитела к VEGF, полученного с помощью способа производства вируса NG-135, соответствовали таковым для авастина (фиг. 38D).

Для исследования аффинности связывания очищенного материала антитела с VEGF по сравнению с авистином материал количественно исследовали с использованием апробированного количественного исследования связывания с VEGF с помощью системы Biacore (проведенного BioOutsource, Великобритания). Исследование кинетических параметров (программное обеспечение Biacore T200 Evaluation) после выполнения установленного протокола исследования выявило, что образец очищенного антитела к VEGF был способен связываться с VEGF165 с показателями кинетики и аффинности сравнимыми с таковыми для эталонного стандартного материала авастина (фиг. 38E).

Пример 23. Получение и определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих цепи моноклонального антитела к VEGF, соединенные саморасщепляющимся пептидом P2A (NG-165).

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмиды pNG-165 (SEQ ID NO: 59) путем непосредственной вставки кассеты с трансгеном, кодирующей антитело к VEGF, в уникальные сайты рестрикции, расположенные между генами L5 и E4. Кассета с трансгеном pNG-165 кодирует антитело к VEGF путем включения последовательности VH цепи антитела к VEGF (SEQ ID NO: 29), последовательности константной области тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 33), последовательности пептида P2A, обладающего высокой эффективностью саморасщепления (SEQ ID NO: 25), последовательности VL цепи антитела к VEGF (SEQ ID NO: 31) и последовательности константной области легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 35). Последовательность, кодирующая антитело, фланкирована 5'-концевой короткой акцепторной последовательностью сплайсинга (SEQ ID NO: 16) и 3'-концевой последовательностью полиаденилирования (SEQ ID NO: 20). Схема вставленной кассеты с трансгеном приведена на фиг. 34. Конструкцию плазмиды подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Наработка вируса.

Вирус NG-165 амплифицировали и очищали в соответствии со способами, использованными для очистки вируса NG-135, подробно описанными в примере 8.

Определение характеристик вируса.

Онколитическую активность (оценивали с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток), репликацию вируса (оценивали с помощью кПЦР) и экспрессию антитела к VEGF (оценивали с помощью ИФА) вируса NG-165 сравнивали с аналогичными показателями для вирусов EnAd или NG-135 в клетках карциномы толстой кишки. Чтобы оценить онколитическую активность в сравнении с EnAd, количественное исследование жизнеспособности клеток осуществляли в соответствии со способами, подробно описанными в примере 15. Активность вируса NG-165 была аналогична таковой для промышленно изготовленного эталонного материала EnAd (фиг. 39A).

Для оценки репликации вируса или экспрессии антител клетки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 1×10^6 клеток/луночку, обеспечивали время для адгезии и затем инфицировали с использованием 100 частиц/клетку EnAd, NG-135 или NG-165. Для проведения кПЦР ДНК собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования из клеточных лизатов и супернатантов в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Экстрагированные образцы ДНК исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 9. Общее количество геномов вируса, детектированное для NG-165, в течение всего времени инфицирования было сопоставимо с таковым для эталонного вируса EnAd (фиг. 39B).

Для оценки уровней экспрессии антитела к VEGF, очищенные инфекционные супернатанты, собранные через 24, 48 или 72 ч после инфицирования, разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 и затем исследовали с помощью ИФА с использованием антитела к IgG1 человека и стандартной кривой для бевацизумаба в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Концентрацию антитела IgG1 определяли путем интерполирования из стандартной кривой, полученные значения указывают на то, что NG-165 экспрессирует уровни IgG1 сходные с таковыми для контрольного вируса NG-135 (фиг. 39C).

Пример 24. Определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих фрагмент scFv антитела к VEGF под контролем эндогенных или экзогенных промоторов.

Характеристики онколитической активности вирусов NG-76 и NG-78, описанных ранее в примерах 8 и 11, и экспрессии функционального белка scFv к VEGF (оценивали по связыванию с VEGF с помощью ИФА) дополнительно определяли в клетках карциномы толстой кишки (оценку проводили с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток). Чтобы оценить онколитическую активность в сравнении с EnAd, количественные исследования жизнеспособности клеток осуществляли в соответствии со способами, подробно описанными в примере 15. Онколитическая активность NG-76 и NG-78 была аналогична таковой для промышленно изготовленного эталонного материала EnAd (фиг. 40A и 40B).

Для вируса NG-76 связывающая активность фрагмента scFv антитела к VEGF, экспрессированного под контролем экзогенного промотора (ЦМВ), описана в примере 12. Для вируса NG-78 связывающую активность фрагмента scFv антитела к VEGF, экспрессированного под контролем эндогенного основного промотора поздних генов вируса, оценивали с помощью ИФА с использованием непосредственного связывания с VEGF или ИФА, в котором клинический препарат бевацизумаб включен для конкуренции за связывание с VEGF. Для проведения обоих вариантов ИФА клетки 293F инфицировали с использованием 50 вирусных частиц NG-78 на клетку и культивировали в течение 70 ч. Клетки и среды собирали из колбы и супернатант и клетки разделяли центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Супернатант собирали и оставшуюся клеточную массу ресуспендировали в 1 мл клеточной среды перед проведением 3 циклов замораживания-оттаивания, чтобы лизировать клетки. После лизиса остатки клеток и сред разделяли с помощью второго этапа центрифугирования и собирали супернатант из лизата. Супернатанты или лизаты разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 в соотношении 1:2. Для проведения ИФА с прямым связыванием образцы дополнительно серийно разводили до самого низкого разведения в соотношении 1:1024. Для проведения ИФА с конкурентными связыванием к образцам добавляли бевацизумаб в концентрациях 0, 0,05, 0,5 или 5 мкг/мл. Планшеты для ИФА покрывали VEGF, блокировали и промывали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 7. В планшеты вносили по 100 мкл/луночку образцов и инкубировали в течение 1 ч. Фрагмент scFv, связанный с VEGF, детектировали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена поликлонального антитела к гексагистициновой метке (Abscam ab1187) с последующим детектированием с использованием субстрата ТМВ. Оптическую плотность считывали при 450 нм на планшет-ридере и значения оптической плотности с вычтенным неспецифическим сигналом представляли в графической форме для прямого связывания образцов с VEGF (фиг. 40C) и прямого связывания в присутствии возрастающих концентраций бевацизумаба (фиг. 40D). Как показано ранее для NG-76, функциональный фрагмент scFv антитела к VEGF, который специфически связывается с VEGF165, может экспрессироваться и секретироваться клетками, инфицированными NG-78.

Пример 25. Определение характеристик активности вируса NG-76 по сравнению с EnAd у мышей, несущих опухоли.

Клетки карциномы толстой кишки DLD имплантировали в виде подкожного ксенотрансплантата мышам линии CD1 nu/nu. После того, как опухоли достигали объема $\sim 100 \text{ мм}^3$ мышам распределяли на группы и обрабатывали с использованием 5×10^9 вирусных частиц EnAd или NG-76, которые доставляли путем внутриопухолевой инъекции. В каждое исследование также включали группу неинфицированных контрольных мышей. Опухоли DLD иссекали на 7 сутки после обработки и количественно определяли репликацию вируса (кПЦР) или экспрессию гена scFv антитела к VEGF (с помощью кПЦР-ОТ).

Исследование репликации вирусного генома с помощью кПЦР.

Иссеченные опухоли взвешивали и гомогенизировали, ДНК экстрагировали в соответствии со способами, описанными в примере 13. Экстрагированные образцы и стандарты исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами кПЦР, подробно описанными в примере 9. Результаты количественного определения числа вирусных геномов на опухоль приведены для опухолей DLD на 7 сутки после обработки, полученные значения указывают на то, что репликация вирусов NG-76 и EnAd значительно превышает исходную (фиг. 41A).

Исследование экспрессии гена вирусного белка (гексона) или фрагмента scFv антитела к VEGF с помощью кПЦР-ОТ.

кДНК получали из РНК иссеченных опухолей в соответствии со способами, описанными в примере 13. Количественное определение числа копий кДНК, детектированных с помощью кПЦР, выявило сравнимые уровни экспрессии позднего гена вируса, гексона, в опухолях DLD, обработанных NG-76 или EnAd, на 7 сутки после обработки (фиг. 41B). Напротив, экспрессию гена scFv к VEGF детектировали только в клетках DLD, обработанных вирусом NG-76 (фиг. 41C).

Пример 26. Селективность экспрессии в клетках или опухолях трансгенов, кодируемых вирусами, при использовании эндогенных или экзогенных промоторов (NG-135, NG-47, NG-61, NG-63 и NG-107).

Экспрессия антитела для вируса NG-135 зависит от репликации вируса.

Кассета вируса NG-135, кодирующая антитело к VEGF, находится под контролем эндогенного основного промотора поздних генов EnAd (MLP). Ранее было описано, что во время аденовирусной инфекции уровни экспрессии генов, находящихся под контролем основного промотора поздних генов, в значительной степени зависят от репликации вируса. Для того чтобы продемонстрировать, что экспрессия антитела, находящегося под контролем MLP EnAd, следовательно, также зависит от репликации вируса, кинетику репликации вируса NG-135 (оценивали с помощью кПЦР) и экспрессию антител (оценивали с помощью ИФА) сравнивали при различных значениях множественности инфекции.

Клетки карциномы толстой кишки HT-29 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 2×10^6 клеток/луночку. Через 18 ч после посева клетки инфицировали с использованием 1, 10 или 100 частиц/клетку вируса NG-135.

Для оценки экспрессии антитела к VEGF очищенные инфекционные супернатанты, собранные через 24, 48 или 72 ч после инфицирования, разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 и затем исследовали с помощью ИФА с использованием связывания с VEGF в соответствии со способами, описанными в примере 9. Концентрацию антитела определяли путем интерполирования из стандартной кривой.

Для исследования репликации вируса с помощью кПЦР, ДНК собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования из клеточных лизатов и супернатантов в соответствии со способами, описанными в примере 9. Экстрагированные образцы ДНК исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, описанными в примере 9. Исследование уровней экспрессии антитела через 72 ч после инфицирования выявило детектируемое секретируемое антитело при всех испытанных значениях MOI, однако уровень экспрессии антитела зависел от исходной величины MOI (фиг. 42A). Кинетика экспрессии антитела свидетельствует об увеличении экспрессии антитела в течение всего приеода инфекции, однако экспрессия детектируемого антитела связана со значительным уровнем репликации вируса, который превышает исходный (фиг. 42B и 42C).

Экспрессия антитела, кодируемого вирусом NG-135, в клетках карциномы, стромальных фибробластах и первичных клетках.

Для того чтобы подтвердить, что антитело может селективно экспрессироваться в клетках, восприимчивых к инфекции NG-135 и репликации вируса, репликацию вируса NG-135 (оценивали с помощью кПЦР), экспрессию антитела (оценивали с помощью ИФА) и способность вырабатывать инфекционные вирусные частицы (оценивали с помощью количественного исследования при повторном инфицировании) определяли в раковых клетках (HT-29), которые, как известно, являются восприимчивыми к инфекции EnAd, и фибробластах (WI-38 и MRC-5), которые ранее были охарактеризованы как невосприимчивые. В общих чертах, клетки высевали в 12-луночные планшеты и инфицировали через 18 ч после посева с использованием 100 частиц/клетку вируса NG-135 в течение 4 ч перед тем, как удалить инфекционные среды из клеток и заменить их культуральными средами. Через 1 или 72 ч после четырехчасового периода инфицирования клеточные супернатанты и лизаты собирали из планшетов в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18.

Для проведения кПЦР экстрагировали ДНК и образцы исследовали с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 9. Для оценки экспрессии антитела VEGF очищенные инфекционные супернатанты после инфицирования разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 и исследовали с помощью ИФА в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18.

Чтобы оценить выработку инфекционных вирусных частиц, собранные неразведенные супернатанты 10-кратно серийно разводили и использовали для повторного инфицирования свежих культур клеток

HT-29, высеванных при плотности 3×10^4 клеток/лунку в 96-луночные планшеты. Через 72 ч после повторного инфицирования из планшетов удаляли среды и клетки фиксировали с использованием Me:Ac в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем лунки промывали с использованием ФСБ и клетки окрашивали для определения экспрессии белка капсида EnAd путем инкубации с первичным антителом кролика к гексону (разведенным в соотношении 1:800) и затем со вторичным детектирующим антителом кролика, конъюгированным с ПХ. Белок гексон визуализировали путем добавления субстрата DAB и регистрировали изображения с использованием световой микроскопии. Инфекционный титр (TCID₅₀/мл) определяли, подсчитывая все лунки, содержащие положительное окрашивание белка капсида.

Анализ полученных данных выявил, что только клетки HT-29 имели репликацию вируса NG-135 выше исходных уровней инфекции (фиг. 43А) или детектируемую экспрессию антитела (фиг. 43В). Используя данные о чувствительности, полученные при количественном исследовании с помощью ИФА с использованием антитела к IgG1, можно предположить, что отсутствие детектируемой экспрессии антител неопухолевыми клетками указывает на то, что эти клетки вырабатывают менее 0,33 фг/клетку/24 ч по сравнению с уровнями, превышающими 100 фг/клетку/24 ч для опухолевых клеток HT-29. Эти данные коррелируют с данными об активной выработке инфекционных вирусных частиц опухолевыми клетками HT-29, однако в линиях фибробластов выработка вируса не поддавалась детектированию (фиг. 43С).

Селективная экспрессия трансгенов в первичных иммунных клетках.

Селективная экспрессия трансгенов в первичных врожденных иммунных клетках была описана для вирусов EnAd, NG-47 и NG-107, которые экспрессируют ген-репортер, EGFP, под контролем экзогенного промотора (ЦМВ) или эндогенного MLP соответственно. Определение характеристик вирусов NG-47 и NG-107 подробно описано в примере 14.

Моноциты выделяли из цельной крови и культивировали для дифференцировки в дендритные клетки в соответствии со способами, подробно описанными в примере 28. На 5 сутки культивирования дифференцированные дендритные клетки моноцитарного происхождения высевали в 96-луночные планшеты и подвергали воздействию 200 частиц/клетку EnAd, NG-47 или NG-107 или оставляли необработанными. Через 48 ч клетки собирали из лунок, промывали и метили PE/Cy5-конъюгированным антителом к CD83 (CD83-PE/Cy5 (BioLegend)). Экспрессию CD83 и EGFP на дендритных клетках затем оценивали с помощью проточной цитометрии (Applied Biosystems) и полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Экспрессия GFP поддавалась детектированию только в клетках, подвергнутых воздействию NG-47, в котором экспрессия EGFP находится под контролем экзогенного промотора ЦМВ, который не зависит от репликации вируса для экспрессии гена (фиг. 44).

Селективная экспрессия трансгенов в моделях в условиях *in vivo*.

Чтобы изучить селективность экспрессии трансгена в условиях *in vivo*, репортерные вирусы использовали для определения экспрессии трансгена в клетках карциномы мыши, которые, как известно, восприимчивы к репликации вируса EnAd. Экспрессию трансгена и функциональный иммунный ответ на трансген, вирус или опухоль оценивали, когда экспрессия трансгена находилась под контролем экзогенного промотора (ЦМВ) или эндогенного MLP.

Репортерные вирусы NG-61 и NG-63, экспрессирующие люминесцентный белок, люциферазу, ранее были описаны и охарактеризованы в примере 14. Мышам линии BALB/c подкожно в бок имплантировали 1×10^6 клеток карциномы толстой кишки мыши (CT26). После того, как средний размер опухоли достигал приблизительно 100 мм^3 , в опухоли путем инъекции вводили $2,5 \times 10^9$ частиц NG-61 или NG-63. В течение 14 суток после лечения мышей регулярно обследовали после внутрибрюшинной инъекции 32 мг люциферина с помощью визуализирующих методов с использованием камеры для регистрации изображения IVIS. Представляющие интерес области фиксированного размера чертили вокруг опухоли, чтобы обеспечить измерение относительных световых единиц (RLU) для каждой опухоли. Мышей, несущих необработанные опухоли, также исследовали с помощью визуализирующих методов для определения неспецифичного сигнала на изображениях. Количественное определение экспрессии трансгена по группам лечения выявило, что люцифераза поддавалась детектированию только в опухолях, обработанных вирусом NG-61, в котором люцифераза находится под контролем экзогенного промотора ЦМВ (фиг. 45А).

На 14 сутки после обработки у мышей иссекали селезенку и диссоциировали. Антитело к интерферону- γ иммобилизовали на ПВДФ-планшетах. Спленоциты и раздражители, такие как вирус EnAd, лизаты клеток CT26 или рекомбинантный белок люциферазы, расщепленный трипсином, вносили в ПВДФ-планшеты и инкубировали в течение ночи. Затем планшеты промывали, инкубировали с биотин-меченым антителом к интерферону- γ перед следующим этапом отмывки и инкубировали с конъюгатом стрептавидин-ALP. Планшеты вновь промывали, добавляли субстрат BCIP/NBT и оставляли планшеты инкубироваться для развития окрашивания до момента появления видимых отдельных пятен. Планшеты еще раз промывали и затем высушивали перед проведением исследований в CTL Europe, Германия. Количественное исследование выявило, что спленоциты от мышей, обработанных NG-61, но не NG-63, имели специфичные ответы на трансген люциферазы (фиг. 45В). Этот результат коррелирует с увеличе-

нием ответов у мышей, обработанных NG-61, на введение как вируса EnAd, так и опухолевых клеток CT26 (фиг. 45C и 45D).

Пример 27. Получение и определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих антитела (NG-190, NG-177) или варианты антитела scFv (NG-221) к белку-лиганду PD-L1, ингибитору системы сигнальных путей иммунной контрольной точки.

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмид pNG-177 (SEQ ID NO: 46, описана в примере 16), pNG-190 (SEQ ID NO: 60) и pNG-221 (SEQ ID NO: 61) путем непосредственной вставки кассет с трансгеном, кодирующих антитело к PD-L1 (YW243) или фрагмент scFv антитела к PD-L1, YW243, в уникальные сайты рестрикции, расположенные между генами L5 и E4. Кассета с трансгеном pNG-177 кодирует антитело к PD-L1 путем включения последовательности VH цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 30), последовательности константной области тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 34), последовательности участка внутренней посадки рибосомы (SEQ ID NO: 19), последовательности VL цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 32) и последовательности константной области легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 35). Кассета с трансгеном pNG-190 кодирует антитело к PD-L1 путем включения последовательности VH цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 30), последовательности константной области тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 34), последовательности пептида P2A, обладающего высокой эффективностью саморасщепления (SEQ ID NO: 25), последовательности VL цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 32) и последовательности константной области легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 35). Кассета с трансгеном pNG-221 кодирует scFv антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 37). Последовательности, кодирующие антитело или scFv, фланкированы 5'-концевой короткой акцепторной последовательностью сплайсинга (SEQ ID NO: 16) и 3'-концевой последовательностью полиаденилирования (SEQ ID NO: 20). Схемы вставленных кассет с трансгеном приведены на фиг. 34. Конструкцию плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Наработка вирусов.

Вирусы NG-190 и NG-221 амплифицировали и очищали в соответствии со способами, используемыми для очистки вируса NG-135, которые подробно описаны в примере 8.

Определение характеристик вируса.

Онколитическую активность (оценивали с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток), репликацию вируса (оценивали с помощью кПЦР) и экспрессию антитела к PD-L1 или scFv для вирусов NG-190 и NG-221 в клетках карциномы толстой кишки (оценивали с помощью ИФА) сопоставляли с аналогичными показателями для эталонного вируса EnAd или вирусов NG-165, NG-135, которые ранее были охарактеризованы и экспрессируют антитела к VEGF. Для оценки онколитической активности в сравнении с EnAd количественное исследование жизнеспособности клеток осуществляли в соответствии со способами, описанными в примере 15. Онколитическая активность вирусов NG-190 и NG-221 была аналогична таковой для EnAd (фиг. 46A, B).

Для оценки репликации вирусов или экспрессии антител клетки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 1×10^6 клеток/луноку, обеспечивали время для адгезии и инфицировали с использованием 100 частиц/клетку EnAd, NG-190, NG-221 или NG-165. Для проведения кПЦР ДНК собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования из клеточных лизатов и супернатантов в соответствии со способами, описанными в примере 18. Образцы экстрагированной ДНК исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 9. Общее количество геномов вируса, детектированное для NG-190 (фиг. 46C) или NG-221 (фиг. 46D), было аналогично таковому для эталонного вируса EnAd на протяжении всего периода инфицирования.

Для оценки экспрессии секретируемого антитела из клеток, инфицированных NG-190 или NG-165, очищенные инфекционные супернатанты, собранные через 24, 48 или 72 ч после инфицирования, разбавляли в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 и затем исследовали с помощью ИФА, используя антитело к IgG1 человека, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Аналогичным образом, экспрессию секретируемого антитела из клеток, инфицированных NG-177 или NG-135, оценивали в очищенных супернатантах через 72 ч после инфицирования. Концентрацию антитела в образцах определяли путем интерполирования из стандартной кривой, и полученные значения выявили, что детектируемое антитело секретируется из клеток, инфицированных NG-190, на уровне, который сопоставим с таковым для вируса-сравнения NG-165 (фиг. 47A), и из клеток, инфицированных NG-177, на уровне, который сопоставим с таковым для вируса-сравнения NG-135 (фиг. 49A).

Пример 28. Определение характеристик антитела к PD-L1 или фрагментов scFv антитела к PD-L1, экспрессируемых из клеток, инфицированных NG-190, NG-177 или NG-221.

Количественное исследование с использованием непосредственного связывания с PD-L1.

Связывающую активность антитела к PD-L1 или его scFv, экспрессируемого из клеток, инфицированных NG-190 и NG-221, оценивали с помощью ИФА с использованием непосредственного связывания с PD-L1.

Клетки карциномы легких A549 инфицировали в течение 72 ч с использованием 100 частиц/клетку NG-190, NG-221 или контрольного вируса NG-165. Супернатанты культур собирали и концентрировали

при 300g в течение 5 мин для удаления остатков клеток. Затем культуральные супернатанты концентрировали в 10 раз путем центрифугирования в центрифужной колонке для концентрации белка 9K MWCO (Pierce, 87748) в течение 20 мин при 4000g. Планшеты для ИФА (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) покрывали рекомбинантным PDL1-Fc (0,5 мкг/мл, R&D Systems, 156-B7-100) в течение ночи при 4°C. Планшеты три раза промывали с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и затем блокировали с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20. Серию последовательных удвоенных разведений концентрированных супернатантов получали в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 в диапазоне соотношений от 1:2 до 1:2048, добавляли в планшет для ИФА и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре.

Для образцов NG-190 и NG-165 планшеты трижды промывали с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и затем во все лунки вносили по 50 мкл антитела к легкой каппа-цепи (Abcam, ab124727), разведенного в соотношении 1:8000. После инкубации в течение 1 ч и промывки вторичное определение осуществляли с использованием антитела козы к VH и VL цепям IgG кролика (HRP) (Abcam, ab6721). Развитие окрашивания в планшете индуцировали добавлением 50 мкл/лунку раствора субстрата 1-Step Ultra TMB для ИФА (Thermo, 34028). Через 20 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl, измеряли величины оптической плотности при 450 нм и наносили на график. Связывающую активность антитела к PD-L1 можно специфично детектировать в супернатантах клеток A549, инфицированных NG-190, но не клеток A549, инфицированных NG-165 (фиг. 47B).

Для детектирования образцов NG-221 планшеты трижды промывали с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и затем во все лунки добавляли по 50 мкл антитела 6xHis tag® (HRP) (Abcam, ab1187), разбавленного в соотношении 1:5000, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и после этого промывали. Развитие окрашивания в планшете индуцировали путем добавления 50 мкл/лунку раствора субстрата 1-Step Ultra TMB для ИФА (Thermo, 34028). Через 20 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Связывающую активность фрагмента scFv антитела к PD-L1 можно специфично детектировать в супернатантах NG-221 (фиг. 47C).

Количественное исследование ингибирования связывания рецептора PD-L1.

Блокирующую активность антитела к PD-L1, экспрессируемого в супернатанте клеток, инфицированных NG-190 или NG-177, оценивали с помощью количественного исследования взаимодействия лиганд PD-L1:рецептор PD-L1.

Клетки 293 инфицировали в течение 72 ч с использованием 100 частиц/клетку NG-190 или NG-177. Супернатанты культур собирали и концентрировали в соответствии со способом, подробно описанным выше. Планшеты для ИФА покрывали PDL1-Fc (2 мкг/мл, R&D Systems, 156-B7-100) в течение ночи при 4°C. Планшеты три раза промывали с использованием ФСБ, затем блокировали 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Серийные удвоенные разведения концентрированных супернатантов готовили в ФСБ и затем по 45 мкл каждого разведения добавляли в планшет для ИФА. В каждую лунку добавляли по 10 нг рекомбинантного PD1-Fc (R&D Systems, 1086-PD-050) и планшет инкубировали в течение 1 ч. Все лунки затем промывали три раза с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и блокировали в течение 10 мин с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин 20. В лунки вносили по 0,4 мкг/мл биотинилированного антитела к PD-1 человека, очищенного с помощью аффинного связывания (R&D Systems, BAF1086) и инкубировали в течение 1 ч. Лунки трижды промывали с использованием ФСБ/0,05% твин-20 перед добавлением стрептавидина-ПХ (R&D Systems, DY998), разбавленного в соотношении 1:200, и инкубировали в течение 1 ч. Развитие окрашивания в планшете индуцировали путем добавления 50 мкл/лунку раствора субстрата 1-Step Ultra TMB для ИФА (Thermo, 34028). Через 20 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Для того чтобы определить процент связывания PD-1, измеренные значения оптической плотности выражали в процентах от величины в контрольных образцах, которые не содержали антитела к PD-L1. Антитело к PD-L1, секретируемое из клеток, инфицированных NG-190, обладало способностью ингибировать связывание рецептора PD-1 в зависимости от дозы (фиг. 47D). Аналогичным образом, неразбавленный супернатант из клеток, инфицированных NG-177, но не NG-135, обладал способностью ингибировать связывание рецептора PD-1 с PD-L1 на >50% (фиг. 49B).

Реакция смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ-реакция).

Функциональную активность антитела к PD-L1, экспрессируемого в супернатанте клеток, инфицированных NG-190 или NG-177, оценивали по степени активации Т-клеток в реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделяли из свежей крови человека (Clinical Trials Laboratory Services) путем центрифугирования крови, разведенной в соотношении 1:2, в 13 мл среды Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, 17-1440-02) при 1300 об/мин в течение 30 мин. Моноциты CD14⁺ выделяли с использованием микрогранул, нагруженных антителами к CD14 человека (Miltenyi, 130-050-201), в соответствии с протоколом производителя. Выделенные моноциты культивировали в среде RPMI 1640 (Life Technologies, 11875-093), дополненной 2 mM L-глутамин (GE Healthcare: M11-003), 1 mM пирувата натрия (GE Healthcare: S11-003), 1 mM заменимых аминокислот (GE Healthcare:

M11-004), 1 мМ пен./стреп. (GE Healthcare: P11-010) и 10% ФБС (Thermo Fisher, SV30160.03), 500 Ед/мл ИЛ-4 (R&D Systems, 204-IL-050) и 800 Ед/мл ГМ-КСФ (R&D Systems, 215-GM-050). Культуры обеспечивали свежими питательными веществами через каждые 2 дня путем замены половины объема культуральной среды свежей средой.

Созревание дендритных клеток моноцитарного происхождения индуцировали на 5 сутки культивирования путем добавления 1 нг/мл ЛПС (Sigma-Aldrich, L2654) в течение 24 ч. Клетки использовали для количественного исследования СКЛ-реакции на 6 сутки.

CD4 Т-клетки выделяли из МКПК (выделенных, как описано выше) с использованием набора для выделения CD4⁺ лимфоцитов человека (Miltenyi, 130-096-533) в соответствии с протоколом производителя. Выделенные CD4⁺ Т-клетки использовали для исследования СКЛ-реакции в день выделения.

Для исследования СКЛ-реакции по 1×10^5 выделенных CD4⁺ Т-клеток на лунку смешивали с 2×10^4 дендритных клеток моноцитарного происхождения, созревших под воздействием ЛПС, и затем в испытываемые лунки вносили антитело к PD-L1, использованное в качестве положительного контроля (5 мкг/мл, BioLegend 329716), или 20 мкл концентрированных супернатантов (полученных, как описано выше). СКЛ инкубировали в течение 4 суток при 37°C. Супернатанты удаляли из планшетов, очищали и затем количественно исследовали для определения присутствия цитокина ИЛ-2 с помощью ИФА. В общих чертах, планшеты для ИФА покрывали мАт к ИЛ-2 человека (R&D Systems, MAB602) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали три раза с использованием ФСБ, затем блокировали с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Стандартную кривую для ИЛ-2 получали с использованием рекомбинантного белка ИЛ-2 (R&D Systems, 202-IL-050) в диапазоне концентраций от 2000 до 31,3 пг/мл. Образцы для СКЛ получали с помощью разбавления в соотношении 1:4 очищенных супернатантов, полученных ранее, с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20. В планшеты для ИФА вносили по 50 мкл/лунку образцов и стандартов и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем планшеты промывали три раза с использованием ФСБ/0,05% твин-20 перед добавлением биотинилированного детектирующего антитела к ИЛ-2 человека (R&D Systems, BAF202). После инкубации в течение 1 ч планшет промывали еще три раза с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и вносили стрептавидин-ПХ (R&D Systems, DY998), разбавленный в соотношении 1:200, дополнительно инкубировали в течение 1 ч. Развитие окрашивания в планшете индуцировали путем добавления 50 мкл/лунку раствора субстрата 1-Step Ultra TMB для ИФА (Thermo, 34028). Через 20 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Для двух различных донорских наборов ДК:Т-клетки из независимых экспериментов усиленные ответы CD4 Т-клеток, т.е. повышенную экспрессию ИЛ-2, можно было детектировать в супернатантах культур, инфицированных NG-190, но не NG-165 (фиг. 48А и 48В). Аналогичным образом, ответы CD4 Т-клеток также были усиленными для супернатантов культур, инфицированных NG-177, но не NG-135 (фиг. 49С). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что функциональное антитело к PD-L1 вырабатывается в опухолевых клетках, инфицированных вирусами, несущими NG-190 или NG-177.

Связывание лиганда PD-L1 в клетках.

Связывающую активность антитела к PD-L1, экспрессированного из клеток, инфицированных NG-177, оценивали по его способности непосредственно связываться с нерекombинантным лигандом PD-L1, экспрессированным в мембранной среде на поверхности клеток карциномы легких (A549).

Клетки A549 стимулировали с использованием 50 нг/мл человеческого ИФН- γ , чтобы усилить активность экспрессии PD-L1 на поверхности клеток, или оставляли нестимулированными. Через 24 ч клетки обрабатывали трипсином и инкубировали в течение 1 ч при 4°C только со средой, или 50 мкл концентрированного супернатанта клеток, инфицированных NG-177 или NG-135 (полученного, как описано выше). Клетки дважды промывали с использованием ФСБ/1% БСА перед инкубацией в течение 30 мин при 4°C с 50 мкл меченого Alexa Fluor® 488 антитела козы к IgG человека (H + L) (Life Technologies, A11013), разбавленного в соотношении 1:250. Клетки отмывали еще один раз, повторно суспендировали в ФСБ/1% БСА и исследовали с помощью цитометра с акустической фокусировкой Attune (Life Technologies). Связывающая активность антитела к PD-L1, которая была сопоставима с таковой для связывания ФЭ-меченого очищенного контрольного антитела к PD-L1 (29E.2A3 от BioLegend), поддавалась детектированию в супернатантах клеток, инфицированных NG-177, но не детектировалась в супернатантах клеток, инфицированных контрольным вирусом NG-135 (фиг. 50).

Пример 29. Получение и определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих антитела к белку CTLA-4, ингибитору системы сигнальных путей иммунной контрольной точки (NG-242).

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмиды pNG-242 (SEQ ID NO: 58) путем непосредственной вставки кассет с трансгеном, кодирующих антитело к CTLA-4 (11.2.1), в уникальные сайты рестрикции, расположенные между генами L5 и E4. Кассета с трансгеном pNG-242 кодирует антитело к CTLA-4 путем включения последовательности VH цепи антитела к CTLA-4 (SEQ ID NO: 70), последовательности константной области тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 33), последовательности участка внутренней посадки рибосомы (SEQ ID NO: 19), последовательности VL цепи антитела к CTLA-4 (SEQ ID NO: 71) и последовательности константной области легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 35).

Схемы вставленных кассет с трансгеном приведены на фиг. 34. Конструкцию плазмиды подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Наработка вируса.

Вирус NG-242 амплифицировали и очищали в соответствии со способами, использованными для очистки вируса NG-135, которые подробно описаны в примере 8.

Определение характеристик вируса.

Онколитическую активность (оценивали с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток) и экспрессию антитела к CTLA-4 (оценивали с помощью ИФА) для вируса NG-242 сравнивали с аналогичными показателями для эталонного вируса EnAd или эталонного вируса NG-135, экспрессирующего антитело к VEGF, в клетках карциномы толстой кишки. Для оценки онколитической активности в сравнении с EnAd количественное исследование жизнеспособности клеток осуществляли в соответствии со способами, подробно описанными в примере 15. Активность вируса NG-242 была сопоставима с таковой для эталонного материала EnAd промышленного изготовления (фиг. 51A).

Для оценки экспрессии антител клетки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 1×10^6 клеток/лунку, обеспечивали время для адгезии и инфицировали с использованием 100 частиц/клетку EnAd, NG-242 или NG-135. Инфекционные супернатанты собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования, разводили в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20 и затем исследовали с помощью ИФА с использованием антитела к IgG1 человека в соответствии со способами, описанными в примере 18. Концентрацию антитела в образцах определяли путем интерполирования из стандартной кривой, и полученные значения выявили, что уровни секреции детектируемого антитела из клеток, инфицированных NG-242, аналогичны уровням для вируса-сравнения NG-135 (фиг. 51B).

Количественное исследование с использованием прямого связывания с CTLA-4.

Связывающую активность антитела к CTLA-4, экспрессированного из клеток, инфицированных NG-242, оценивали с помощью ИФА с использованием прямого связывания с CTLA-4.

Клетки A549 инфицировали в течение 72 ч с использованием 100 частиц/клетку NG-242 или контрольного вируса NG-165, экспрессирующего антитело IgG1 к VEGF. Супернатанты культур собирали и концентрировали при 300g в течение 5 мин для удаления остатков клеток. Планшеты для ИФА покрывали рекомбинантным CTLA4-Fc (0,5 мкг/мл, R&D Systems, 325-CT-200) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали три раза с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и затем блокировали с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20. Серийные удвоенные разведения концентрированных супернатантов получали с использованием в ФСБ/3% БСА/0,05% твин-20, в диапазоне соотношений от 1:2 до 1:2048, затем вносили в планшет для ИФА и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Указанный планшет для ИФА затем обрабатывали в соответствии со способами детектирования связывания с PD-L1, которые подробно описаны в примере 28. Связывающую активность антитела к CTLA-4 можно специфично детектировать в супернатантах клеток A549, инфицированных NG-242, но не клеток A549, инфицированных NG-165 (фиг. 51C).

Исследование ингибирования связывания с рецептором CTLA-4.

Блокирующую активность антитела к CTLA-4, экспрессированного в супернатанте клеток, инфицированных NG-242, оценивали с помощью количественного исследования взаимодействия лиганд CTLA-4:рецептор B7-1.

Супернатанты культур из клеток, инфицированных NG-242, описанных выше, собирали и концентрировали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 28. Планшеты для ИФА покрывали CTLA4-Fc (2 мкг/мл, R&D Systems, 325-CT-200) в течение ночи при температуре 4°C. Планшеты три раза промывали с использованием ФСБ, затем блокировали с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20 в течение 1 ч при комнатной температуре. Серийные удвоенные разведения концентрированных супернатантов готовили в ФСБ и в лунки планшета для ИФА вносили по 45 мкл каждого разведения. В каждую лунку добавляли по 10 нг рекомбинантного B7-1-Fc (R&D Systems, 140-B1-100) и планшет инкубировали в течение 1 ч. Затем все лунки промывали три раза с использованием ФСБ/0,05% твин-20 и блокировали в течение 10 мин с использованием 3% БСА в ФСБ/0,05% твин-20. В планшеты вносили по 2 мкг/мл биотинилированного антитела к B7-1 человека (R&D Systems, BAM-402) и планшет инкубировали в течение 1 ч. Планшет промывали три раза и вносили стрептавидин-ПХ (R&D Systems, DY998) в разведении 1:200. Развитие окрашивания в планшете индуцировали путем добавления 50 мкл/лунку раствора субстрата 1-Step Ultra TMB для ИФА (Thermo, 34028). Через 20 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Результаты анализировали путем деления величины оптической плотности образца на величину для контрольного образца (без испытываемого ингибитора) и умножали на 100, чтобы определить долю максимального количества связанного B7-1. Антитело к CTLA-4, секретируемое из клеток, инфицированных NG-242, обладало способностью ингибировать связывание рецептора B7-1 (фиг. 51D).

Пример 30. Получение и определение характеристик вирусов EnAd, кодирующих ассоциированные с опухолью антигены (TAA) (NG-217, NG-220).

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмид pNG-217 (SEQ ID NO: 57), pNG-220 (SEQ ID NO: 56) путем непосредственной вставки кассет с трансгеном, коди-

рующих ассоциированный с опухолью антиген, NY-ESO-1, в уникальные сайты рестрикции, расположенные между генами L5 и E4. Кассета с трансгеном pNG-217 кодирует ген NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 43), фланкированный последовательностью промотора ЦМВ (SEQ ID NO: 13) и 3'-концевой последовательностью полиаденилирования (SEQ ID NO: 20). Кассета с трансгеном pNG-220 кодирует ген NY-ESO-1, фланкированный последовательностью промотора PGK (SEQ ID NO: 14) и 3'-концевой последовательностью полиаденилирования (SEQ ID NO: 20). Схемы вставленных кассет с трансгеном приведены на фиг. 34. Конструкции плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Наработка вируса.

Вирусы NG-217 и NG-220 амплифицировали и очищали в соответствии со способами, используемыми для очистки вируса NG-135, которые подробно описаны в примере 8.

Определение характеристик вируса.

Репликацию вирусов NG-220 и NG-217 (оценивали с помощью кГТЦР) и экспрессию трансгена NY-ESO-1, кодируемого NG-220, в клетках карциномы толстой кишки (оценивали с помощью вестерн-блоттинга) сравнивали с аналогичными показателями для EnAd. Чтобы оценить репликацию вируса, клетки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 1×10^6 клеток/лунку, обеспечивали время для адгезии и инфицировали с использованием 100 частиц/клетку EnAd, NG-220 или NG-217. Для проведения кГТЦР ДНК собирали через 24 или 48 ч после инфекции из клеточных лизатов и супернатантов в соответствии со способами, подробно описанными в примере 18. Экстрагированные образцы ДНК исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 9. Общее количество вирусных геномов, детектированное для NG-220 (фиг. 52A) или NG-217 (фиг. 52B), было аналогично таковому для эталонного вируса EnAd.

Для оценки экспрессии NY-ESO-1 с помощью вестерн-блоттинга клетки HT-29 высевали в 6-луночные планшеты для культивирования при плотности 4×10^6 клеток/лунку и инкубировали в течение 5 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки инфицировали в течение 48 или 72 ч с использованием 100 вирусных частиц/клетку NG-220 или EnAd. Среды удаляли из лунок, и клетки промывали один раз с использованием ФСБ перед лизированием в 250 мкл буфера для лизиса (150 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 0,5% ДСН, 50 mM Трис-HCl (pH 7,5)), содержащего коктейль ингибиторов протеаз III (Calbiochem: 539134). Лизаты обрабатывали бензоназой, чтобы разрушить геномную ДНК, и дополнительно разводили в соотношении 1:4 в буфере для лизиса, содержащем буфер для образцов NuPAGE LDS и восстанавливающий агент NuPAGE (Life Technologies). Образцы нагревали в течение 10 мин до 70°C перед проведением электрофореза в ДСН-ПААГ с использованием 4-12% бис-трис гелей NuPAGE (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Белки переносили на мембраны из ПВДФ методом вестерн-блоттинга с использованием модуля для блоттинга Xcell II (Life Technologies). Блокирование и иммуноблоттинг проводили в ФСБ/0,1% твин-20 с добавлением 5% сухого молока и все этапы промывки проводили в ФСБ/0,1% твин-20. NY-ESO-1 детектировали с помощью мышиного моноклонального антитела к NY-ESO-1 (3 мкг/мл) и детектирование с помощью вторичного антитела осуществляли с использованием конъюгированного с ПХ IgG кролика к иммуноглобулину мыши. Белки визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции. Экспрессия NY-ESO-1 подавалась детектированию через 48 и 72 ч после инфицирования вирусом NG-220, но не контрольным вирусом EnAd (фиг. 52B).

Пример 31. Конструирование плазмиды для клонирования EnAd, pEnAd2.4, для вставки кассет с трансгеном в направлении 3'-конца относительно гена фибриллы L5.

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) получали путем гомологичной рекомбинации между челночным вектором, pEnAd2.4 Shuttle, и геном EnAd. Плазида pEn2.4 содержит бактериальную точку инициации репликации p15A, ген устойчивости к канамицину и геном EnAd с уникальными сайтами рестрикции, вставленными в область B_Y.

Плазмиду pColoAd2.4 конструировали, как описано далее. В первую очередь была сконструирована челочная плазида размером 12 тыс. п.н., pColoAd1 Shuttle, которая позволяла ввести уникальные сайты рестрикции в последовательность позднего гена, L5, в области генома EnAd (область B_Y). 5'-конец (нуклеотиды 1-4632) и 3'-конец (нуклеотиды 27837-32326) EnAd амплифицировали из генома EnAd с помощью ПЦР с использованием

праймера 5'-TTGGCGGCGCGCCTATCTATATAATATACC-3' [SEQ ID NO: 80] и

праймеров 5'-AATGCAATCTGTGAGGGG-3' [SEQ ID NO: 82] или 5'-CTTAGTGGTGTGTGGTATTGG-3' [SEQ ID NO: 83] соответственно.

5'-концевой участок продукта ПЦР содержал введенный 5'-концевой сайт AscI и 3'-концевой сайт PspOMI, который соответствует сайту PspOMI в положении нуклеотида 4626 в геноме EnAd. 3'-концевой участок продукта ПЦР содержал 5'-концевой сайт PspOMI, который соответствовал сайту PspOMI в положении нуклеотида 27837 в геноме EnAd, и введенный 3'-коцевой сайт AscI. Продукты ПЦР расщепляли с помощью ферментов рестрикции AscI/PspOMI и лигировали с помощью одностадийного трехкомпонентного лигирования в плазмиду, линейаризованную с помощью AscI, которая содержала точку начала

репликации p15A и кассету устойчивости к канамицину. Этот этап позволил получить плазмиду pEnAd Shuttle. Фрагмент ДНК, соответствующий области генома EnAd, которая фланкирована сайтами рестрикции PspOMI и AclI и содержит поздний ген, L5, (нуклеотиды 27837-30060), синтезировали с добавленным участком 19 п.н. 5'-GCGATCGCTACCCTGCAGG-3' [SEQ ID NO: 90], вставленной в положение, соответствующее нуклеотиду 29356 EnAd в области В_γ. Указанная дополнительная область включала сайты рестрикции для двух ферментов, которые не присутствуют в геноме EnAd (GCGATCGC и CCTGCAGG), и может быть разрезана с помощью SgfI и SbfI. Синтезированный фрагмент ДНК расщепляли с помощью ферментов рестрикции PspOMI и AclI и клонировали в соответствующую область челночной плазмиды pColoAd1 shuttle, расщепленной ферментами рестрикции PspOMI/AclI, чтобы получить челночную плазмиду, pColoAd2.4 shuttle. Для того чтобы получить плазмиду pColoAd2.4 путем гомологичной рекомбинации, челночную плазмиду pColoAd2.4 shuttle линейаризовали с помощью фермента рестрикции PspOMI и обрабатывали щелочной фосфатазой для удаления 5'-концевых фосфатов. Линейаризованную плазмиду и геном EnAd совместно трансформировали в клетки BJ5183 с помощью электропорации в соответствии с протоколом производителя и получение плазмиды pColoAd2.4 путем гомологичной рекомбинации определяли с помощью расщепления ферментами рестрикции. Корректную конструкцию всех плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Пример 32. Синтез плазмиды для клонирования EnAd, pColoAd2.6, для вставки кассет с трансгеном в направлении 5'-конца или 3'-конца относительно гена фибриллы L5.

Плазмида pColoAd2.6 (pNG-185, SEQ ID NO: 65) была синтезирована с помощью метода сборки фрагментов синтетических генов компанией SGI-DNA (Ла-Йолла, Калифорния, США). Корректную конструкцию плазмиды подтверждали с использованием секвенирования следующего поколения (SGI-DNA). Плазмида pNG-185 содержит бактериальную точку инициации репликации p15A, ген устойчивости к канамицину и геном EnAd с уникальными сайтами рестрикции, вставленными в области В_χ и В_γ.

Наработка вируса.

Вирус NG-185 амплифицировали и очищали в соответствии со способами, использованными для очистки вируса NG-135, которые подробно описаны в примере 8.

Определение характеристик вируса.

Онколитическую активность (оценивали с помощью количественного исследования жизнеспособности клеток) и репликацию вируса NG-185 (оценивали с помощью кПЦР) сравнивали с аналогичными показателями для эталонного вируса EnAd. Для оценки онколитической активности в сравнении с EnAd количественное исследование жизнеспособности клеток осуществляли в соответствии со способами, подробно описанными в примере 15. Онколитическая активность NG-185 была аналогична таковой для EnAd (фиг. 53A).

Для оценки репликации вируса клетки HT-29 высевали в 12-луночные планшеты для культивирования при плотности 1×10^6 клеток/луночку, обеспечивали время для адгезии и инфицировали с использованием 100 частиц/клетку EnAd или NG-185. Для проведения кПЦР ДНК собирали через 48 или 72 ч после инфицирования из клеточных лизатов и супернатантов в соответствии со способами, описанными в примере 18. Экстрагированные образцы ДНК исследовали с помощью кПЦР с использованием набора, включающего зонд и специфичные праймеры для гена E3 EnAd, в соответствии со способами, подробно описанными в примере 9. Общее количество вирусных геномов, детектированное для NG-185 (фиг. 53B), было аналогично таковому для эталонного вируса EnAd на протяжении всего времени инфицирования.

Пример 33. Получение вирусов EnAd из плазмиды pColoAd2.6 (pNG-185).

Плазмиду pEnAd2.6 (SEQ ID NO: 65) использовали для получения плазмид pNG-257 и pNG-281 путем непосредственной вставки кассет с трансгеном в уникальные сайты рестрикции pEnAd2.6, расположенные в областях В_χ и В_γ. pNG-257 содержит кассету с трансгеном, кодирующую scFv к VEGF (SEQ ID NO: 36) с С-концевой гексагистидиновой пептидной меткой (SEQ ID NO: 23), фланкированную 5'-bSA (SEQ ID NO: 18) и 3'-концевой последовательностью поли(А) (SEQ ID NO: 20), которая вставлена в область В_χ.

pNG-281 содержит кассету с трансгеном, кодирующую фрагмент scFv антитела к VEGF (SEQ ID NO: 36) с С-концевой гексагистидиновой пептидной меткой (SEQ ID NO: 23), фланкированную 5'-bSA (SEQ ID NO: 18) и 3'-концевой последовательностью поли(А) (SEQ ID NO: 20), которая вставлена в область В_χ, и вторую кассету с трансгеном, кодирующую фрагмент scFv антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 37) с меткой V5 (SEQ ID NO: 24), фланкированную 5'-SSA (SEQ ID NO: 16) и 3'-концевой последовательностью поли(А) (SEQ ID NO: 20), которая вставлена в область В_γ. Схемы вставленных кассет с трансгеном в плаزمиды pNG-257 и pNG-281 приведены на фиг. 54. Конструкцию плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Указанные плазмиды содержат вирусные геномы NG-257 (SEQ ID NO: 72) и NG-281 (SEQ ID NO: 73).

Пример 34. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих нескольких вариантов фрагментов scFv антител.

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмиды pNG-272 путем непосредственной вставки кассеты, кодирующей фрагмент scFv антитела к VEGF и фрагмент scFv антитела к PD-L1, в уникальные сайты рестрикции, расположенные между генами L5 и E4 (область B_Y). Кассета с трансгеном pNG-272 кодирует фрагмент scFv антитела к PD-L1 и фрагмент scFv антитела к VEGF за счет включения последовательности scFv антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 37), последовательности пептида P2A с высокой эффективностью саморасщепления (SEQ ID NO: 25), последовательности scFv антитела к VEGF (SEQ ID NO: 36) и 3'-концевой последовательности полиаденилирования (SEQ ID NO: 20.). Схемы вставленных кассет с трансгеном приведены на фиг. 54. Конструкции плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Наработка вируса.

Вирус NG-272 (SEQ ID NO: 69) амплифицировали и очищали в соответствии со способами, использованными для очистки вируса NG-135, которые подробно описаны в примере 8.

Пример 35. Получение вирусов EnAd, кодирующих трансмембранный белок, симпортер натрия/йодида (NIS).

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмиды pNG-280 путем непосредственной вставки кассеты с трансгеном, кодирующей симпортер натрия/йодида (NIS) в область B_Y. Кассета pNG-280 содержит 5'-SSA (SEQ ID NO: 16), последовательность кДНК NIS (SEQ ID NO: 67) и 3'-последовательность поли(A) (SEQ ID NO: 20) и кодирует геном вируса NG-280 (SEQ ID NO: 68). Схемы вставленных кассет с трансгеном приведены на фиг. 54. Конструкции плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Пример 36. Получение вирусов EnAd, экспрессирующих мшПНК.

Плазмиду pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) использовали для получения плазмид pNG-sh01 и pNG-sh02 путем непосредственной вставки кассет, кодирующих соответственно мшПНК к белку GAPDH или контрольную мшПНК, которая не обладает гомологией последовательности с любым геном человека. Кассета pNG-sh01 содержит промотор U6 ПНК-полимеразы III человека и последовательность мшПНК, содержащую 29 п.н. антисмысловой последовательности, последовательность петли, 29 п.н. смысловой последовательности и 3'-последовательность TTTTТТ. Схемы вставленных кассет с трансгеном приведены на фиг. 54. Конструкции плазмид подтверждали с помощью секвенирования ДНК.

Наработка и определение характеристик вируса.

Вирусы NG-sh01 (SEQ ID NO: 66) и NG-sh02 амплифицировали и очищали в соответствии со способами, использованными для очистки вируса NG-135, которые подробно описаны в примере 8. Экспрессия GAPDH в линиях клеток человека снижается в клетках, обработанных NG-sh01, но не в клетках, обработанных NG-sh02.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Онколитический аденовирус группы В, способный к репликации, содержащий нуклеотидную последовательность формулы

$$5'\text{-ITR-B}_1\text{-B}_A\text{-B}_2\text{-B}_X\text{-B}_B\text{-B}_Y\text{-B}_3\text{-3'ITR},$$

в которой B₁ содержит структурный элемент E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит структурный элемент E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ представляет собой связь или содержит структурный элемент E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции и/или один или более трансгенов;

B_B содержит структурный элемент L5;

B_Y содержит кассету, содержащую трансген и акцепторную последовательность сплайсинга; и

B₃ представляет собой связь или содержит структурный элемент E4;

при этом указанная кассета находится под контролем эндогенного промотора, выбранного из промотора E4 и основного промотора поздних генов.

2. Аденовирус по п.1, отличающийся тем, что B_Y дополнительно содержит некодирующую последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность ДНК, которая гибридизуется с указанной последовательностью в жестких условиях.

3. Аденовирус по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанная акцепторная последовательность сплайсинга выбрана из CAGG, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18.

4. Аденовирус по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная кассета в положении B_Y дополнительно содержит последовательность участка внутренней посадки рибосомы.

5. Аденовирус по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанная кассета в положении B_Y дополнительно содержит пептид 2A с высокой эффективностью саморасщепления.

6. Аденовирус по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанная кассета в положении B_Y дополнительно содержит последовательность Козак.

7. Аденовирус по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанная кассета в положении В_У дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.

8. Аденовирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанная кассета в положении В_У дополнительно содержит сайт рестрикции на 3'-конце последовательности указанной кассеты и/или на 5'-конце последовательности указанной кассеты.

9. Аденовирус по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная кассета в положении В_У содержит трансген, который кодирует антитело или его связывающий фрагмент, причем указанное антитело или его связывающий фрагмент является специфичным в отношении OX40, лиганда OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, лиганда CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS, лиганда ICOS, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT, CD160, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2.

10. Аденовирус по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная кассета в положении В_У содержит трансген, который кодирует цитокин, причем указанный цитокин выбран из группы, содержащей IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , TGF- β , лимфотоксин α (LTA) и ГМ-КСФ.

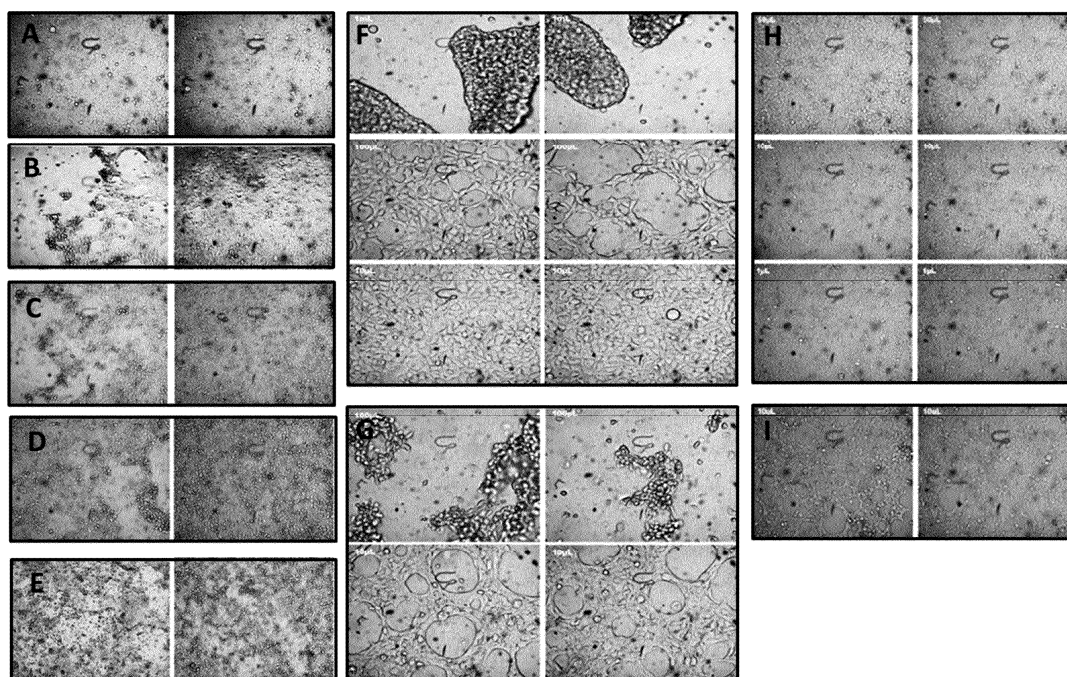
11. Аденовирус по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанная кассета в положении В_У содержит трансген, который кодирует хемокин, причем указанный хемокин выбран из группы, содержащей IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CRTN2.

12. Аденовирус по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанный вирус содержит последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 73.

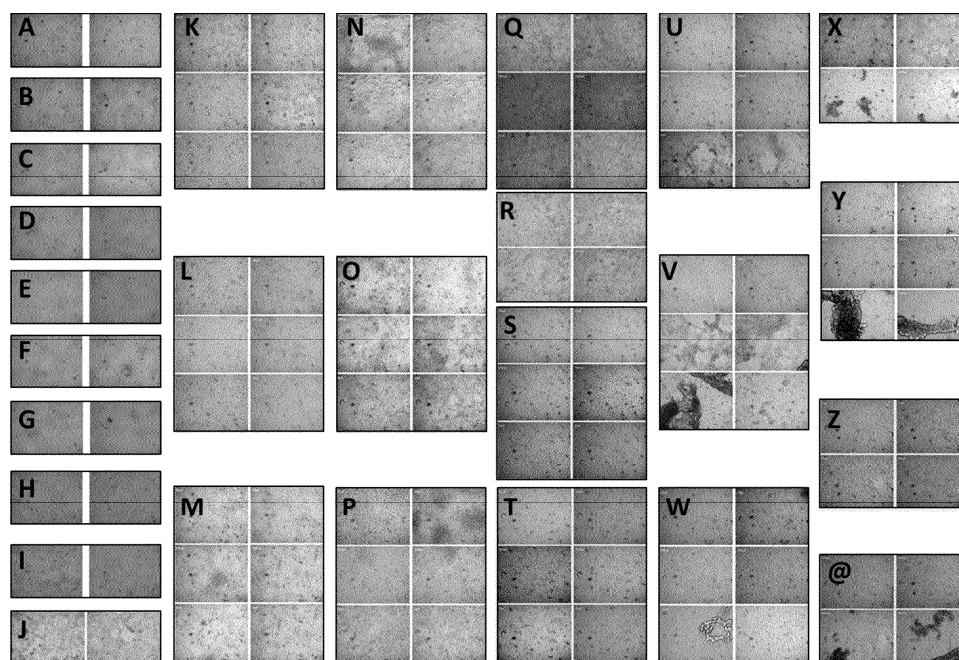
13. Применение аденовируса по любому из пп.1-12 в терапии рака.

14. Онколитическая терапевтическая композиция, содержащая в эффективном количестве аденовирус по любому из пп.1-12.

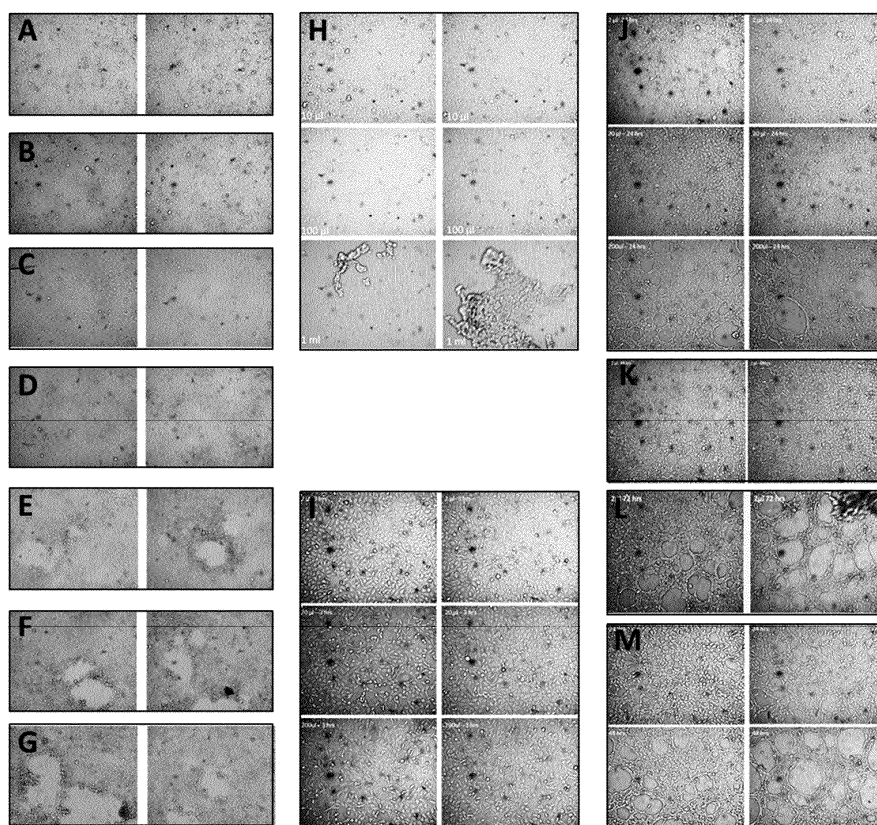
15. Применение композиции по п.14 для лечения рака.



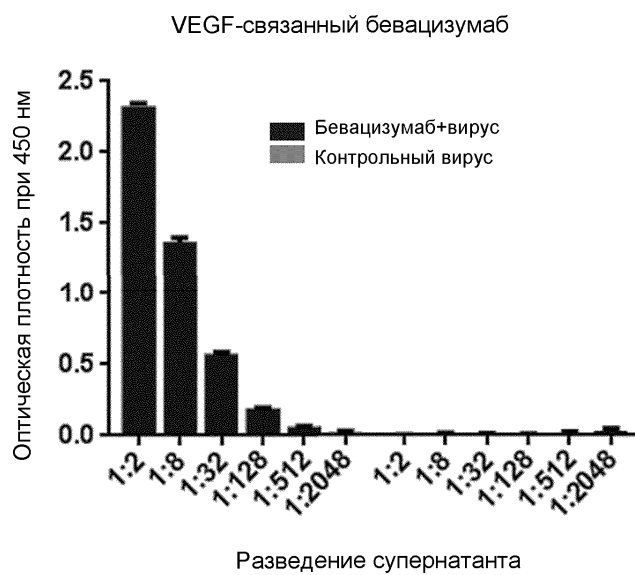
Фиг. 1



Фиг. 2

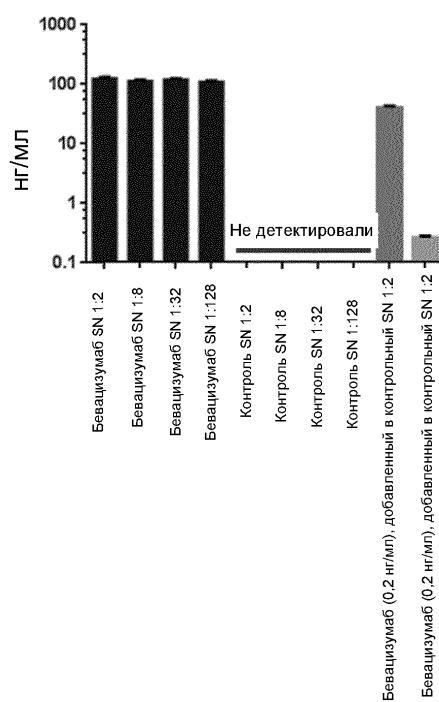


Фиг. 3

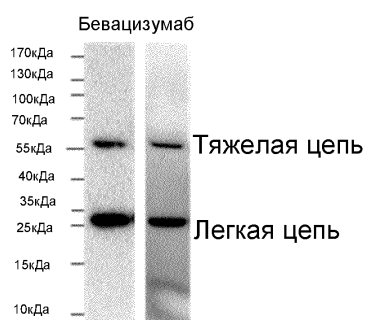


Фиг. 4А

VEGF-связанный бевацизумаб (нг/мл на лунку)

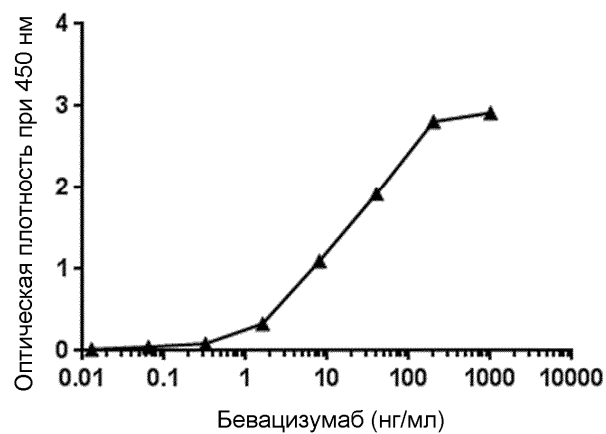


Фиг. 4В

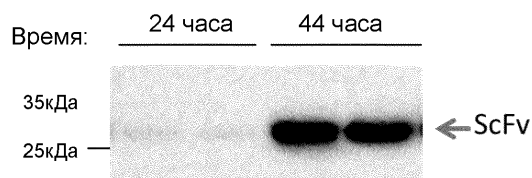


Фиг. 5

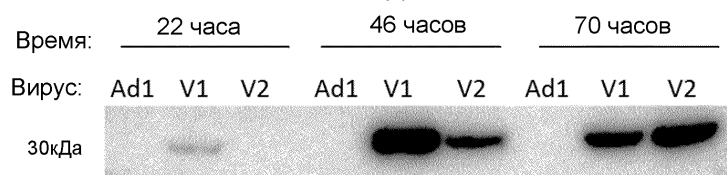
Стандартная кривая для клинического препарата



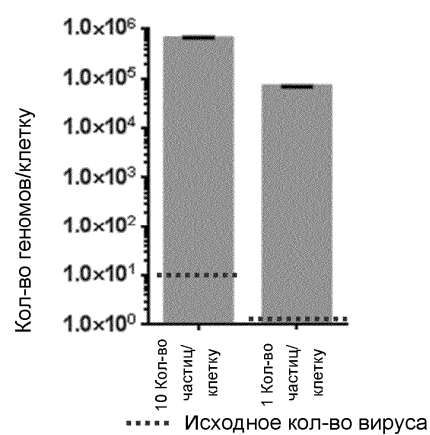
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

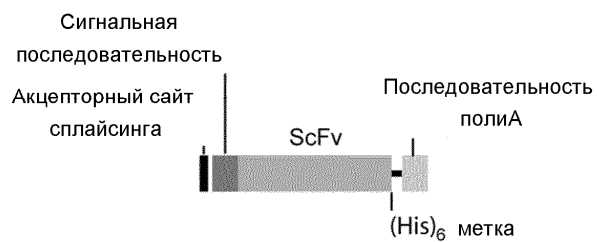


Фиг. 9

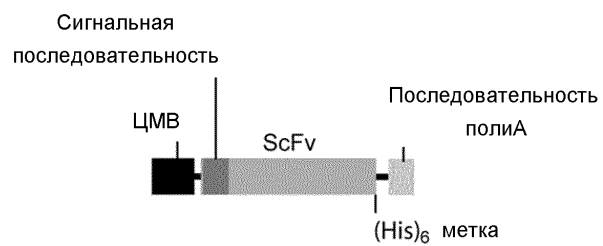
A NG-135



B NG-78

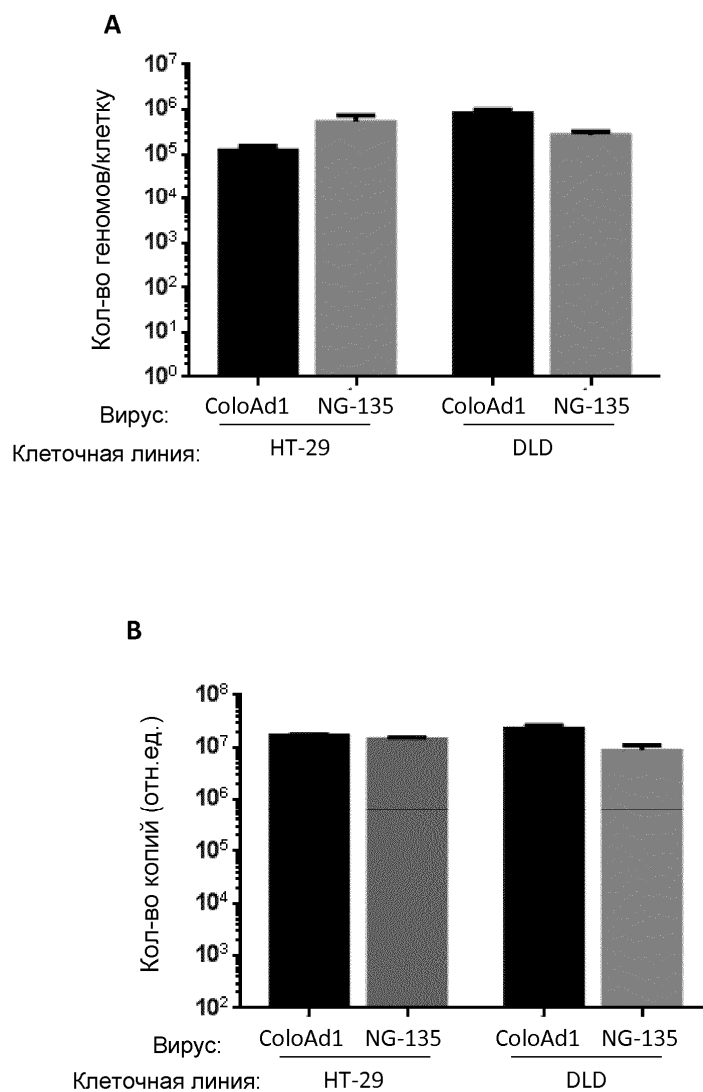


C NG-76



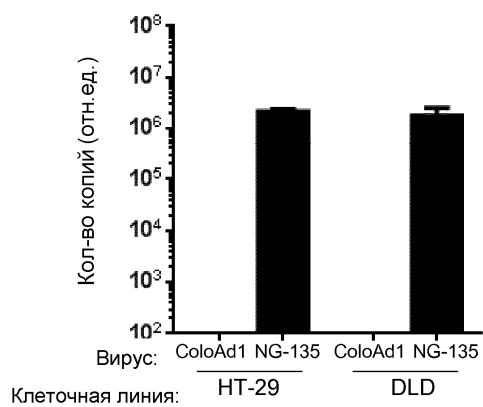
Фиг. 10

ColoAd1 = EnAd

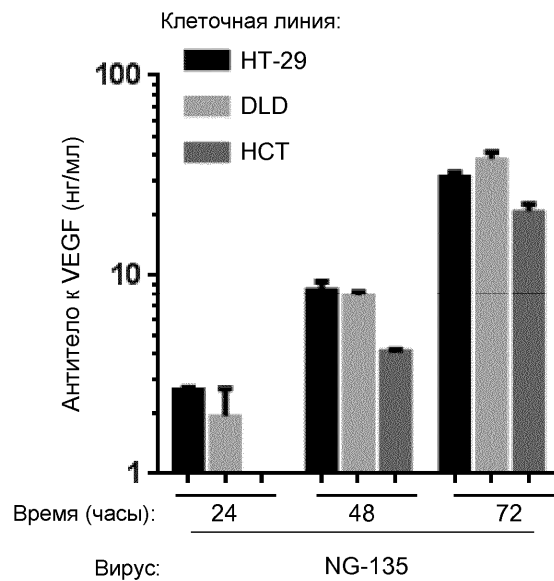


Фиг. 11

ColoAd1 = EnAd

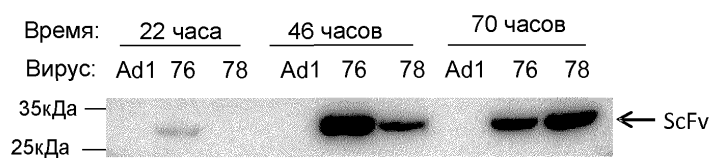
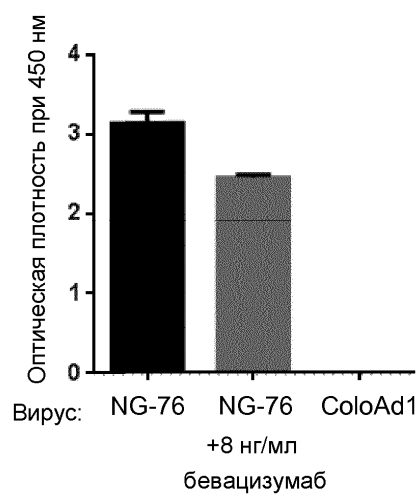


Фиг. 12



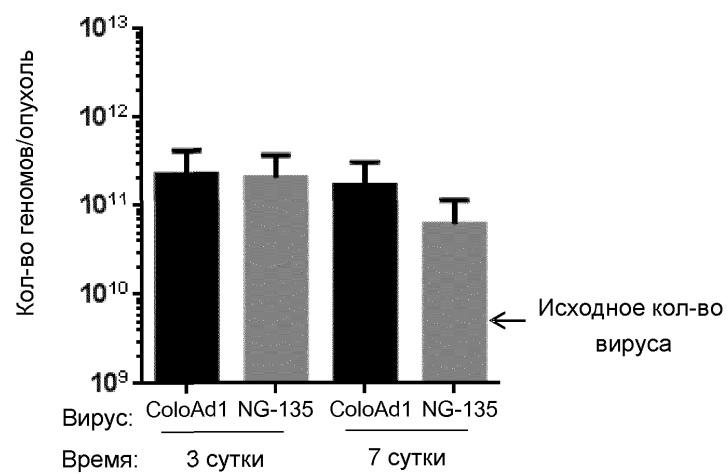
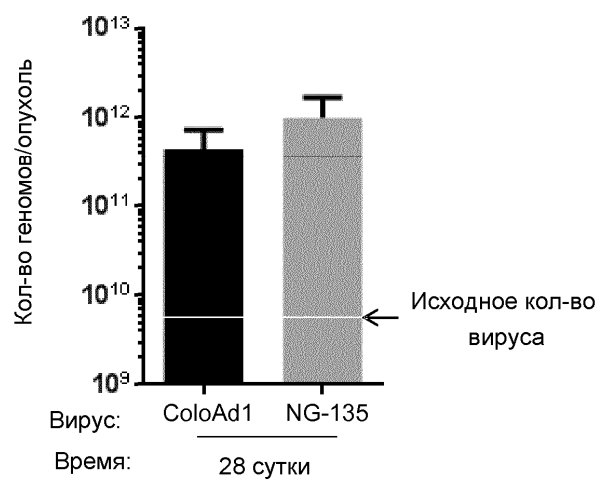
Фиг. 13

ColoAd1 = EnAd

A**B**

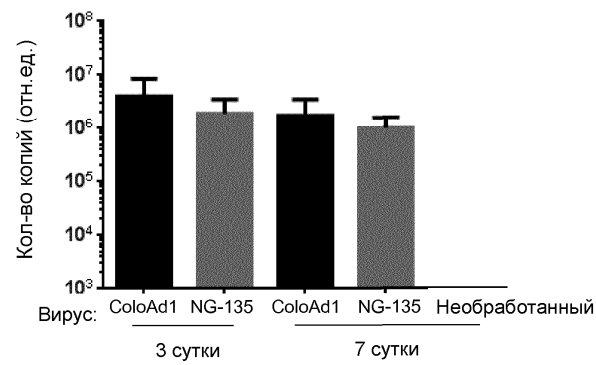
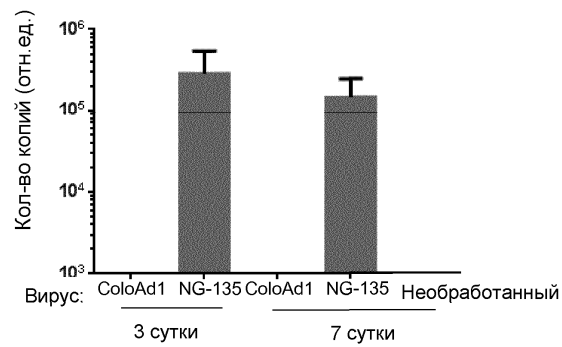
Фиг. 14

ColoAd1 = EnAd

А**В**

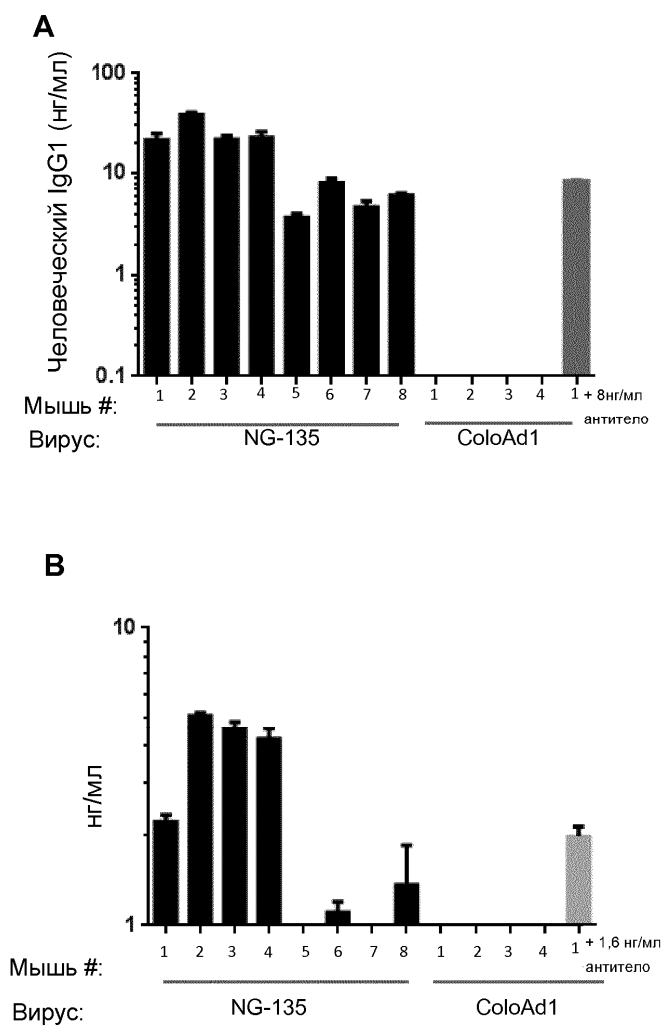
Фиг. 15

ColoAd1 = EnAd

A**В**

Фиг. 16

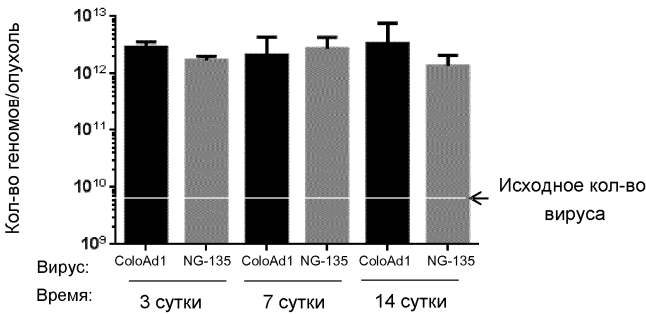
ColoAd1 = EnAd



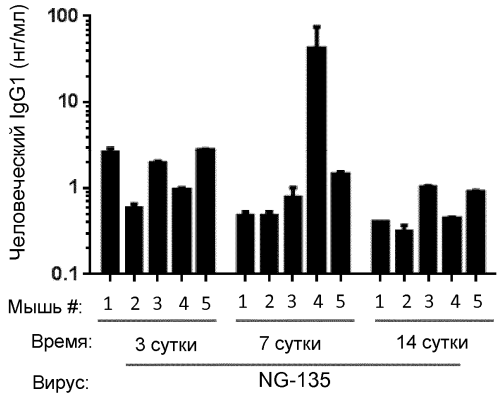
Фиг. 17

ColoAd1 = EnAd

A



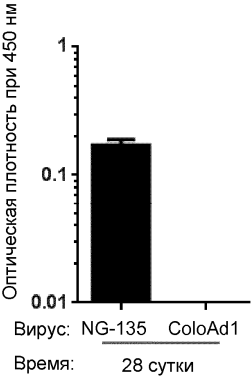
В



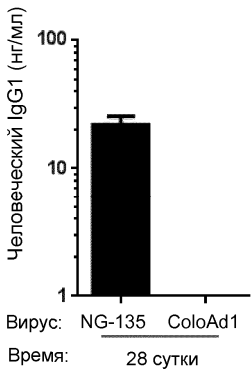
Фиг. 18

ColoAd1 = EnAd

A



В



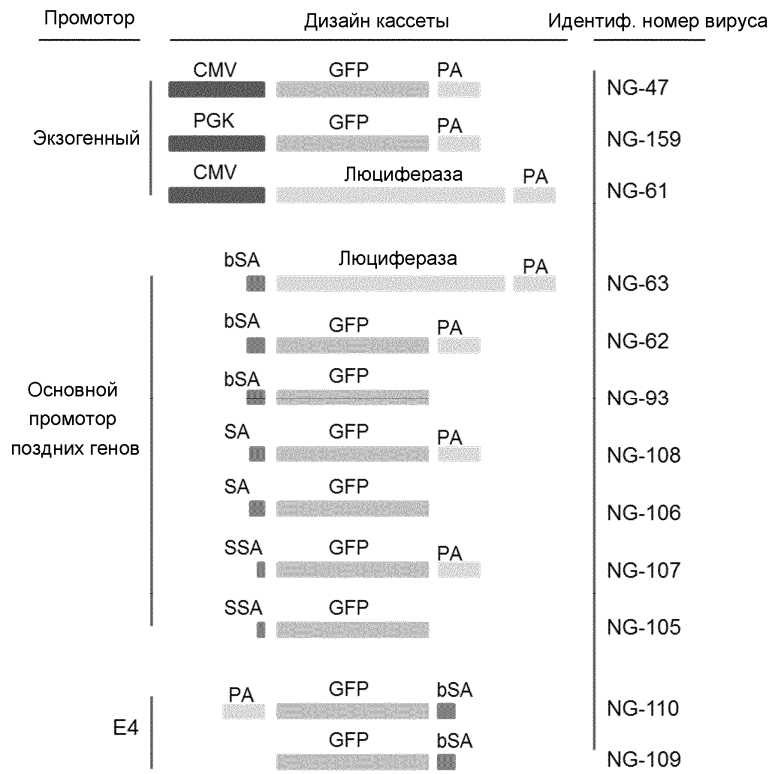
Фиг. 19

Экзогенный промотор	CMV	572 п.н.	SEQ ID NO. 13
	PGK	505 п.н.	SEQ ID NO. 14
	CBA	278 п.н.	SEQ ID NO. 15
Сплайс-акцепторы	SSA	4 п.н.	SEQ ID NO. 16
	SA	14 п.н.	SEQ ID NO. 17
	bSA	26 п.н.	SEQ ID NO. 18
Последовательность участка внутренней посадки рибосомы	FMDV IRES	550 п.н.	SEQ ID NO. 19
Сигнальная последовательность полиаденилирования (пА)	SV40 PolyA	220 п.н.	SEQ ID NO. 20
Сигнальные пептиды	HuVH	57 п.н./19 а.к.	SEQ ID NO. 21
	HG3-CL	57 п.н./19 а.к.	SEQ ID NO. 22
Пептидные метки	His tag	18 п.н./6 а.к.	SEQ ID NO. 23
	V5 tag	42 п.н./14 а.к.	SEQ ID NO. 24
Пептиды с высокой эффективностью саморасщепления	P2A	66 п.н./22 а.к.	SEQ ID NO. 25
	T2A	63 п.н./21 а.к.	SEQ ID NO. 26
	E2A	69 п.н./23 а.к.	SEQ ID NO. 27
	F2A	75 п.н./25 а.к.	SEQ ID NO. 28

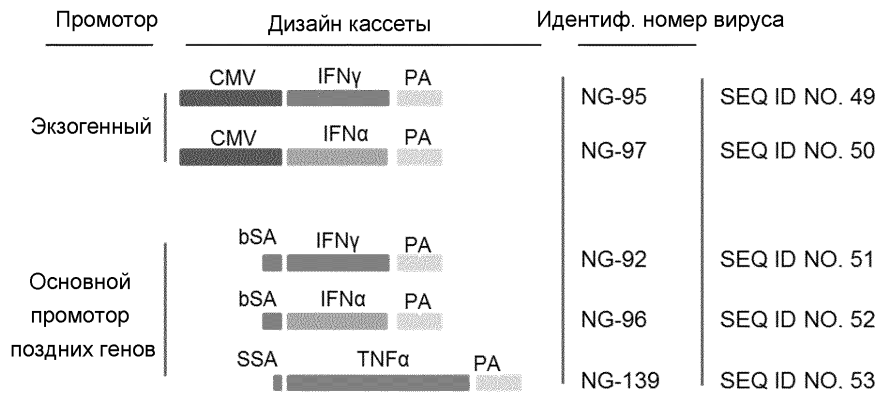
Фиг. 20

Вариабельные области тяжелых цепей антител	Anti-VEGF	369 п.н./123 а.к	SEQ ID NO. 29
	Anti-PD-L1	354 п.н./118 а.к	SEQ ID NO. 30
Вариабельные области легких цепей антител	Anti-VEGF	324 п.н./108 а.к	SEQ ID NO. 31
	Anti-PD-L1	324 п.н./108 а.к	SEQ ID NO. 32
Константные области тяжелых цепей антител	hIgG1	990 п.н./330 а.к	SEQ ID NO. 33
	hIgG1 Модифицированный	990 п.н./330 а.к	SEQ ID NO. 34
Константная область легкой цепи антитела	hKappa LC	318 п.н./106 а.к	SEQ ID NO. 35
Домены антител: ScFv	Anti-VEGF	738 п.н./246 а.к	SEQ ID NO. 36
	Anti-PD-L1	723 п.н./241 а.к	SEQ ID NO. 37
Гены-репортеры	GFP	717 п.н./239 а.к	SEQ ID NO. 38
	Люцифераза	1650 п.н./550 а.к	SEQ ID NO. 39
Цитокины	TNFα	624 п.н./208 а.к	SEQ ID NO. 40
	IFNγ	498 п.н./166 а.к	SEQ ID NO. 41
	IFNα	564 п.н./188 а.к	SEQ ID NO. 42
Ассоциированные с опухолью антигены	NY-ESO-1	324 п.н./108 а.к	SEQ ID NO. 43
	MUC-1	1255 а.к	SEQ ID NO. 44

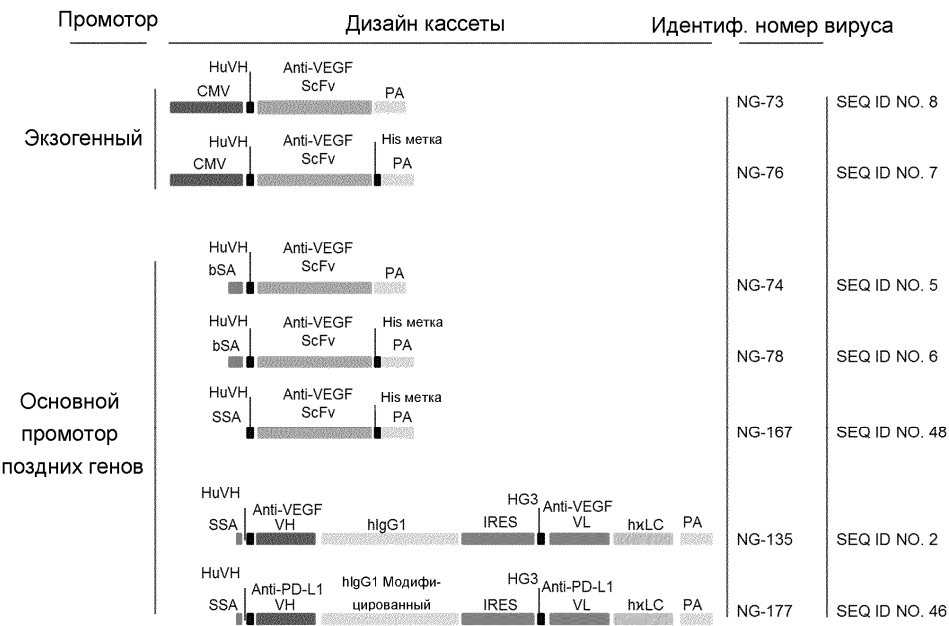
Фиг. 21



Фиг. 22

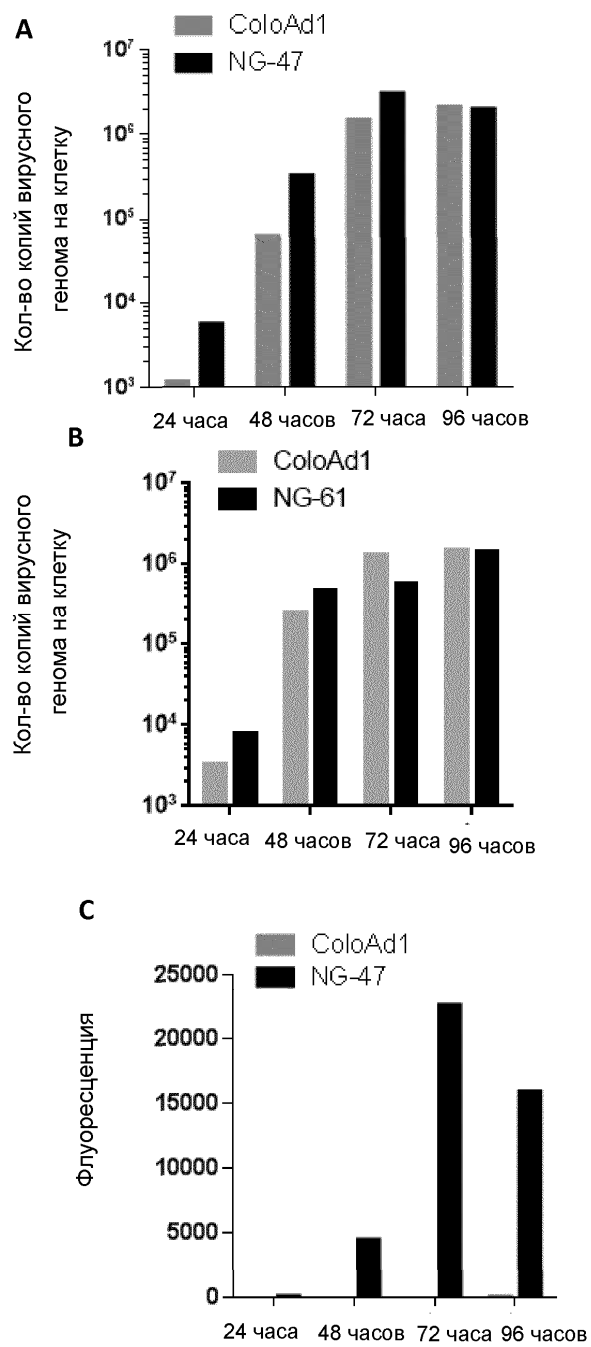


Фиг. 23



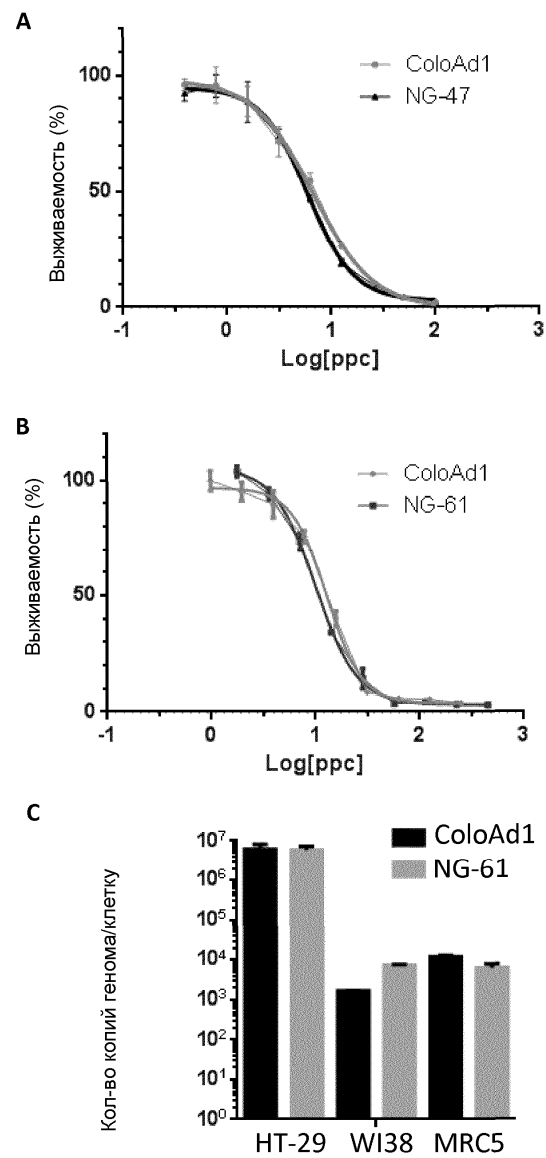
Фиг. 24

ColoAd1 = EnAd

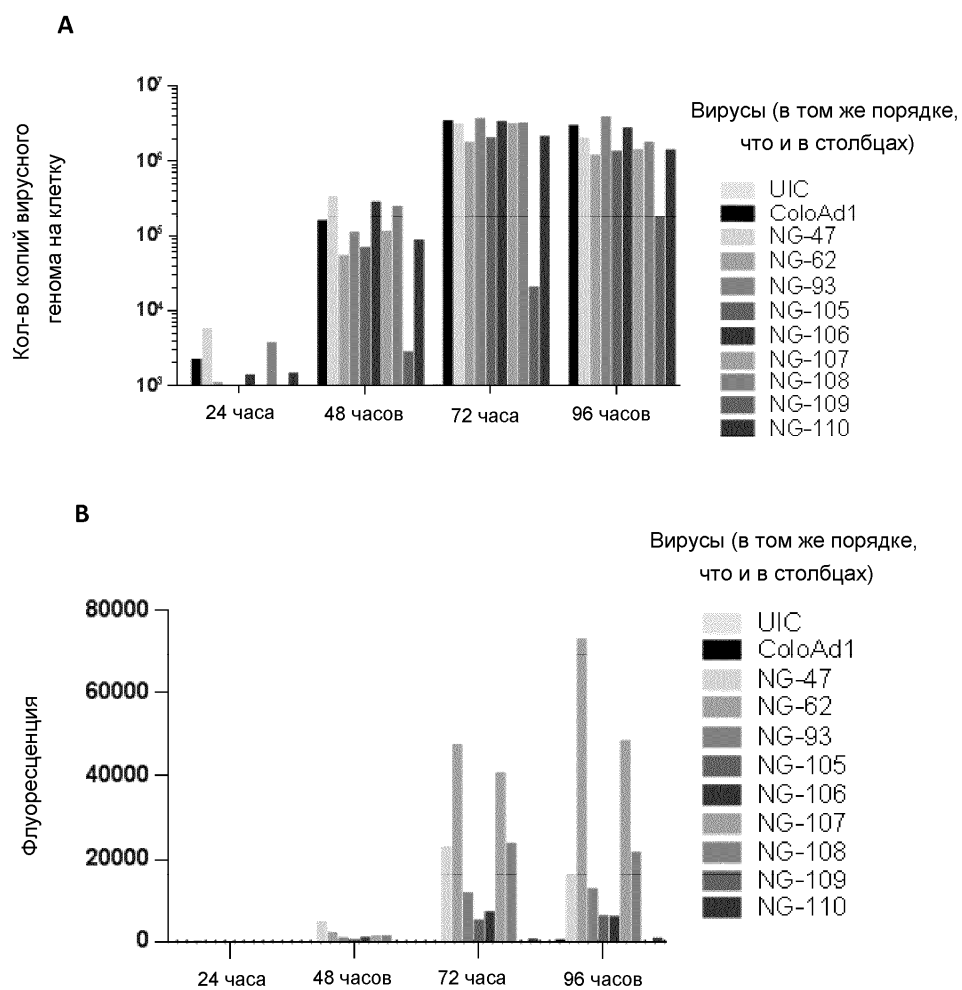


Фиг. 25

ColoAD1 = EnAd



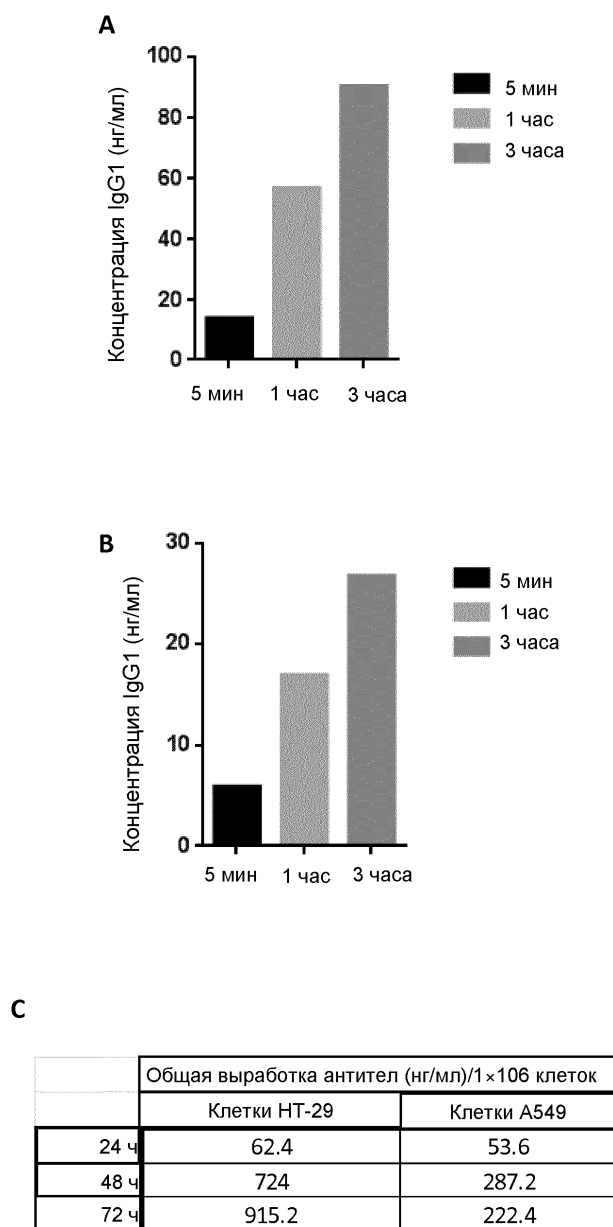
Фиг. 26



ColoAd1 = EnAd; UIC = неинфицированный контроль

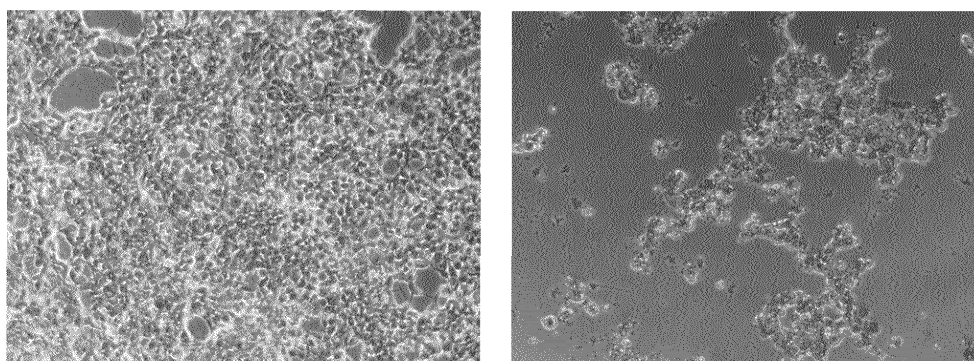
Фиг. 27

036414



Фиг. 28

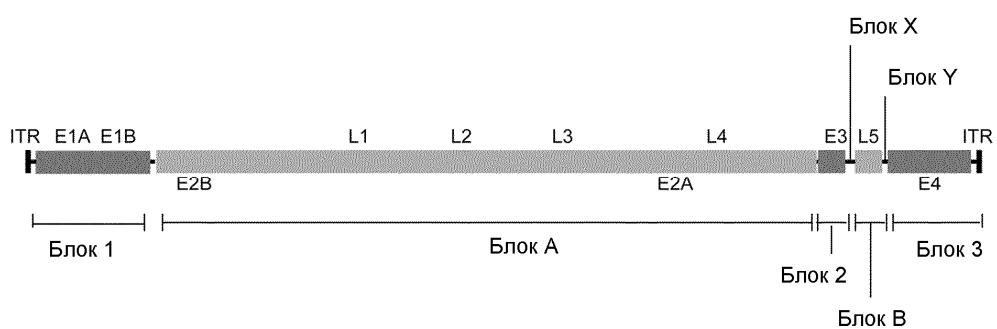
ColoAd1 = EnAd

**A****B****C**

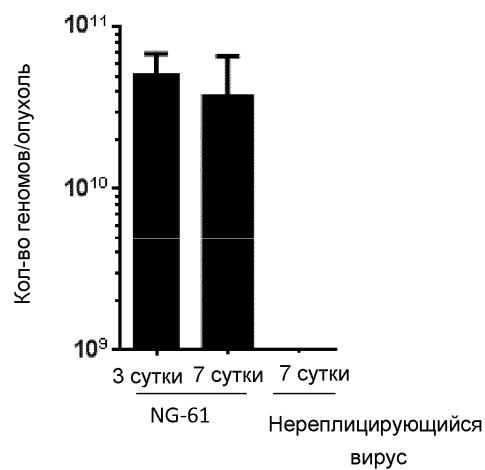
	Выработка TNF (нг/мл)
	Клетки HT-29
24 ч	0.233
36 ч	15.7

D

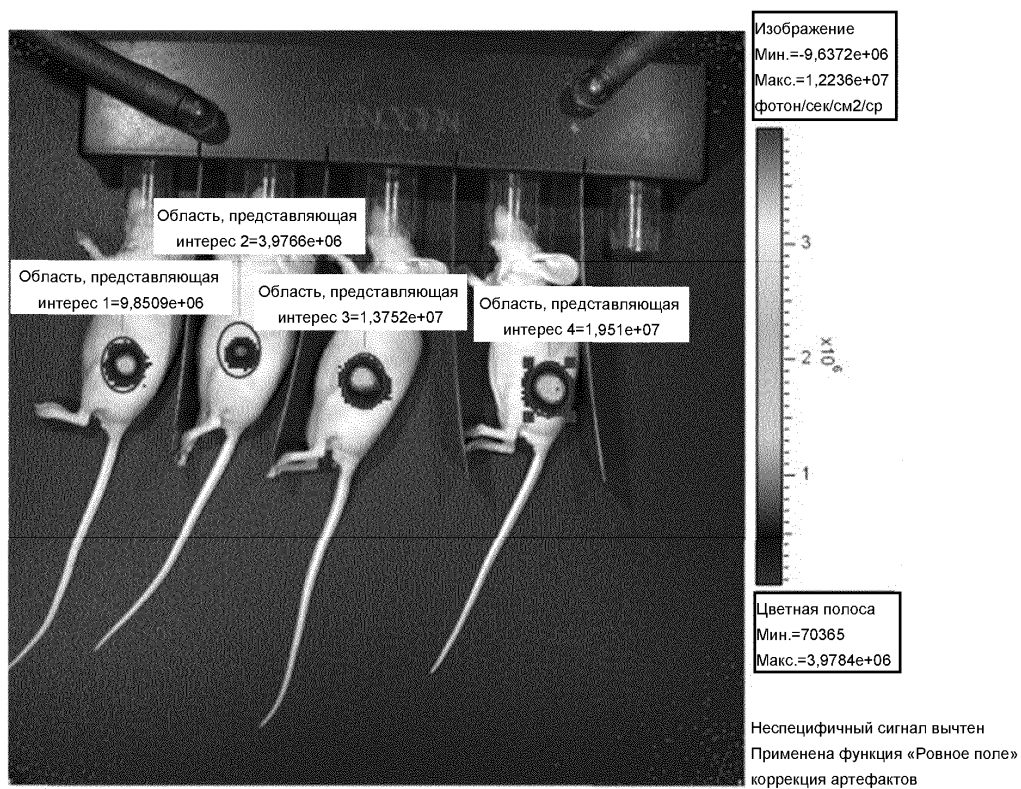
Фиг. 29



Фиг. 30

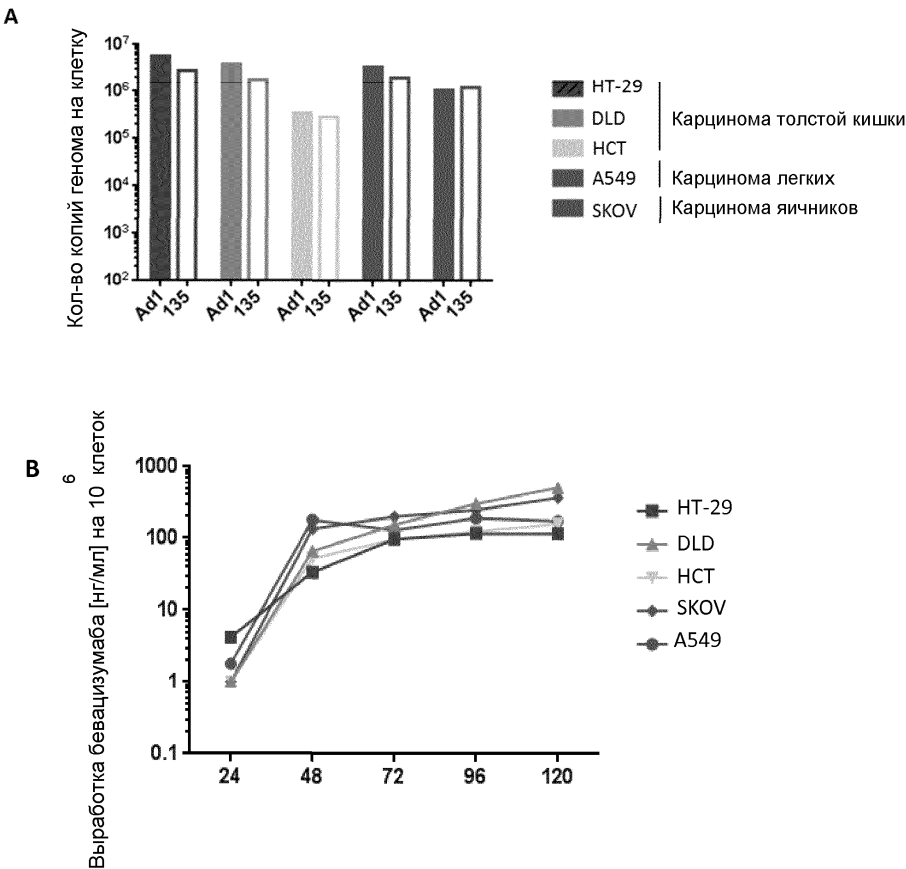


Фиг. 31

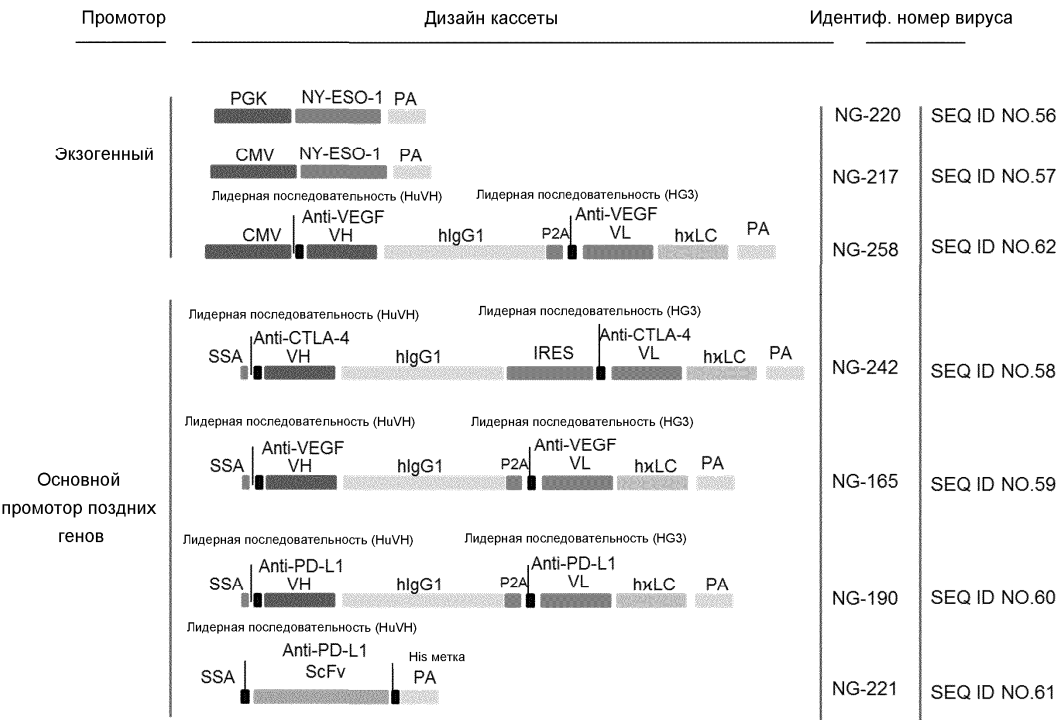


Фиг. 32

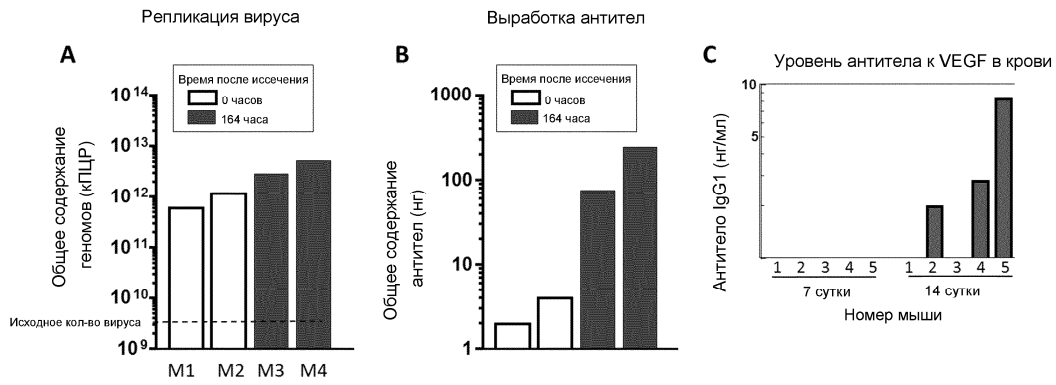
Ad1 = EnAD; 135 = NG-135



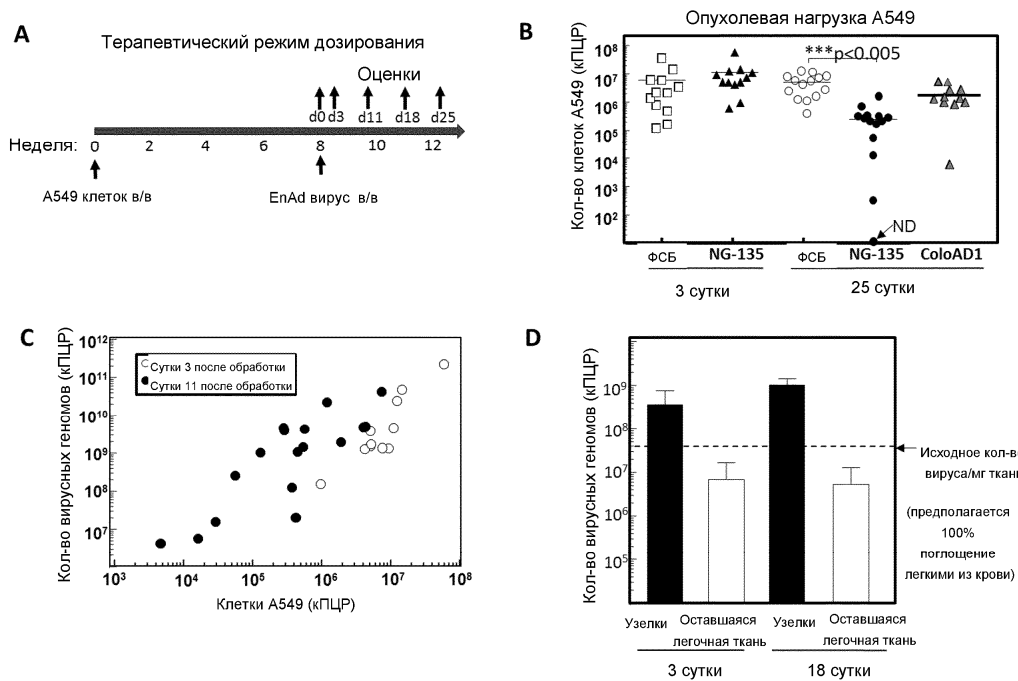
Фиг. 33



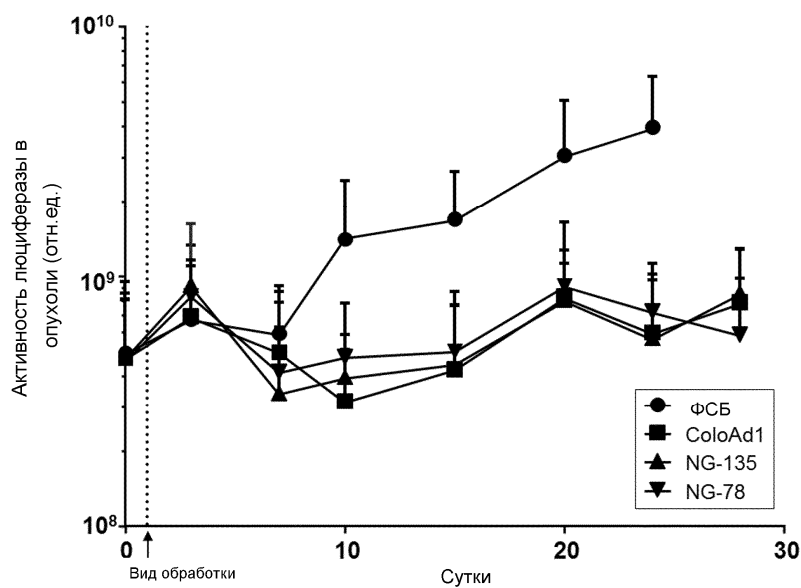
Фиг. 34



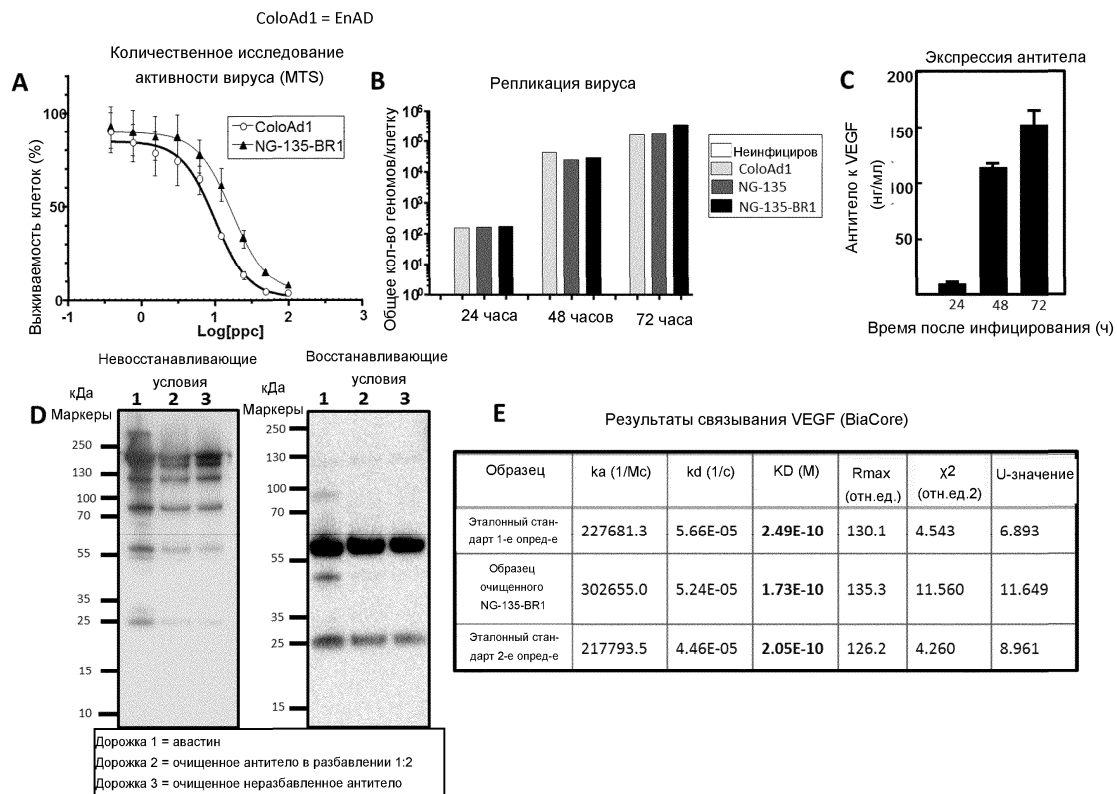
Фиг. 35



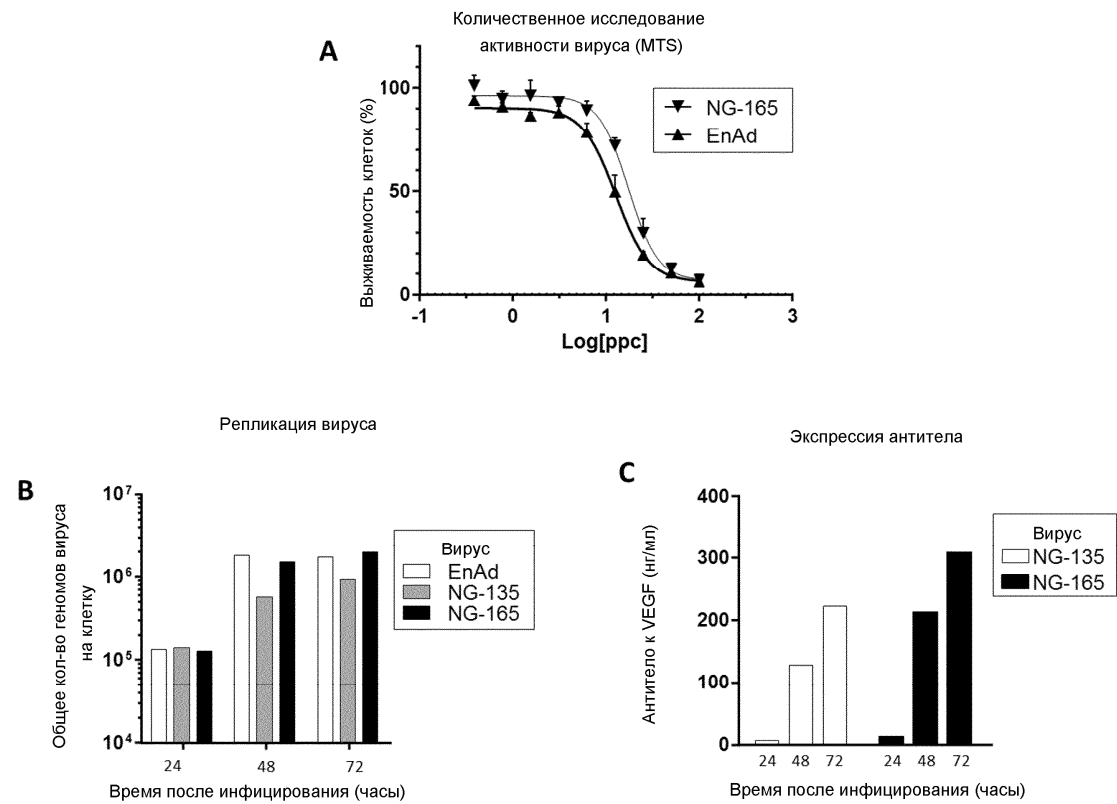
Фиг. 36



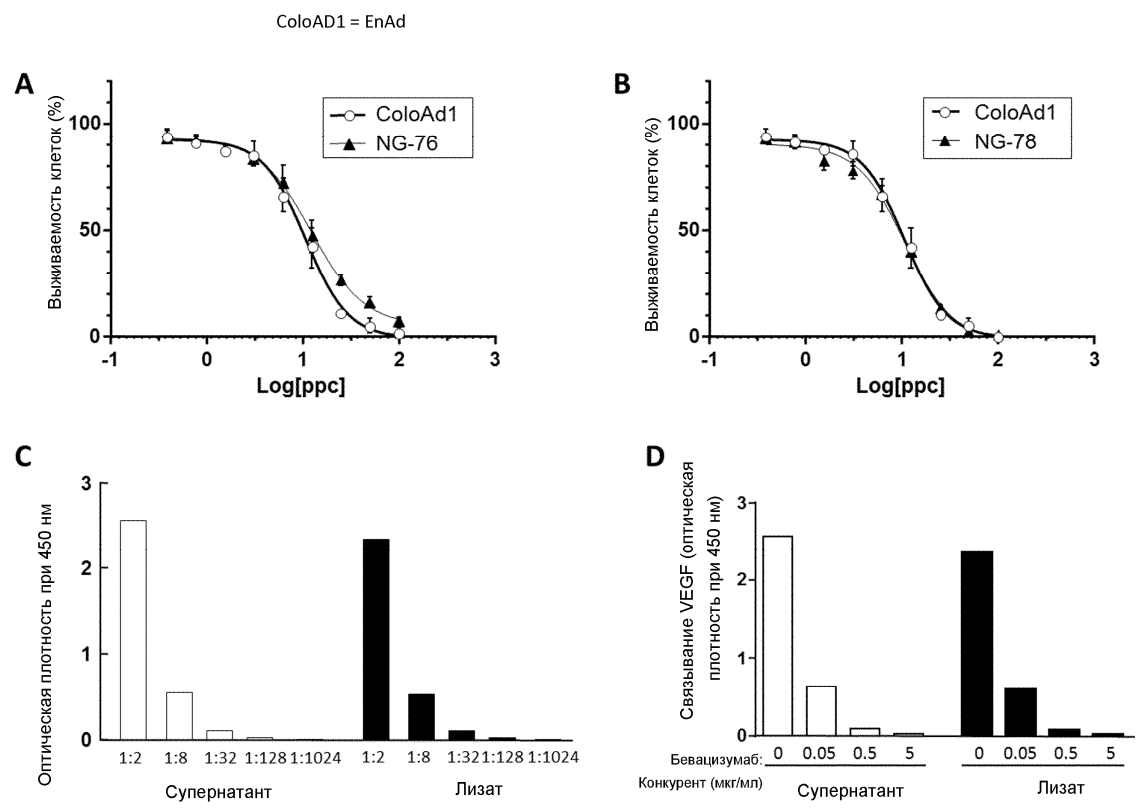
Фиг. 37



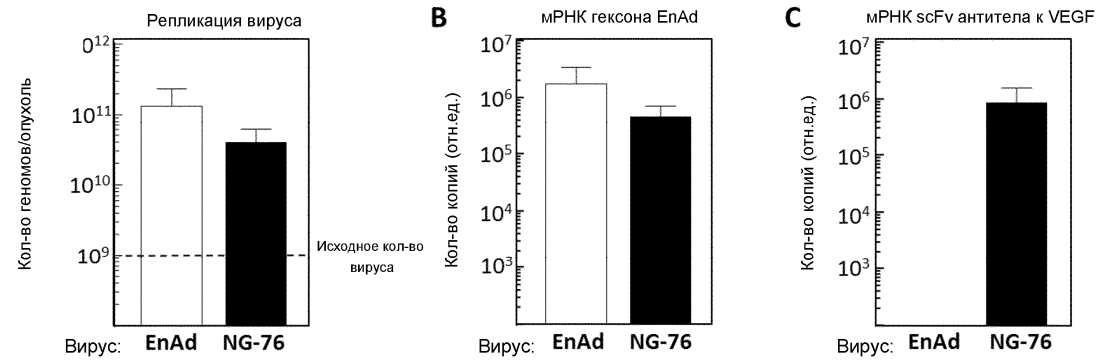
Фиг. 38



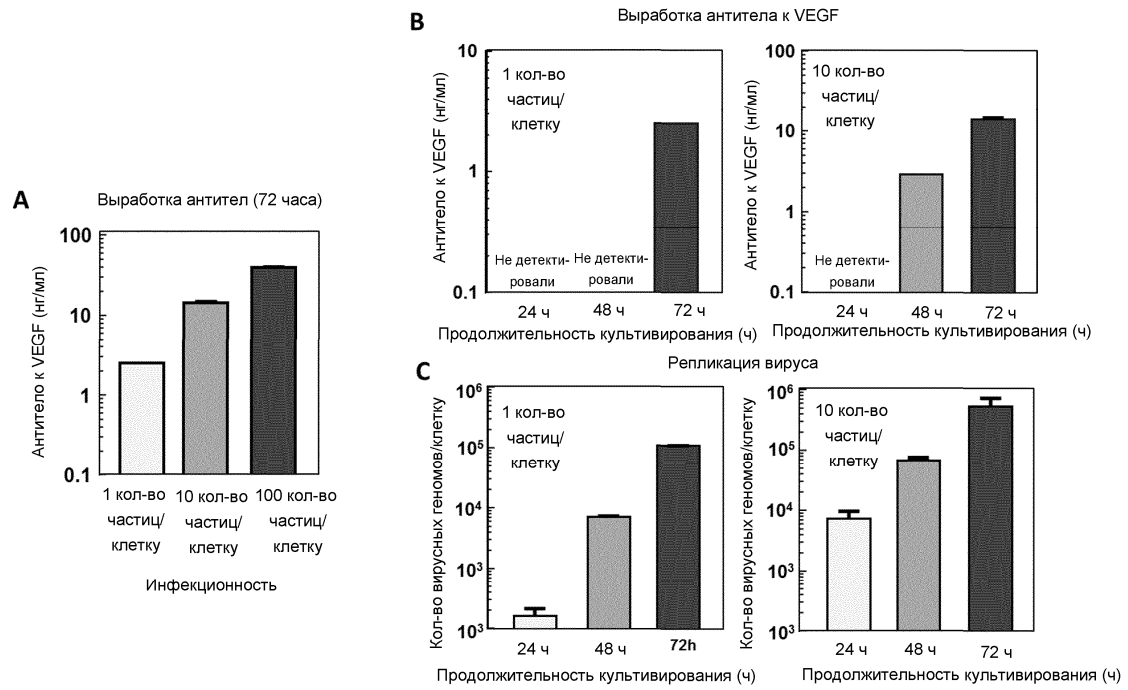
Фиг. 39



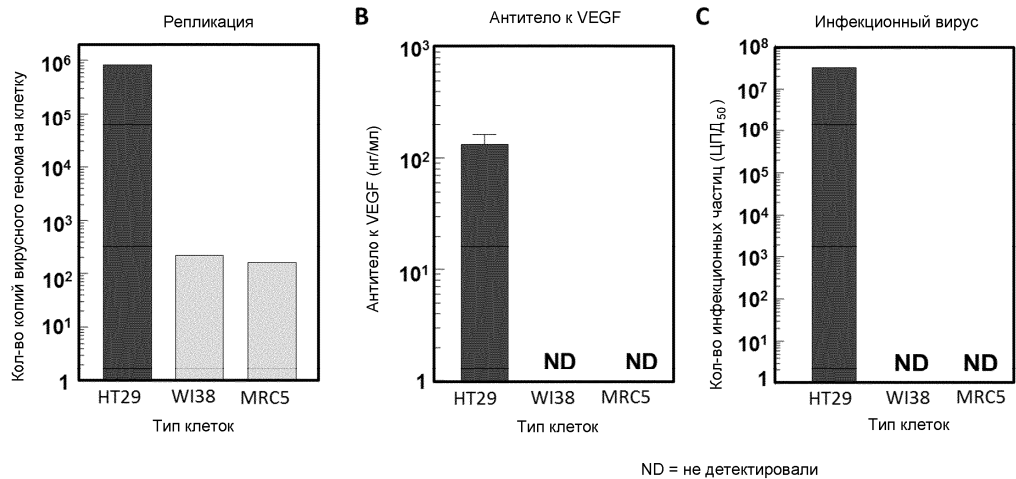
Фиг. 40



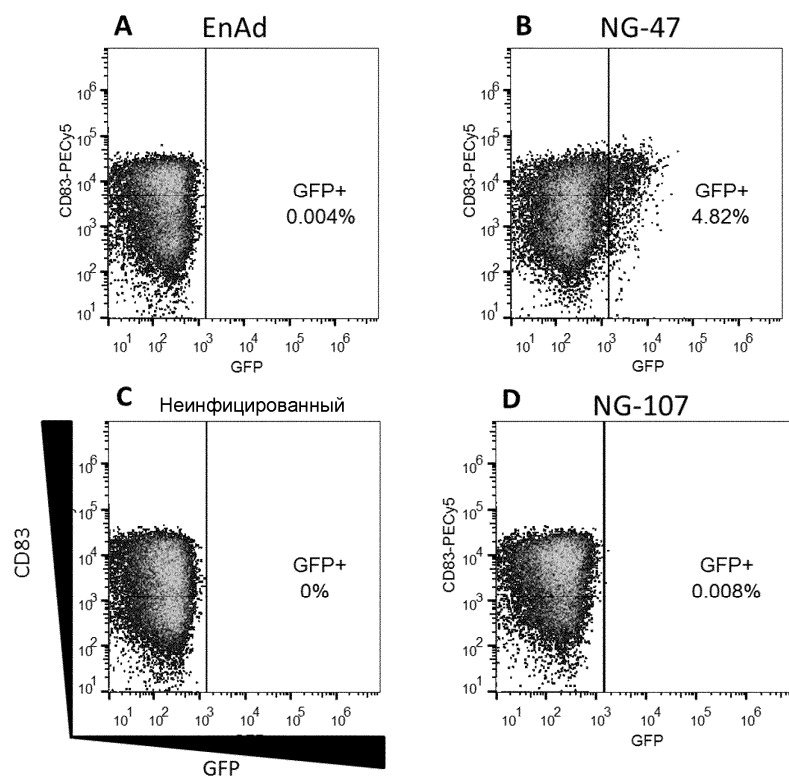
Фиг. 41



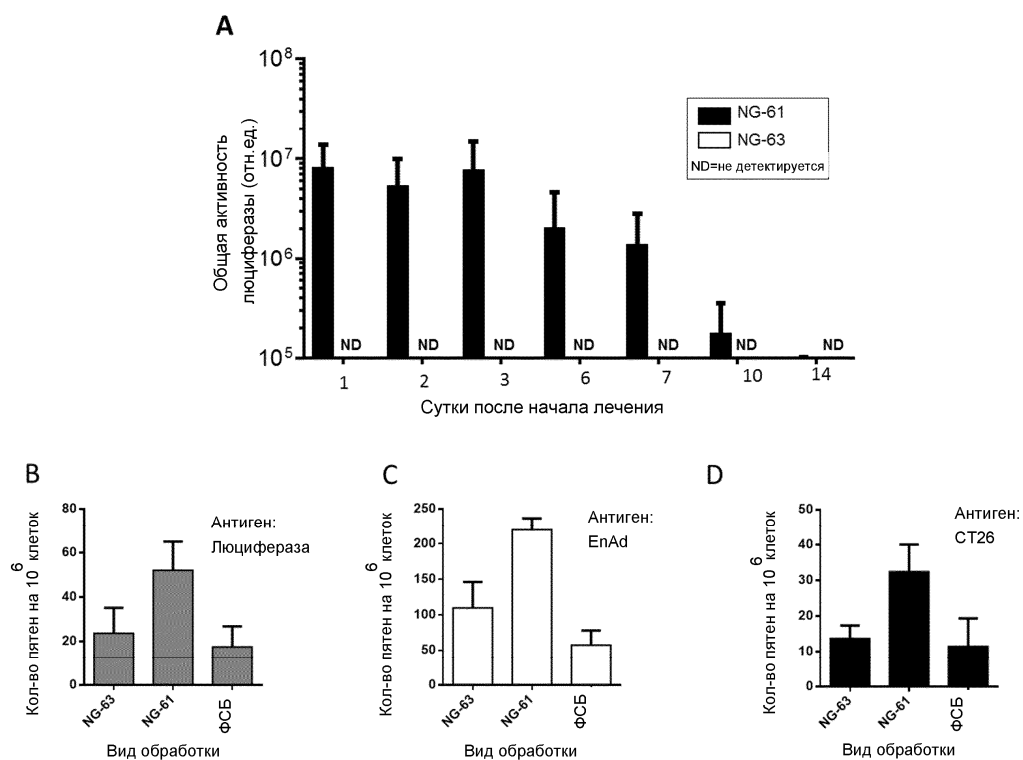
Фиг. 42



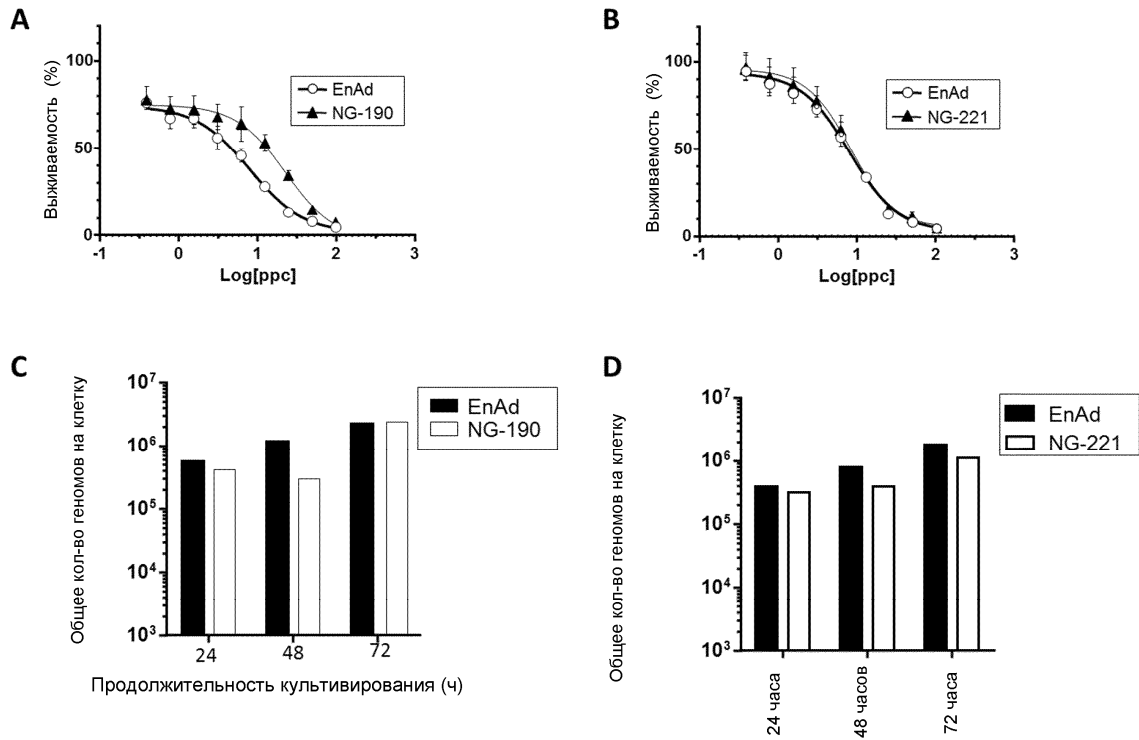
Фиг. 43



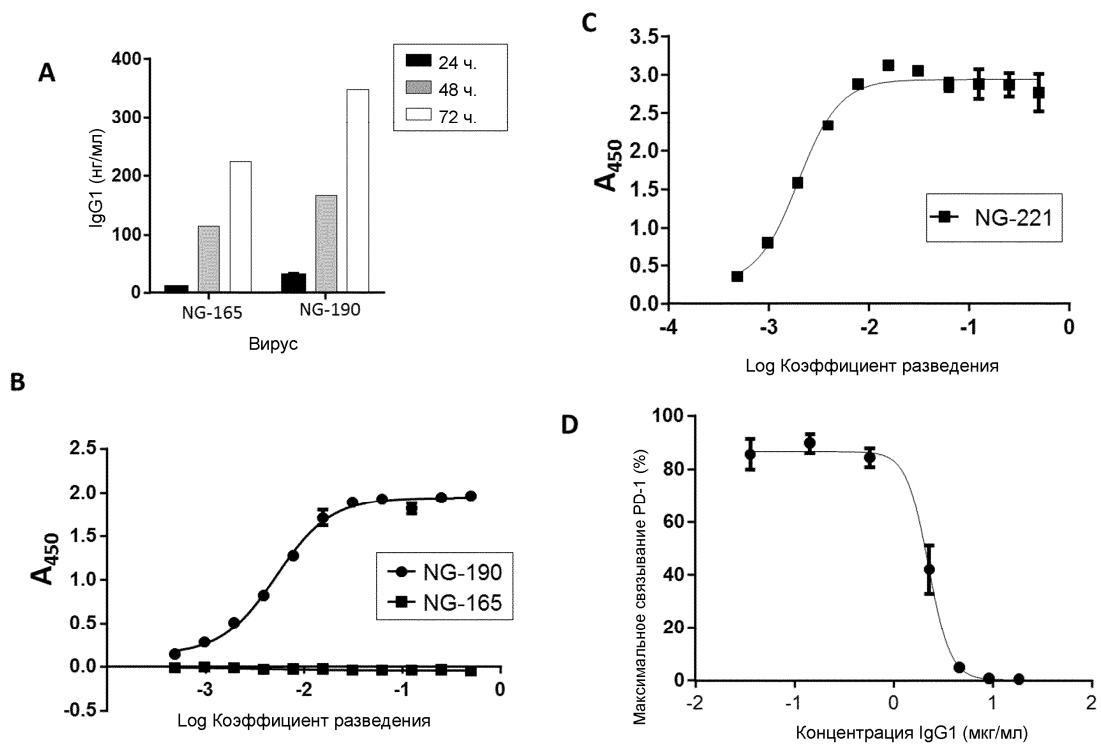
Фиг. 44



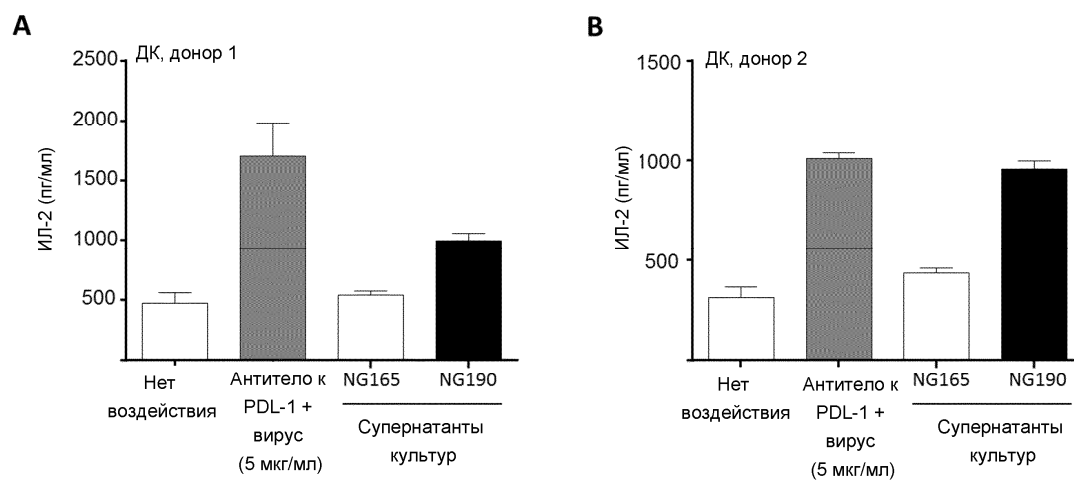
Фиг. 45



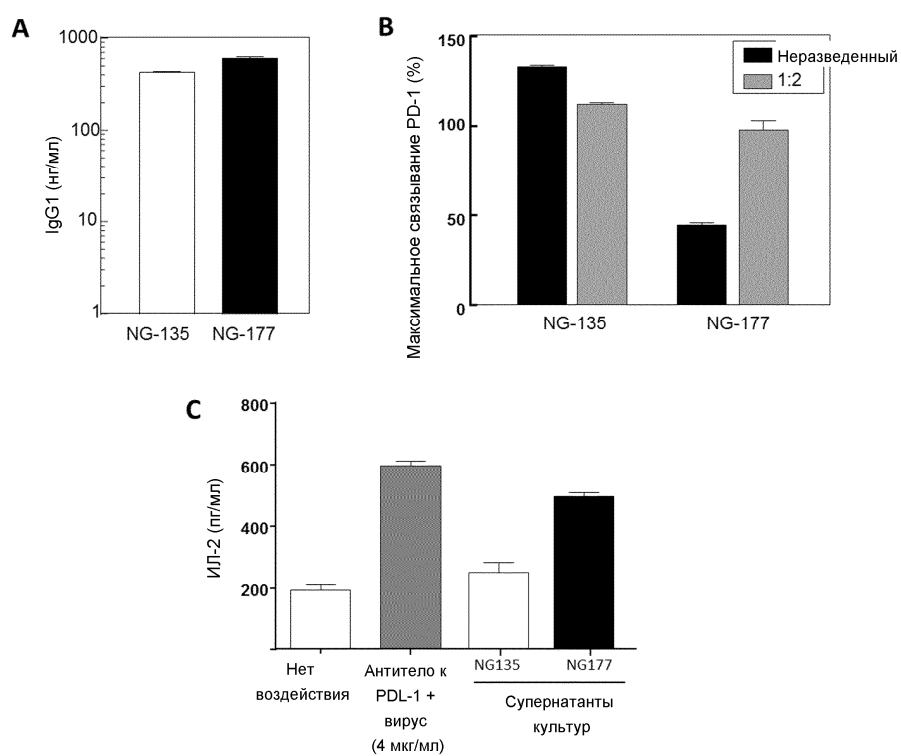
Фиг. 46



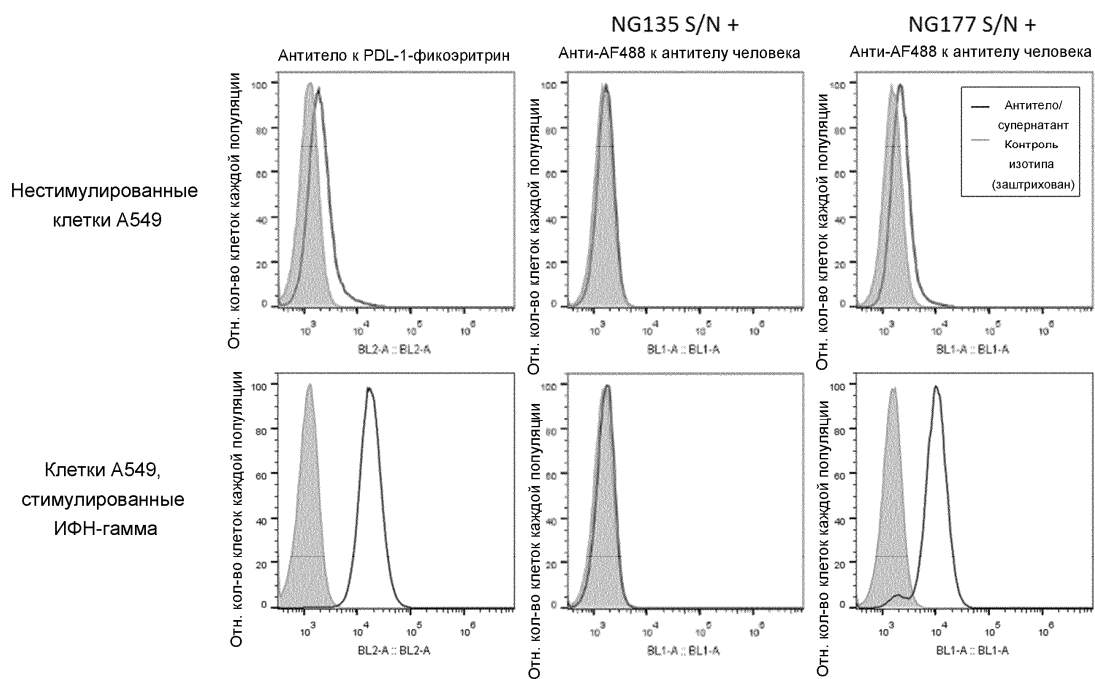
Фиг. 47



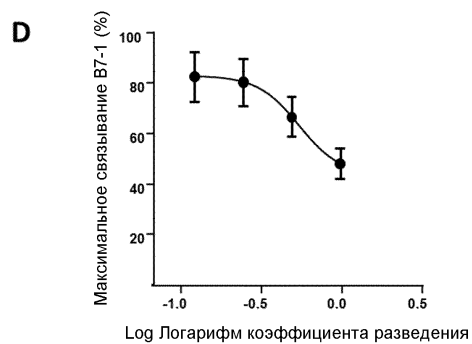
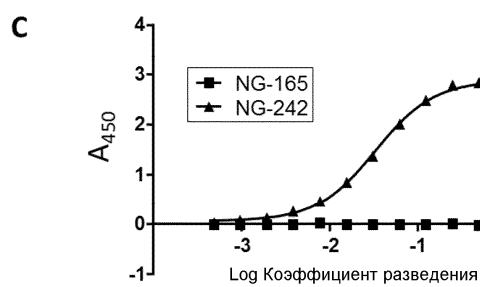
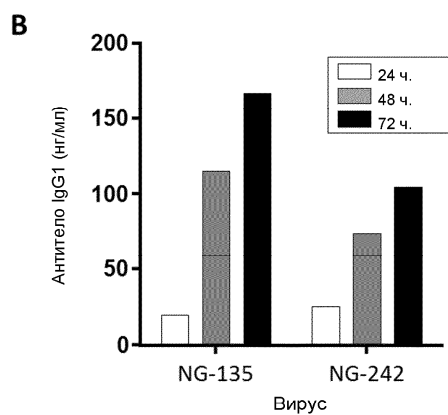
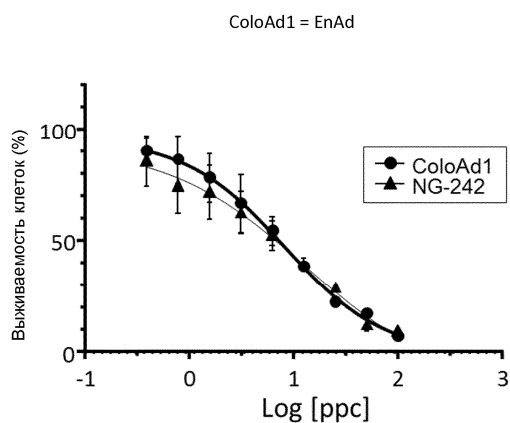
Фиг. 48



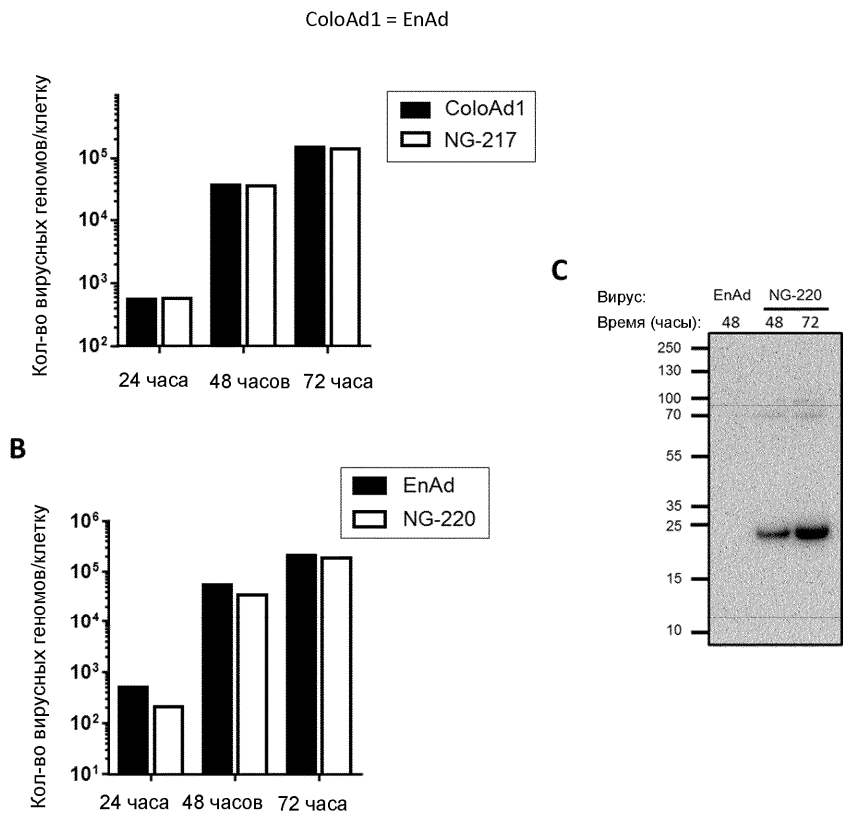
Фиг. 49



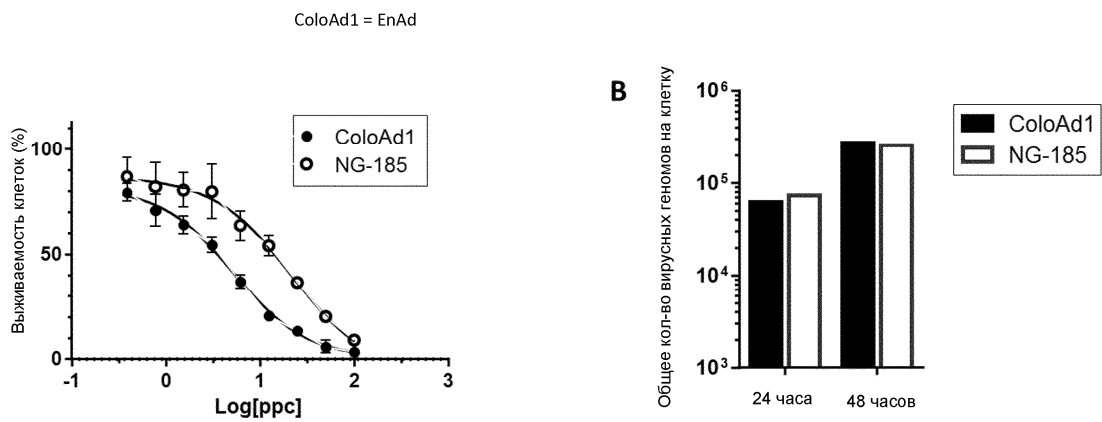
ФИГ. 50



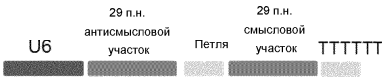
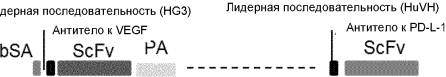
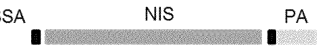
ФИГ. 51



Фиг. 52



Фиг. 53

Промотор	Дизайн кассеты	Идентиф. номер вируса	
Экзогенный		NG-Sh01	SEQ ID NO.66
		NG-281	SEQ ID NO.73
Основной промотор поздних генов		NG-257	SEQ ID NO.72
		NG-280	SEQ ID NO.68
		NG-272	SEQ ID NO.69

Фиг. 54

