

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991805 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.13

(22) Дата подачи заявки
2018.01.30

(51) Int. Cl. *C12N 7/01* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) МНОЖЕСТВЕННО ТРАНСГЕННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОВИРУС

(31) 62/452,342; 62/520,945

(32) 2017.01.30; 2017.06.16

(33) US

(86) PCT/US2018/016032

(87) WO 2018/140973 2018.08.02

(71) Заявитель:
ЭПИСЕНТАРИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Рид Тони Р., Оронски Брайан Т.,
Ларсон Кристофер (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, содержащему два (или более) терапевтических трансгена, например CD80 и CD137L.

A1

201991805

201991805

A1

МНОЖЕСТВЕННО ТРАНСГЕННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОВИРУС**Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на Патент США 62/452342, поданной 30 января 2017 года, и временной заявки на Патент США 62/520945, поданной 16 июня 2017 года.

Область техники, к которой относится изобретение

[0002] Областью техники настоящего изобретения является молекулярная биология и вирусология, в частности, модифицированные вирусы, которые экспрессируют два или более терапевтических трансгена.

Уровень техники

[0003] Несмотря на обширные знания основных молекулярных механизмов, вызывающих рак, наиболее распространенные формы рака остаются неизлечимыми при помощи современных протоколов химиотерапии и лучевой терапии. Онколитические вирусы появились в качестве платформенной технологии, которая потенциально может значительно улучшить современное стандартное лечение различных злокачественных новообразований (Kumar, S. et al. (2008) CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS 10(4): 371-379; Kim, D. (2001) EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY 1(3): 525-538; Kim D. (2000) ONCOGENE 19(56):6660-6669). Эти вирусы показали себя как онколитические агенты, которые не только непосредственно разрушают злокачественные клетки посредством цепной реакции заражения-размножения-лизиса, но также косвенно индуцируют противоопухолевый иммунитет. Эти иммуностимулирующие свойства были дополнены введением терапевтических трансгенов, которые копируются и экспрессируются каждый раз, когда вирус реплицируется.

[0004] Ранее разработанные онколитические вирусы включают онколитический аденовирус серотипа 5 (Ad5), называемый TAV-255, который транскрипционно аттенуирован в нормальных клетках, но транскрипционно активен в раковых клетках (см. Публикацию Международной патентной заявки No. WO2010/101921). Считается, что механизм, посредством которого вектор TAV-255 достигает этой избирательности в отношении опухоли, заключается в направленной делеции трех сайтов связывания фактора транскрипции (TF) для факторов транскрипции Rea3 и E2F, белков, которые регулируют

экспрессию гена E1a аденовируса, самого раннего гена, который транскрибируется после проникновения вируса в клетку-хозяин, путем связывания со специфичными последовательностями ДНК.

[0005] Несмотря на предпринимаемые на сегодняшний день усилия, существует потребность в улучшенных онколитических вирусах для лечения рака и гиперпролиферативных расстройств у людей.

Сущность изобретения

[0006] Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что аденовирусы, такие как онколитические вирусы, могут неожиданно эффективно экспрессировать несколько (два или более) терапевтических трансгенов, когда они встроены в конкретные сайты вставки, без использования экзогенного промотора, и что эти вирусы могут реплицироваться и эффективно экспрессировать два или более терапевтических трансгена, независимо от размера трансгенов, включенных в вирусный геном.

[0007] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, содержащему: (a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19K; где сайт вставки E1b-19K расположен между старт-сайтом E1b-19K и старт-сайтом E1b-55K; и (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E3, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом pVIII и старт-сайтом Fiber.

[0008] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус представляет собой аденовирус типа 5 (Ad5).

[0009] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K расположен между старт-сайтом E1b-19K и стоп-сайтом E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300, от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от 150 до приблизительно 305, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-

19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, например, 202 или 203 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1917 или 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1917, или между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген встроен между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

[0010] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от 2000 до 2500, от 2500 до 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-10.5K и стоп-сайтом E3-14.7K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно

1500 до приблизительно 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K, например сайт вставки E3 содержит делецию 1063 или 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 Ad5 dl309. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между последовательностями CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) второй терапевтический трансген и последовательность TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-gr19K и стоп-сайтом E3-14.7K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-gr19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающую к стоп-сайту E3-gr19K. например, сайт вставки E3 содержит делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-gr19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29218-30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между последовательностями TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и TAAAAAAAAT (SEQ

ID NO: 30), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29), второй терапевтический трансген и последовательность TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

[0011] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, содержащему: (a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19k; и (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19k, где сайт вставки E1b-19k расположен между сайт-сайтом E1b-19k и сайт-сайтом E1b-55k, и где первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность разделены первым участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус представляет собой аденовирус типа 5 (Ad5).

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K расположен между сайт-сайтом E1b-19K и стоп-сайтом E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300, от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от 150 до приблизительно 305, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, например, 202 или 203 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1917 или 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй терапевтические трансгены встроены между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1917, или между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй терапевтические трансгены встроены между последовательностью

СТGACCTC (SEQ ID NO: 1) и последовательностью TCACCAGG (SEQ ID NO: 2), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность СТGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген, первый IRES, второй терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

[0014] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит делецию E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт делеции E3 расположен между стоп-сайтом pVIII и старт-сайтом Fiber. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт делеции E3 расположен между стоп-сайтом E3-10.5K и стоп-сайтом E3-14.7K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K, например, делеция E3 включает делецию 1063 или 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В

некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию, соответствующую делеции Ad3 dl309 E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 29773–30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 расположена между стоп-сайтом E3-grp19K и стоп-сайтом E3-14.7K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. например, сайт вставки E3 содержит делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 29218–30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий терапевтический трансген. Третий терапевтический трансген может быть встроен в сайт вставки E1b-19k, где, например, вторая нуклеотидная последовательность и третья нуклеотидная последовательность разделены вторым участком внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый, второй и третий терапевтические трансгены встроены между последовательностью CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и последовательностью TCACCAGG (SEQ ID NO: 2), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген, первый IRES, второй терапевтический трансген, второй IRES, третий терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2). Третий терапевтический трансген также может быть встроен в сайт делеции E3, то есть в некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий терапевтический трансген,

встроенный в сайт вставки E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий терапевтический трансген встроен между последовательностями CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CAGTATGA (SEQ ID NO: 3), третий терапевтический трансген и последовательность TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения третий терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения третий терапевтический трансген встроен между последовательностью TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и последовательностью TAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29), третий терапевтический трансген и последовательность TAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

[0016] IRES может быть, например, выбран из группы, состоящей из IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES вируса ящура и IRES вируса полиомиелита.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов рекомбинантный аденовирус дополнительно содержит делецию E4. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 находится между старт-сайтом E4-ORF6/7 и правым инвертированным концевым повтором (ITR). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 расположена между старт-сайтом E4-ORF6/7 и старт-сайтом E4-ORF1. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 2500, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000 или от приблизительно 2000 до приблизительно 2500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию от приблизительно 250 до

приблизительно 1500, от приблизительно 250 до приблизительно 1250, от приблизительно 250 до приблизительно 1000, от приблизительно 250 до приблизительно 750, от приблизительно 250 до приблизительно 500, от 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1250, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 500 до приблизительно 750, от приблизительно 750 до приблизительно 1500, от приблизительно 750 до приблизительно 1250, от приблизительно 750 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, или от приблизительно 1000 до приблизительно 1250 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию приблизительно 1450 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7, например, делеция E4 включает делецию приблизительно 1449 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 34078–35526 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0018] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтические трансгены, первый, второй и/или третий терапевтические трансгены или все терапевтические трансгены не связаны функционально с последовательностью экзогенного промотора.

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансгенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов или размер всех терапевтических трансгенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов. В

некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет, по меньшей мере, приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000 или приблизительно 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет приблизительно 1650 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и

третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет, по меньшей мере, приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000 или приблизительно 7000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет приблизительно 3100 нуклеотидов.

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтический трансен, первый, второй и/или третий терапевтические трансены или любой из терапевтических трансенов кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, p40, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1 и ловушки TGF- β .

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтический трансен, первый, второй и/или третий терапевтические трансены или любой из терапевтических трансенов кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23, IL-23A/p19, p40, IL-27, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

[0023] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй терапевтический трансен кодируют первую и вторую субъединицу, соответственно, гетеродимерного цитокина.

[0024] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтические трансены выбраны из группы, состоящей из CD80 и CD137L, например, первый терапевтический трансен кодирует CD80, а второй терапевтический трансен кодирует CD137L. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO:

5, и/или SEQ ID NO: 7, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6, и/или SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 27.

[0025] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый, второй и/или третий терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из CD80, CD137L и ICAM-1, например, первый терапевтический трансген кодирует CD80, второй терапевтический трансген кодирует CD137L, а третий терапевтический трансген кодирует ICAM-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и/или SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22.

[0026] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из IL-23A/p19 и p40, которые составляют гетеродимерный цитокин IL-23. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген кодирует IL-23A/p19, а второй терапевтический трансген кодирует p40. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 12 и/или SEQ ID NO: 10, или содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0027] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из IL-27A/p28 и IL-27B/EBI3, которые составляют гетеродимерный цитокин IL-27. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген кодирует IL-27A/p28, а второй терапевтический трансген кодирует IL-27B/EBI3.

[0028] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из эндостатина и ангиостатина, например, первый терапевтический

трансен кодирует эндостатин, а второй терапевтический трансен кодирует ангиостатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

[0029] В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных аденовирусов может содержать делецию по меньшей мере одного сайта связывания Rea3 или его функциональной части, например, вирус может содержать делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам, расположенным приблизительно от -300 до приблизительно -250 перед сайтом инициации Ela или делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам, расположенным от -305 до -255 или от -304 до -255 перед сайтом инициации Ela.

[0030] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любой из вышеупомянутых композиций рекомбинантный онколитический аденовирус может содержать делецию по меньшей мере одного сайта связывания E2F или его функциональной части. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный онколитический аденовирус может содержать делецию по меньшей мере одного сайта связывания E2F или его функциональной части, и не содержать делецию сайта связывания Rea3.

[0031] В другом аспекте изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, содержащему SEQ ID NO: 14, или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из вышеупомянутых рекомбинантных аденовирусов может избирательно реплицироваться в гиперпролиферативной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных аденовирусов может избирательно экспрессировать два или более терапевтических трансгена в гиперпролиферативной клетке. Гиперпролиферативная клетка может

представлять собой раковую клетку, например клетку рака легкого, клетку рака толстой кишки и клетку рака поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления изобретения каждый из вышеуказанных рекомбинантных аденовирусов может представлять собой онколитический аденовирус.

[0033] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей каждый из вышеупомянутых рекомбинантных аденовирусов и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[0034] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента. Этот способ включает введение пациенту эффективного количества описанного здесь рекомбинантного аденовируса для лечения ракового заболевания у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из группы, состоящей из меланомы, плоскоклеточного рака кожи, базально-клеточного рака, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака анального канала, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга, рака эндометрия, нейроэндокринного рака, карциномы из клеток Меркеля, желудочно-кишечной стромальной опухоли, саркомы и рака поджелудочной железы.

[0035] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации опухолевой клетки у пациента. Этот способ включает введение пациенту эффективного количества описанного здесь рекомбинантного аденовируса для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

[0036] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухоли у пациента. Этот способ включает введение пациенту эффективного количества описанного здесь рекомбинантного аденовируса для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

[0037] В каждом из вышеупомянутых способов рекомбинантный аденовирус можно, например, вводить в комбинации с одной или несколькими терапиями, выбранными из группы, состоящей из хирургического вмешательства, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виротерапии. В каждом из

вышеупомянутых способов эффективное количество рекомбинантного аденовируса может составлять, например, 10^2 – 10^{15} бляшкообразующих единиц (БОЕ). В каждом из вышеуказанных способов пациент может быть, например, человеком, например ребенком, или животным.

[0038] В каждом из вышеупомянутых способов эффективное количество рекомбинантного вируса может быть, например, идентифицировано путем измерения иммунного ответа на антиген у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунный ответ на антиген измеряют путем инъекции пациенту антигена в место инъекции на коже пациента и измерения величины индукции в месте инъекции.

[0039] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспрессии двух или более терапевтических трансгенов в клетке-мишени. Этот способ включает воздействие на клетку эффективным количеством описанного здесь рекомбинантного аденовируса для экспрессии целевых трансгенов.

[0040] Эти и другие аспекты и преимущества настоящего изобретения иллюстрируются следующими фигурами, подробным описанием и формулой изобретения.

Описание чертежей

[0041] Изобретение может быть более полно понято со ссылкой на следующие чертежи.

[0042] На **фигуре 1** изображено окрашивание клеток ADS-12 для обнаружения мышиного CD80 или мышиного CD137L через два дня после заражения указанным вирусом при множественности заражения (МЗ) равной 5.

[0043] На **фигуре 2** изображено окрашивание клеток ADS-12 для обнаружения мышиного CD80 или мышиного CD137L через два дня после заражения указанным вирусом при множественности заражения (МЗ) равной 5.

[0044] На **фигуре 3** изображено окрашивание клеток 4T1 для обнаружения мышиного CD80 или мышиного CD137L через три дня после заражения указанным вирусом.

[0045] На **фигуре 4** изображено окрашивание клеток 4T1 для обнаружения мышиного CD80 или мышиного CD137L через три дня после заражения указанным вирусом.

[0046] На **фигуре 5** изображено окрашивание нераковых (WI-38 и MRC5) или раковых (A549) клеток для обнаружения человеческого CD80 или человеческого CD137L через два дня после заражения указанным вирусом при МЗ равной 2.

[0047] На **фигуре 6** изображено окрашивание клеток A549 для обнаружения человеческого CD80 или человеческого CD137L через два дня после заражения указанным вирусом при МЗ равной 5.

[0048] На **фигуре 7** изображено окрашивание кристаллическим фиолетовым нераковых (WI-38 и MRC5) или раковых (A549) клеток в указанные моменты времени с или без заражения вирусом TAV-hCD80-hCD137L при МЗ равной 10.

[0049] На **фигуре 8** изображено окрашивание кристаллическим фиолетовым клеток ADS-12 в указанные моменты времени с или без заражения указанным вирусом при МЗ равной 10.

[0050] На **фигуре 9** изображена репликация указанных вирусов в клетках ADS, определенная при помощи анализа бляшкообразования.

[0051] На **фигуре 10** показан средний объем опухоли ($\pm$ СКО) подкожных опухолей ADS-12 у мышей после лечения тремя внутриопухолевыми инъекциями $5 \cdot 10^7$ БОЕ указанного вируса в дни 0, 4 и 8 ($n=10$). Объемы опухолей оценивались как длина $\cdot$ ширина²/2.

[0052] На **фигуре 11** показаны объемы опухолей подкожных опухолей ADS-12 у мышей после лечения тремя внутриопухолевыми инъекциями $1 \cdot 10^7$ БОЕ указанного вируса в дни 0, 4 и 8 ($n=3$). Объемы опухолей оценивались как длина $\cdot$ ширина²/2.

[0053] На **фигуре 12** показан средний объем опухоли ($\pm$ СКО) ортотопических опухолей 4T1 в жировой ткани молочной железы мышей после лечения тремя внутриопухолевыми инъекциями $5 \cdot 10^7$ БОЕ указанного вируса в дни 0, 4 и 8 ($n=10$). Объемы опухолей оценивались как длина $\cdot$ ширина²/2.

[0054] На **фигуре 13** изображено окрашивание клеток ADS-12 для обнаружения мышинового CD80, мышинового CD137L и мышинового ICAM-1 через четыре дня после заражения указанным вирусом при МЗ равной 10.

[0055] На **фигуре 14** изображено окрашивание клеток F244 для обнаружения мышинового CD80, мышинового CD137L и мышинового ICAM-1 через три дня после заражения указанным вирусом при МЗ равной 5.

[0056] На **фигуре 15** изображено окрашивание клеток HT29 для обнаружения мышинового CD80, мышинового CD137L и мышинового ICAM-1 через три дня после заражения указанным вирусом при МЗ равной 5.

[0057] На **фигуре 16** показаны объемы опухолей у мышей 129S4, несущих подкожные опухоли ADS-12, получавших внутриопухолевые инъекции или буфера (Фигура 16А), или TAV-mCD80-137L (Фигура

16B) или TAV-mCD80-137L-ICAM (**фигура 16C**)). Каждое лечение проводили каждые четыре дня по 1×10^9 БОЕ на дозу, всего три дозы. Каждая линия представляет объем опухоли отдельной мыши, по 10 мышей в каждой группе лечения.

Подробное описание

[0058] Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что аденовирусы, такие как онколитические вирусы, могут неожиданно эффективно экспрессировать несколько (два или более) терапевтических трансгенов, когда они встроены в конкретные сайты вставки, без использования экзогенного промотора, и что эти вирусы могут реплицироваться и эффективно экспрессировать два или более терапевтических трансгена, независимо от размера трансгенов, включенных в вирусный геном.

[0059] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, содержащему: (a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый терапевтический трансген, встроенный в сайт вставки E1b-19K; где сайт вставки E1b-19K расположен между старт-сайтом E1b-19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 1714-1716 в SEQ ID NO: 23) и старт-сайтом E1b-55K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E1b-55k, например, соответствующей нуклеотидам 2019-2021 в SEQ ID NO: 23); и (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй терапевтический трансген, встроенный в сайт вставки E3, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом pVIII (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон pVIII, например, соответствующей нуклеотидам 27855-27857 в SEQ ID NO: 23) и старт-сайтом Fiber (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон Fiber, например, соответствующей нуклеотидам 31042-31044 в SEQ ID NO: 23). Во всем описании и формуле изобретения предполагается, что вставка между двумя сайтами, например вставка между (i) старт-сайтом первого гена (например, E1b-19k) и старт-сайтом второго гена (например, E1b-55K.), (ii) старт-сайтом первого гена и стоп-сайтом второго гена, (iii) стоп-сайтом первого гена и старт-сайтом второго гена, или (iv) стоп-сайтом первого гена и стоп-сайтом второго означает, что все или часть нуклеотидов, составляющих данный старт-сайт или стоп-сайт, фланкирующий вставку, могут присутствовать или отсутствовать в конечном

вирусе. Аналогично, под вставкой между двумя нуклеотидами подразумевается, что нуклеотиды, фланкирующие вставку, могут присутствовать или отсутствовать в конечном вирусе. Термин «трансген» относится к экзогенному гену или полинуклеотидной последовательности. Термин «терапевтический трансген» относится к трансгену, который при репликации и/или экспрессии вирусом оказывает терапевтическое действие в клетке-мишени, жидкости организма, ткани, органе, физиологической системе или пациенте.

[0060] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K расположен между сайт-сайтом E1b-19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей сайт-кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 1714-1716 SEQ ID NO: 23) и стоп-сайтом E1b-19K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 2242-2244 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300, от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от 150 до приблизительно 305 от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, например, 202 или 203 нуклеотида, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1917 или 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1917, или между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген встроен между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2). Последовательности

СТGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2) определяют уникальные фланкирующие последовательности для сайта вставки E1b-19K в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 23). Во всем описании и формуле изобретения предполагается, что делеция, примыкающая к сайту, например делеция, примыкающая к старт-сайту гена, или делеция, примыкающая к стоп-сайту гена, означает, что делеция может включать удаление всех, части или ни одного из нуклеотидов, составляющих данный старт-сайт или стоп-сайт.

[0061] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-10.5K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-10.5K, например, соответствующей нуклеотидам 29770-29772 SEQ ID NO: 23) и стоп-сайтом E3-14.7K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-14.7K, например, соответствующей нуклеотидам 30837-30839 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт

вставки E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K, например сайт вставки E3 содержит делецию 1063 или 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 Ad5 dl309. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между последовательностями CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) второй терапевтический трансген и последовательность TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4). Последовательности CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4) определяют уникальные фланкирующие последовательности для сайта вставки E3 в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0062] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-grp19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-grp19K, например, соответствующей нуклеотидам 29215-29217 SEQ ID NO: 23), и стоп-сайтом E3-14.7K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-14.7K, например, соответствующей нуклеотидам 30837-30839 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. например, сайт вставки E3 содержит делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29218-30839 генома Ad5 (SEQ

ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения второй терапевтический трансген встроен между последовательностями TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29), второй терапевтический трансген и последовательность TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30). Последовательности TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30) определяют уникальные фланкирующие последовательности для сайта вставки E3 в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0063] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, содержащему: (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19k; и (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19k, где сайт вставки E1b-19k расположен между стартом E1b-19k (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стартовый кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 1714-1716 SEQ ID NO: 23) и стартом E1b-55k (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стартовый кодон E1b-55k, например, соответствующей нуклеотидам 2019-2021 SEQ ID NO: 23), и где первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность разделены первым участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

[0064] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K расположен между стартом E1b-19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стартовый кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 1714-1716 SEQ ID NO: 23) и стоп-сайтом E1b-19K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 2242-2244 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300, от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно

150, от 150 до приблизительно 305, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, например, 202 или 203 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1917 или 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй терапевтические трансгены встроены между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1917, или между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй терапевтические трансгены встроены между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген, IRES, второй терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

[0065] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит делецию E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает удаление от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 расположена между стоп-сайтом pVIII (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон pVIII, например, соответствующей нуклеотидам 27855–27857 SEQ ID NO: 23) и старт-сайтом Fiber (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон Fiber, например, соответствующей нуклеотидам 31042–31044 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт делеции E3 расположен между стоп-сайтом E3-10.5K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-10.5K, например, соответствующей нуклеотидам 29770–29772 SEQ ID NO: 23), и стоп-сайтом E3-14.7K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-14.7K, например, соответствующей нуклеотидам 30837–30839 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает удаление от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 приблизительно до 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает удаление приблизительно 1050 нуклеотидов рядом, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K, например, делеция E3 включает удаление 1063 или 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию, соответствующую делеции Ad3 dl309 E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 29773–30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0066] В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 расположена между стоп-сайтом E3-gr19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-gr19K, например, соответствующей нуклеотидам 29215–29217 SEQ ID NO: 23) и стоп-сайтом E3-14.7K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E3-14.7K, например, соответствующей нуклеотидам 30837–30839 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает удаление от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до

приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. например, делеция E3 включает делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E3 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 29218-30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0067] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий терапевтический трансген. Третий терапевтический трансген может быть встроен в сайт вставки E1b-19k, где, например, вторая нуклеотидная последовательность и третья нуклеотидная последовательность разделены вторым участком внутренней посадки рибосомы (IRES). В некоторых вариантах осуществления изобретения первый, второй и третий терапевтические трансгены встроены между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген, первый IRES, второй терапевтический трансген, второй IRES, третий терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2). Третий терапевтический трансген также может быть встроен в сайт делеции E3, то есть в некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E3. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29772 и 30837 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения третий терапевтический трансген встроен между последовательностями CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CAGTATGA (SEQ ID NO: 3), третий терапевтический трансген и последовательность TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения третий

терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления третий терапевтический трансген встроен между последовательностями TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29), третий терапевтический трансген и последовательность TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

[0068] IRES может быть, например, выбран из группы, состоящей из IRES вируса энцефаломиокардита, IRES вируса ящура и IRES вируса полиомиелита.

[0069] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов рекомбинантный аденовирус дополнительно содержит делецию E4. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 расположена между старт-сайтом E4-ORF6/7 (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E4-ORF6/7, например, соответствующей нуклеотидам 34075-34077 SEQ ID NO: 23) и правым инвертированным концевым повтором (ITR; например, соответствующей нуклеотидам 35836-35938 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 расположена между старт-сайтом E4-ORF6/7 и старт-сайтом E4-ORF1 (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей старт-кодон E4-ORF1, например, соответствующей нуклеотидам 35524-35526 SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию нуклеотидной последовательности между старт-сайтом E4-ORF6/7 и старт-сайтом E4-ORF1. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает удаление от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 2500, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000 или от приблизительно 2000 до приблизительно 2500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает удаление от приблизительно 250 до приблизительно 1500, от приблизительно 250 до приблизительно 1250, от приблизительно

250 до приблизительно 1000, от приблизительно 250 до приблизительно 750, от приблизительно 250 до приблизительно 500, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1250, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 500 до приблизительно 750, от приблизительно 750 до приблизительно 1500, от приблизительно 750 до приблизительно 1250, от приблизительно 750 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1000 до приблизительно 1250 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию приблизительно 1450 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7, например, делеция E4 включает делецию приблизительно 1449 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 34078–35526 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

[0070] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус настоящего изобретению представляет собой онколитический вирус, например вирус, который обладает опухоль-избирательной репликацией и/или осуществляет опосредованный вирусом лизис. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус настоящего изобретению обладает избирательной экспрессией терапевтического трансгена в гиперпролиферативной клетке, например раковой клетке, по сравнению с негиперпролиферативной клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия терапевтического трансгена в негиперпролиферативной клетке составляет приблизительно 90%, приблизительно 80%, приблизительно 70%, приблизительно 60%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, приблизительно 20%, приблизительно 10% или приблизительно 5% экспрессии этого гена в гиперпролиферативной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус не обладает обнаруживаемой экспрессии терапевтического трансгена в негиперпролиферативной клетке. Экспрессия терапевтического трансгена может быть определена любым подходящим способом, известным в данной области техники, например вестерн-блоттингом или ИФА.

[0071] Гиперпролиферативная клетка может представлять собой раковую клетку, например клетку карциномы, саркомы, лейкоза,

лимфомы, рака простаты, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака желудка, рака щитовидной железы, мезотелиомы, рака печени, рака почки, рака кожи, рака головы и шеи или клетки рака головного мозга.

[0072] Отличительные признаки рекомбинантных аденовирусов настоящего изобретения, например, отсутствие экзогенных промоторов, могут обеспечить экспрессию дополнительных терапевтических трансгенов или более крупных терапевтических трансгенов по сравнению с другими рекомбинантными аденовирусами. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтические трансгены, первый, второй и/или третий терапевтические трансгены или все терапевтические трансгены функционально не связаны с экзогенной промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансгенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов или размер всех терапевтических трансгенов, вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансгенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов или размер всех терапевтических трансгенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно

1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

[0073] В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет, по меньшей мере, приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000 или приблизительно 5000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет приблизительно 1650 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000 или приблизительно 7000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения размер первого и второго терапевтических трансенов, размер первого, второго и третьего терапевтических трансенов или размер всех терапевтических трансенов вместе составляет приблизительно 3100

нуклеотидов.

[0074] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит SEQ ID NO: 14 или содержит последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

[0075] Идентичность последовательности может быть определена различными способами, которые известны специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Анализ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) с использованием алгоритма, используемого программами blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx (Karlin et al., (1990) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87:2264-2268; Altschul, (1993) J. MOL. EVOL. 36, 290-300; Altschul et al., (1997) NUCLEIC ACIDS RES. 25:3389-3402, включены путем ссылки) специально разработан для поиска сходства между последовательностями. Для обсуждения основных вопросов о базах данных для поиска последовательности см. работу Altschul et al., (1994) NATURE GENETICS 6: 119-129, которая полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Параметры поиска для гистограммы, описаний, выравниваний, ожидаемого значения (то есть порога статистической значимости для отчетов о совпадениях с последовательностями базы данных), порогового значения, матрицы и фильтра являются настройками по умолчанию. Матрицей оценки по умолчанию, используемой blastp, blastx, tblastn и tblastx, является матрица BLOSUM62 (Henikoff et al., (1992) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 89: 10915-10919, полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки). Четыре параметра blastn могут быть скорректированы следующим образом: Q=10 (штраф за создание пропуска); R=10 (штраф за увеличение пропуска); wink=1 (генерирует область сходства в каждой позиции wink.sth последовательности-запроса); и gapw=16 (устанавливает ширину окна, в пределах которой создаются пропуски при выравнивании). Эквивалентные настройки параметров Blastp могут быть следующими: Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. Поиск также может

проводиться с использованием расширенного дополнительного параметра BLAST NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) (например, `-G`, Стоимость открытия пропуска [Целое число]: по умолчанию=5 для нуклеотидов/11 для белков; `-E`, Стоимость для увеличения пропуска) [целое число]: по умолчанию=2 для нуклеотидов/1 для белков; `-q`, штраф за несоответствие нуклеотидов [целое число]: по умолчанию = -3; `-r`, вознаграждение за совпадение нуклеотидов [целое число]: по умолчанию=1; `-e`, ожидаемое значение [фактическое число]: по умолчанию=10; `-W`, размер слова [целое число]: по умолчанию=11 для нуклеотидов/28 для мегаблота/3 для белков; `-y`, сброс (X) для расширений бласта в битах: по умолчанию=20 для blastn/7 для других; `-X`, значение сброса X для выравнивания с пропуском (в битах): по умолчанию=15 для всех программ, неприменимо к blastn, и `-Z`, конечное значение сброса X для выравнивания с пропуском (в битах): 50 для blastn, 25 для других). Также можно использовать алгоритм ClustalW для парного выравнивания белков (параметры по умолчанию могут включать, например, матрицу Blosum62 и штраф за открытие пропуска=10 и штраф за расширение пропуска=0.1). Сравнение Bestfit между последовательностями, доступное в пакете GCG версии 10.0, использует параметры ДНК GAP=50 (штраф за создание пропуска) и LEN=3 (штраф за расширение пропуска), и эквивалентные настройки в белковых выравниваниях: GAP=8 и LEN=2.

[0076] Настоящее изобретение также относится к вектору аденовируса типа 5, который экспрессирует один или несколько терапевтических трансгенов, в частности, иммуномодулирующие трансгены в сайтах E1, E3 и E4, а также в правой и левой ориентациях. Используемый здесь термин «иммуномодулирующий» относится к терапевтическому трансгену, который модулирует функцию иммунной системы пациента. Иммуномодулирующие трансгены могут модулировать функцию, например, В-клеток, Т-клеток и/или продукцию антител. Типичные иммуномодулирующие трансгены включают ингибиторы контрольных точек. Типичные иммуномодулирующие трансгены могут включать, например, PD-1 или PD-L1, или любой трансген, который модулирует их активность. Другие типичные иммуномодулирующие трансгены могут включать антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. Некоторые иммуномодулирующие трансгены могут содержать пептидные линкеры, например, пептидные линкеры длиной от 2 до 5000 или более аминокислот, которые могут быть иммуногенными, то есть уязвимыми

для нейтрализующих антител. Предполагается, что иммуногенность таких линкеров может быть снижена путем замены иммуногенных последовательностей неиммуногенными последовательностями.

[0077] Настоящее изобретение также относится к способам лечения, включающим введение раскрытого здесь рекомбинантного аденовируса в комбинации с антителами, которые, например, блокируют иммунные контрольные точки или улучшают представление антигенов/захват антигенов и/или/ повышают чувствительность опухолеспецифических Т-клеток.

I. Вирусы

[0078] Термин «вирус» используется здесь для обозначения любого из облигатных внутриклеточных паразитов, не имеющих механизма синтеза белка или генерирования энергии. Вирусный геном может быть представлен РНК или ДНК. Вирусы, применимые в практике настоящего изобретения, включают рекомбинантно модифицированные, имеющие оболочку или без нее ДНК и РНК вирусы, предпочтительно выбранные из семейств *Baculoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae* или *Adenoviridae*. Используемый здесь термин «рекомбинантно модифицированный вирус» относится к «рекомбинантному вирусу». Рекомбинантный вирус может, например, быть модифицирован при помощи технологий рекомбинантных ДНК, чтобы быть репликационно дефицитным, условно реплицирующимся или компетентным в отношении репликации, и/или быть модифицирован при помощи технологий рекомбинантных ДНК таким образом, чтобы включать экспрессию экзогенных транскриптов. Химерные вирусные векторы, которые используют полезные элементы каждого из свойств родительского вектора (см., например, Feng et al. (1997) NATURE BIOTECHNOLOGY 15: 866-870), также могут быть применимы в практике настоящего изобретения. Хотя обычно предпочитают использовать вирус из подлежащих лечению видов, в некоторых случаях может быть выгодно использовать векторы, полученные из разных видов, которые обладают благоприятными патогенными свойствами. Например, векторы на основе вируса герпеса лошадей для генной терапии человека описаны в публикации Международной патентной заявки No. W098/27216. Эти векторы описаны как применимые для лечения людей, так как вирус лошадей не является патогенным для человека. Точно так же векторы на основе аденовируса овец могут использоваться в генной терапии человека, поскольку, как утверждается, они избегают антител против аденовирусных векторов

человека. Такие векторы описаны в публикации Международной патентной заявки No. W097/06826.

[0079] Предпочтительно, рекомбинантный вирус представляет собой аденовирус. Аденовирусы представляют собой средние (90–100 нм), не имеющие оболочки (голые) икосаэдрические вирусы, состоящие из нуклеокапсида и двухцепочечного линейного ДНК-генома. Аденовирусы реплицируются в ядре клеток млекопитающих с использованием механизма репликации хозяина. Термин «аденовирус» относится к любому вирусу из семейства *Adenoviridae*, включая без ограничений подсемейства аденовируса человека, коровы, овцы, лошади, собаки, свиньи, мыши и обезьяны. В частности, аденовирусы человека включают подроды А–F, а также их отдельные серотипы, отдельные серотипы и подроды AF, включая без ограничений аденовирусы человека типов 1, 2, 3, 4, 4а, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Ad11a и Ad11p), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19а, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 34а, 35, 35р, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 91. Предпочтительными являются рекомбинантные вирусы, полученные из аденовируса человека типа 2 и 5. Если не указано иное, все номера нуклеотидов аденовируса типа 5 относятся к эталонной последовательности NCBI AC_000008.1, которая приводится здесь в последовательности SEQ ID NO: 23.

[0080] Цикл репликации аденовируса имеет две фазы: раннюю фазу, во время которой экспрессируются 4 единицы транскрипции E1, E2, E3 и E4, и позднюю фазу, которая происходит после начала синтеза вирусной ДНК, когда поздние транскрипты экспрессируются преимущественно под контролем главного позднего промотора (MLP). Поздние транскрипты кодируют большинство структурных белков вируса. Генные продукты E1, E2 и E4 отвечают за активацию транскрипции, трансформацию клеток, репликацию вирусной ДНК, а также за другие вирусные функции, а также они необходимы для вирусного роста.

[0081] Термин «функционально связанный» относится к соединению полинуклеотидных элементов в функциональной взаимосвязи. Последовательность нуклеиновой кислоты является «функционально связанной», когда она находится в функциональном отношении с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с геном, если он влияет на транскрипцию гена. Функционально связанные нуклеотидные последовательности обычно являются смежными.

Однако, поскольку энхансеры обычно функционируют, когда они отделены от промотора несколькими килобазами, а интронные последовательности могут иметь переменную длину, некоторые полинуклеотидные элементы могут быть функционально связаны, но не фланкировать друг друга напрямую, и могут даже функционировать в транс-положении из другого аллеля или хромосомы.

[0082] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус имеет одну или несколько модификаций регуляторной последовательности или промотора. Модификация регуляторной последовательности или промотора включает делецию, замену или добавление одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа регуляторной последовательности или промотора.

[0083] В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация регуляторной последовательности или промотора включает модификацию последовательности сайта связывания фактора транскрипции для уменьшения сродства к фактору транскрипции, например, путем удаления ее части или путем вставки одной точечной мутации в сайт связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительно модифицированная регуляторная последовательность усиливает экспрессию в опухолевых клетках, но ослабляет экспрессию в нормальных клетках.

[0084] В некоторых вариантах осуществления модифицированная регуляторная последовательность функционально связана с последовательностью, кодирующей белок. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из аденовирусных генов E1a и E1b (кодирующих областей) функционально связан с модифицированной регуляторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения ген E1a функционально связан с модифицированной регуляторной последовательностью.

[0085] Регуляторная последовательность E1a содержит пять сайтов связывания для фактора транскрипции Rea3, обозначенных как Rea3 I, Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и Rea3 V, где Rea3 I является сайтом связывания Rea3, наиболее проксимальным к старт-сайту E1a, и Rea3 V является наиболее дистальным. Регуляторная последовательность E1a также содержит сайты связывания для фактора транскрипции E2F, обозначенные как E2F I и E2F II, где E2F I является сайтом связывания E2F, наиболее проксимальным к

старт-сайту E1a, а E2F II является более дистальным. От старт-сайта E1a расположены сайты связывания: Rea3 I, E2F I, Rea3 II, E2F II, Rea3 III, Rea3 IV и Rea3 V.

[0086] В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из этих семи сайтов связывания или их функциональная часть удаляется. «Функциональная часть» представляет собой часть сайта связывания, которая при удалении уменьшает или даже устраняет функциональность, например, аффинность связывания сайта связывания с его соответствующим фактором транскрипции (Rea3 или E2F), например, по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с полноразмерной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения целиком удаляются один или несколько сайтов связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения удаляется функциональная часть одного или нескольких сайтов связывания. Термин «удаленный сайт связывания» включает как удаление всего сайта связывания, так и удаление его функциональной части. В случае, когда удаляются два или более сайтов связывания, может использоваться любая комбинация полного удаления сайта связывания и удаления его функциональной части.

[0087] В некоторых вариантах осуществления изобретения удаляется по меньшей мере один сайт связывания Rea3 или его функциональная часть. Удаленный сайт связывания Rea3 может представлять собой Rea3 I, Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и/или Rea3 V. В некоторых вариантах осуществления изобретения удаленный сайт связывания Rea3 представляет собой Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и/или Rea3 V. В некоторых вариантах осуществления изобретения удаленный сайт связывания Rea3 представляет собой Rea3 IV и/или Rea3 V. В некоторых вариантах осуществления изобретения удаленный сайт связывания Rea3 представляет собой Rea3 II и/или Rea3 III. В некоторых вариантах осуществления изобретения удаленный сайт связывания Rea3 представляет собой Rea3 II и Rea3 III. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт связывания Rea3 I или его функциональная часть сохраняются.

[0088] В некоторых вариантах осуществления изобретения удаляется по меньшей мере один сайт связывания E2F или его функциональная часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения сохраняется по меньшей мере один сайт связывания E2F или его функциональная часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения сохраненным сайтом связывания E2F

является E2F I и/или E2F II. В некоторых вариантах осуществления изобретения сохраненным сайтом связывания E2F является E2F II. В некоторых вариантах осуществления изобретения общая делеция состоит в основном из одного или нескольких из сайтов связывания Pea3 II, Pea3 III, Pea3 IV и/или Pea3 V или их функциональных частей. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус имеет делецию области из 50 пар оснований, расположенной от -304 до -255 нуклеотидов перед сайтом инициации E1a, например, соответствующую 195-244 нуклеотидам генома Ad5 (SEQ ID NO: 23), далее именуется как делеция TAV-255. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция TAV-255 приводит к получению промотора E1a, который содержит последовательность GGTGTTTTGG (SEQ ID NO: 28).

[0089] Аденовирусный ген E1b-19k функционирует в основном как антиапоптотический ген и является гомологом клеточного антиапоптотического гена BCL-2. Поскольку гибель клеток-хозяев до созревания вирусных частиц следующего поколения будет ограничивать репликацию вируса, E1b-19k экспрессируется как часть кассеты E1 для предотвращения преждевременной гибели клеток, что позволяет инфекции протекать и образовывать зрелые вирионы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденовирусу, который включает сайт вставки E1b-19K, например, этот аденовирус имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический трансген, встроенный в сайт вставки E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический трансген, встроенный в сайт вставки E1b-19K, где сайт вставки расположен между сайт-сайтом E1b-19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей сайт-кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 1714-1716 SEQ ID NO: 23) и сайт-сайтом E1b-55K (т.е. нуклеотидной последовательностью, кодирующей сайт-кодон E1b-55k, например, соответствующей нуклеотидам 2019-2021 SEQ ID NO: 23).

II. Способы получения вирусов

[0090] Способы получения рекомбинантных вирусов настоящего изобретения известны в данной области техники. Как правило, раскрытый здесь вирус продуцируется в подходящей линии клеток-хозяев с использованием обычных методов, включая культивирование трансфицированной или инфицированной клетки-хозяина в подходящих

условиях, позволяющих продуцировать инфекционные вирусные частицы. Нуклеиновые кислоты, кодирующие вирусные гены, могут быть включены в плазмиды и введены в клетки-хозяева с помощью общеизвестных методов трансфекции или трансформации. Типичные подходящие клетки-хозяева для продуцирования раскрытых здесь вирусов включают клеточные линии человека, такие как клетки HeLa, Hela-S3, HEK293, 911, A549, HER96 или PER-C6. Конкретные условия получения и очистки будут варьироваться в зависимости от вируса и используемой продуцирующей системы. Для аденовируса традиционным методом генерации вирусных частиц является котрансфекция с последующей рекомбинацией *in vivo* челночной плазмиды (обычно содержащей небольшую часть аденовирусного генома и при необходимости содержащей потенциальный трансген экспрессионной кассеты) и аденовирусной плазмиды-помощника (содержащей большую часть всего аденовирусного генома).

[0091] Альтернативные технологии для получения аденовируса включают использование системы бактериальной искусственной хромосомы (BAC), бактериальной рекомбинации *in vivo* в бактериальном штамме *recA*⁻ с использованием двух плазмид, содержащих комплементарные аденовирусные последовательности, и системы искусственной хромосомы дрожжей (YAC).

[0092] После продуцирования инфекционные вирусные частицы выделяют из культуры и при необходимости очищают. Типичные стадии очистки могут включать очистку бляшек, центрифугирование, например центрифугирование в градиенте хлорида цезия, осветление, ферментативную обработку, например обработку бензоназой или протеазой, этапы хроматографии, например этапы ионообменной хроматографии или фильтрации.

III. Терапевтические трансгены

[0093] Раскрытый рекомбинантный аденовирус может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует терапевтический трансген. В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытый здесь рекомбинантный вирус может содержать первую нуклеотидную последовательность и вторую нуклеотидную последовательность, которые кодируют первый и второй терапевтический трансген, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытый здесь рекомбинантный вирус может содержать первую нуклеотидную последовательность, вторую нуклеотидную последовательность и третью нуклеотидную последовательность, которые кодируют первый, второй и третий

терапевтический трансген, соответственно.

[0094] Терапевтический трансген может кодировать терапевтическую нуклеиновую кислоту, например антисмысловую РНК или рибозимную РНК. Терапевтический трансген может кодировать терапевтический пептид или полипептид, например онкопротеин, пептид или полипептид супрессор опухоли, фермент, цитокин, иммуномодулирующий пептид или полипептид, антитело, литический пептид, вакцинный антиген, пептид или полипептид, который исправляет генетические дефекты в соматической клетки, или пептид или полипептид, который катализирует процессы, приводящие к гибели клеток.

[0095] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтический трансген, первый, второй и/или третий терапевтические трансгены или любой из терапевтических трансгенов кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, p40, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1 и ловушки TGF- β .

[0096] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый и/или второй терапевтический трансген, первый, второй и/или третий терапевтические трансгены или любой из терапевтических трансгенов кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23, IL-23A/p19, p40, IL-27, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

[0097] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген кодирует CD80, и/или второй терапевтический трансген кодирует CD137L. В других вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген кодирует CD137L, и/или второй терапевтический трансген кодирует CD80. CD80 представляет собой костимулирующую молекулу, которая может играть роль в активации наивных CD8⁺ Т-клеток. CD8⁺ Т-клетки активируются, когда рецептор Т-клеток (TCR) связывается с главным комплексом гистосовместимости класса I (MHC) на антигенпрезентирующей клетке (АПК), представляющей пептид,

который распознает TCR. В дополнение к взаимодействию TCR – MHC, Т-клетка также должна получать костимулирующий сигнал через молекулу CD28 на Т-клетке, связывающуюся либо с CD80, либо с CD86 на АПК. Затем Т-клетка может стать активированной, делясь и приобретая способность вызывать ответ против других клеток, которые имеют тот же пептид. Активация также приводит к экспрессии других молекул, включая CTLA-4 и CD137, на Т-клетке. CTLA-4 связывается с CD80 с более высокой аффинностью, чем CD28, а связывание CTLA-4 с CD80 приводит к инактивации Т-клеток. CD137 связывается с CD137L и после связывания дополнительно активирует Т-клетку и способствует клеточному делению и поддержанию иммунного ответа.

[0098] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из CD80 и CD137L, например, первый терапевтический трансген кодирует CD80, а второй терапевтический трансген кодирует CD137L. Типичная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий CD80, приведена в SEQ ID NO: 5, а типичная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий CD137L, приведена в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 5 и/или SEQ ID NO: 7 или последовательностью, имеющей 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5 и/или SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8, или последовательностью, имеющей 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO : 27 или последовательностью, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 27.

[0099] В некоторых вариантах осуществления изобретения в любом из вышеупомянутых вирусов первый, второй и/или третий терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из CD80,

CD137L и ICAM-1, например, первый терапевтический трансген кодирует CD80, второй терапевтический трансген кодирует CD137L, а третий терапевтический трансген кодирует ICAM-1. Типичная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий ICAM1, приведена в SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и/или SEQ ID NO: 32, или последовательностью, имеющей 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и/или SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22, или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 22.

[0100] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй терапевтический трансген кодируют первую и вторую субъединицу, соответственно, гетеродимерного цитокина. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из IL-23A/p19 и p40, которые составляют гетеродимерный цитокин IL-23. Например, первый терапевтический трансген может кодировать IL-23A/p19, а второй терапевтический трансген может кодировать p40. Типичная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий IL-23A/p19, приведена в SEQ ID NO: 12, а примерная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий p40, приведена в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 12 и/или SEQ ID NO: 10, или последовательностью, имеющей 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12 и/или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%

97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 13.

[00101] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления изобретения первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из IL-27A/p28 и IL-27B/EBI3, которые составляют гетеродимерный цитокин IL-27. Например, первый терапевтический трансген может кодировать IL-IL-27A/p28, а второй терапевтический трансген может кодировать IL-27B/EBI3.

[00102] Когда размер опухолей в процессе их роста превышает приблизительно 2 мм³ в диаметре, им становится необходима независимая сеть кровеносных сосудов для снабжения питательными веществами и кислородом и удаления отходов жизнедеятельности. Это новое образование сосудов, то есть неоваскуляризация, известно как ангиогенез опухоли. Проангиогенные факторы включают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), интерлейкин 8 (IL-8) и ангиопоэтины. Эндостатин и ангиостатин представляют собой природные антиангиогенные белки, о которых известно, что они ингибируют неоваскуляризацию.

[00103] В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из эндостатина и ангиостатина. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген представляет собой эндостатин, а второй терапевтический трансген представляет собой ангиостатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый терапевтический трансген представляет собой ангиостатин, а второй терапевтический трансген представляет собой эндостатин.

[00104] Эндостатин представляет собой протеолитический фрагмент коллагена XVIII. Типичная аминокислотная последовательность коллагена XVIII человека, соответствующая референсной последовательности NCBI NP_085059.2, приведена в SEQ ID NO: 33. Эндостатин может образовываться в результате протеолитического расщепления коллагена XVIII в разных сайтах. Неколлагеновый домен 1 (NC1) на С-конце коллагена XVIII как правило рассматривается как отвечающий за антиангиогенное действие эндостатина. Типичная аминокислотная последовательность домена NC1 коллагена человека XVIII приведена в SEQ ID NO: 37. Соответственно, используемый здесь термин «эндостатин» относится

к белку, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или содержащему аминокислотную последовательность, имеющую более 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 37, или фрагмент любой из вышеуказанных последовательностей, который способен нековалентно олигомеризоваться в тримеры, например, через домен ассоциации, присутствующий в SEQ ID NO: 37. Олигомеризацию можно анализировать любым способом, известным в данной области техники, включая, например, эксклюзионную хроматографию по размеру, аналитическое ультрацентрифугирование, методы рассеяния, ЯМР-спектроскопию, изотермическую титрационную калориметрию, флуоресцентную анизотропию и масс-спектрометрию.

[00105] В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытый здесь рекомбинантный вирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38, или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

[00106] Ангиостатин представляет собой протеолитический фрагмент плазминогена. Типичная аминокислотная последовательность плазминогена человека, соответствующая референсной последовательности NCBI NP_000292.1, приведена в SEQ ID NO: 34.

[00107] Ангиостатин может образовываться в результате протеолитического расщепления плазминогена в разных местах. Плазминоген имеет пять крингл-доменов, которые обычно считаются ответственными за антиангиогенное действие ангиостатина. Типичная аминокислотная последовательность первого крингл-домена плазминогена человека приведена в SEQ ID NO: 39, типичная аминокислотная последовательность второго крингл-домена плазминогена человека приведена в SEQ ID NO: 40, типичная аминокислотная последовательность третьего крингл-домена плазминогена человека приведена в SEQ ID NO: 41, типичная аминокислотная последовательность четвертого крингл-домена плазминогена человека приведена в SEQ ID NO: 42, и примерная аминокислотная последовательность пятого крингл-домена плазминогена человека приведена в SEQ ID NO: 43. Соответственно, используемый здесь термин «ангиостатин» относится к белку,

содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43, или содержащему аминокислотную последовательность, имеющую более 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43 или фрагмент любой из вышеуказанных последовательностей, который способен противодействовать миграции эндотелиальных клеток и/или пролиферации эндотелиальных клеток. Миграцию и/или пролиферацию эндотелиальных клеток можно анализировать любым способом, известным в данной области техники, включая, например, методы, описанные в Guo et al. (2014) METHODS MOL. BIOL. 1135: 393-402.

[00108] В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытый здесь рекомбинантный вирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44 или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

[00109] В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытый здесь рекомбинантный вирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

IV. Способы лечения

[00110] Для терапевтического применения рекомбинантный аденовирус предпочтительно комбинируют с фармацевтически приемлемым носителем. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением польза/риск. Носитель (и) должен быть «приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами препаратов и не является вредным для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические и

замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

[00111] Фармацевтические композиции, содержащие раскрытые здесь рекомбинантные аденовирусы, могут находиться в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна быть составлена так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примерами путей введения являются внутривенное (в.в.), внутрикожное, ингаляционное, чрескожное, топическое, трансмукозальное и ректальное введение. Предпочтительным путем введения слитых белков является внутривенная инфузия. Подходящие составы могут быть получены способами, известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990). Компоненты композиции, подходящие для парентерального введения, включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

[00112] Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, кремофор ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Носитель должен быть стабильным в условиях изготовления и хранения и должен быть защищен от микроорганизмов. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[00113] Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными. Стерилизация может быть выполнена любым подходящим способом, например фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Если композиция является лиофилизированной, то стерилизацию на фильтре можно проводить до или после последующей лиофилизации и восстановления.

[00114] Используемый здесь термин «эффективное количество» относится к количеству активного компонента (например, количеству рекомбинантного аденовируса настоящего изобретения), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений, применений или дозировок и не предполагается, что оно ограничивается конкретным составом или способом введения.

[00115] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество активного компонента находится в диапазоне от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, например, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически эффективное количество рекомбинантного аденовируса находится в диапазоне от 10^2 до 10^{15} бляшкообразующих единиц (БОЕ), например от 10^2 до 10^{10} , от 10^2 до 10^5 , от 10^5 до 10^{15} , от 10^5 до 10^{10} или от 10^{10} до 10^{15} бляшкообразующих единиц. Вводимое количество будет зависеть от таких переменных, как тип и степень заболевания или показания к лечению, общее состояние здоровья пациента, эффективность антитела *in vivo*, фармацевтическая композиция и способ введения. Начальная доза может быть поднята за пределы верхнего уровня, чтобы быстро достичь желаемого уровня в крови или ткани. Альтернативно, начальная доза может быть меньше оптимальной, и суточная доза может постепенно увеличиваться в течение курса лечения. Дозировка для человека может быть оптимизирована, например, в обычном исследовании с увеличением дозы I фазы, проводимом в диапазоне от 0,5 до 20 мг/кг. Частота введения дозы может варьироваться в зависимости от таких факторов, как способ введения, количество дозы, период полувыведения антитела из сыворотки и подлежащее лечению заболевание. Приводимые в качестве примера частоты введения дозы составляют один раз в сутки, один раз в неделю и один раз каждые две недели. Предпочтительным способом введения является парентеральный, например, внутривенная инфузия. Составление лекарственных средств на основе моноклональных антител известен специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус лиофилизируют и затем восстанавливают фосфатно-солевым буфером непосредственно перед введением.

[00116] Раскрытые здесь рекомбинантные аденовирусы могут использоваться для лечения при различных медицинских показаниях.

Например, рекомбинантные аденовирусы могут использоваться для лечения рака. Раковые клетки подвергаются воздействию терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденовируса, чтобы ингибировать или уменьшать пролиферацию раковых клеток. Настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента. Этот способ включает введение пациенту эффективного количества рекомбинантного аденовируса согласно настоящему изобретению либо индивидуально, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом для лечения рака у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение эффективного количества рекомбинантного аденовируса пациенту снижает опухолевую нагрузку у этого пациента по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

[00117] Используемый здесь термин «лечить», «способ лечения» и «лечение» означает лечение заболевания у пациента, например у человека. Это включает: (a) подавление заболевания, то есть прекращение его развития; и (b) облегчение заболевания, то есть вызывание регрессии болезненного состояния. Используемые здесь термины «лицо» и «пациент» относятся к организму, подлежащему лечению описанными здесь способами и композициями. Такие организмы предпочтительно включают без ограничений млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и тому подобное), и более предпочтительно включают людей.

[00118] Примеры раковых заболеваний включают солидные опухоли, опухоли мягких тканей, гематопозитические опухоли и метастатические поражения. Примеры гематопозитических опухолей включают лейкоз, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), В-клеточный, Т-клеточный или ОЛЛ по классификации FAB, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоцитарный лейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), например, трансформированный ХЛЛ, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, миелодипластический синдром (МДС), лимфому, болезнь Ходжкина, злокачественную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, множественную миелому или синдром Рихтера (преобразование Рихтера). Примеры солидных опухолей включают злокачественные опухоли, например саркомы, аденокарциномы и

карциномы, различных систем органов, такие как поражающие голову и шею (включая глотку), щитовидную железу, легкие (мелкоклеточный или немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ)), молочные железы, лимфотическую ткань, желудочно-кишечный тракт (например, ротовую полость, пищевод, желудок, печень, поджелудочную железу, тонкий кишечник, толстую и прямую кишку, анальный канал), половые органы и мочеполовые пути (например, почки, уротелий, мочевого пузырь, яичники, матку, шейку матки, эндометрий, предстательную железу, яичко), ЦНС (например, нервные или глиальные клетки, например, нейробластома или глиома) или кожу (например, меланома).

[00119] В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из группы, состоящей из меланомы, плоскоклеточного рака кожи, базально-клеточного рака, рака головы и шеи, рака молочной железы, анального рака, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточного рака, рака предстательной железы, гастрозофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рак яичника, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга, рака эндометрия, нейроэндокринного рака и рака поджелудочной железы.

[00120] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус вводят пациенту в комбинации с одной или несколькими терапиями, например хирургическим вмешательством, лучевой терапией, химиотерапией, иммунотерапией, гормональной терапией или виротерапией.

[00121] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором тирозинкиназы, например эрлотинибом.

[00122] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки, например антителом к CTLA-4, антителом к PD-1 или антителом к PD-L1. Типичные антитела к PD-1 включают, например, ниволумаб (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb Co.), пембролизумаб (Keytruda®, Merck Sharp & Dohme Corp.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) и пидилизумаб (CT-011, Cure Tech). Типичные антитела к PD-L1 включают, например, атезолизумаб (Tecentriq®, Genentech), дувалумаб (AstraZeneca), MEDI4736, авелумаб и BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.).

[00123] Используемый здесь термин «в комбинации» означает,

что два (или более) различных способа лечения проводятся пациенту в течение заболевания пациента, таким образом, что влияние этих способов лечения на пациента перекрывается в определенный момент времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения проведение одного способа лечения все еще происходит, когда начинается проведение второго способа лечения, так что существует перекрывание в сроках введения. Такое введение иногда упоминается здесь как «одновременное» или «параллельное введение». В других вариантах осуществления изобретения проведение одного способа лечения заканчивается до начала проведения другого способа лечения. В некоторых вариантах осуществления любого случая благодаря комбинированному введению лечение является более эффективным. Например, второй способ лечения является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго лечения, или второй способ лечения уменьшает симптомы в большей степени, чем это было бы, если бы второе лечение проводилось в отсутствие первого лечения, или аналогичная ситуация наблюдается с первым способом лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения проведение второго лечения обеспечивает уменьшение симптома или другого параметра, связанного с расстройством, больше, чем это происходило бы при одном лечении, проведенном в отсутствие другого. Эффект двух способов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или большим, чем аддитивный. Проведение способов лечения может быть таким, что эффект от первого способа лечения все еще можно обнаружить, когда проводится второе лечение.

[00124] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество рекомбинантного вируса идентифицируют путем измерения иммунного ответа на антиген у пациента, и/или способ лечения пациента дополнительно включает измерение иммунного ответа на антиген у пациента. Гиперпролиферативные заболевания, например раковые заболевания, могут характеризоваться иммуносупрессией, и измерение иммунного ответа на антиген у пациента может указывать на уровень иммуносупрессии у пациента. Соответственно, измерение иммунного ответа на антиген у пациента может указывать на эффективность лечения и/или эффективное количество рекомбинантного вируса. Иммунный ответ на антиген у пациента может быть измерен любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах

осуществления изобретения иммунный ответ на антиген измеряют путем инъекции пациенту антигена в место инъекции на коже пациента и измерения величины индукции или степени воспаления в месте инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунный ответ на антиген измеряют по высвобождению цитокина из клетки пациента (например, гамма-интерферона, IL-4 и/или IL-5) при воздействии антигена.

[00125] Во всем тексте описании, где вирусы, композиции и системы описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие или включающие конкретные стадии, предполагается, что, кроме того, существуют композиции, устройства и системы согласно настоящему изобретению, которые в основном состоят из перечисленных компонентов или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы согласно настоящему изобретению, которые в основном состоят из перечисленных стадий способа или состоят из них.

[00126] В тексте заявке, где элемент или компонент считается включенным и/или выбранным из списка перечисленных элементов или компонентов, следует понимать, что элемент или компонент может быть любым из перечисленных элементов или компонентов, или элемент или компонент может быть выбран из группы, состоящей из двух или более перечисленных элементов или компонентов.

[00127] Кроме того, следует понимать, что элементы и/или признаки вируса, композиции, системы, способа или процесса, описанные здесь, могут комбинироваться различными способами, не выходя за пределы сущности и объема настоящего изобретения явным или неявным образом. Например, если делается ссылка на конкретный вирус, этот вирус можно использовать в различных вариантах осуществления композиций согласно настоящему изобретению и/или в способах согласно настоящему изобретению, если иное явно не следует из контекста. Другими словами, в этой заявке варианты осуществления изобретения были описаны и изображены таким образом, чтобы составить ясную и исчерпывающую заявку, но необходимо понимать, что варианты осуществления изобретения могут по-разному комбинироваться или разделяться без отступления от идеи настоящего изобретения. Например, следует понимать, что все признаки, описанные и изображенные в этой заявке, могут быть применимы ко всем аспектам изобретения,

описанным и изображенным в этой заявке.

[00128] Следует понимать, что выражение «по меньшей мере один из» включает индивидуально каждый из перечисленных объектов после выражения и различные комбинации двух или более перечисленных объектов, если иное не следует из контекста и применения. Выражение «и/или» в связи с тремя или более перечисленными объектами следует понимать как имеющие одинаковое значение, если иное не следует из контекста.

[00129] Использование термина «включать», «включает», «включающий», «иметь», «имеет», «имеющий», «содержать», «содержит» или «содержащий», включая их грамматические эквиваленты, следует понимать, как правило, как открытое и неограничивающие, например, не исключая дополнительные не указанные элементы или стадии, если иное не указано или иным образом не следует из контекста.

[00130] В различных местах в настоящем описании вирусы, композиции, системы, процессы и способы или их признаки раскрыты в группах или в диапазонах. В частности, подразумевается, что описание включает каждую отдельную субкомбинацию членов таких групп и диапазонов. В качестве других примеров целое число в диапазоне от 1 до 20 специально предназначено для индивидуального раскрытия 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20.

[00131] Когда использование термина «приблизительно» предшествует количественному значению, настоящее изобретение также включает само конкретное количественное значение, если специально не указано иное. Используемый здесь термин «приблизительно» относится к отклонению $\pm 10\%$ от номинального значения, если иное не указано или не предполагается.

[00132] Необходимо понимать, что порядок стадий или порядок выполнения определенных действий не имеет значения, если настоящее изобретение остается работоспособным. Кроме того, два или более стадий или действий могут быть выполнены одновременно.

[00133] Использование в этой заявке любого и всех примеров или вводных слов перед примером, например, «таких как» или «включающий», предназначено только для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если это специально не указано. Ни один термин в описании не должен быть истолкован как указывающий на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практической

реализации настоящего изобретения.

Примеры

[00134] Следующие примеры являются только иллюстративными и не предназначены для какого-либо ограничения объема или содержания изобретения.

Пример 1: Конструирование аденовируса, экспрессирующего CD80 и CD137L

[00135] В этом примере описано получение рекомбинантного аденовируса типа 5 (Ad5), который экспрессирует мышинные формы CD80 и CD137L.

[00136] Был сконструирован вирус аденовируса типа 5, который имеет делецию нуклеотидной области, расположенной от -304 до -255 нуклеотидов перед сайтом инициации E1a, что делает экспрессию E1a селективной по отношению к раку (как описано ранее в патенте США No. 9073980). Полученный вирус далее именуется TAV.

[00137] TAV был дополнительно модифицирован, чтобы иметь сайт SalI в старт-сайте области E1b-19k и сайт XhoI через 200 пар оснований после 3'-конца сайта SalI для облегчения вставки терапевтических трансгенов. Нуклеотидная последовательность модифицированной области E1b-19k является следующей, с подчеркнутыми остаточными основаниями из слитых сайтов SalI и XhoI:

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTTCGAGTCACCAGGCGCTTTTCCAA (SEQ ID NO: 15).

[00138] TAV был дополнительно модифицирован, чтобы иметь делецию dl309 генов RID α , RID β и 14.7k области E3. Нуклеотидная последовательность модифицированной области E3 является следующей, с дефисом, указывающим место делеции:

TCTTTTCTCTTACAGTATGA-TAATAAAAAAAAAATAATAAAGCATCACTTAC (SEQ ID NO: 16).

[00139] Полученный вирус, включающий как модифицированную область E1b-19k, так и модифицированную область E3, далее именуется TAV- Δ 19k.

[00140] Где указано, мышинный CD80 (mCD80) или человеческий CD80 (hCD80) клонировали в модифицированную область E1b-19k.

[00141] Последовательность mCD80 в модифицированной области E1b-19k является следующей, кодирующая область представлена строчными буквами, а фланкирующие аденовирусные последовательности, включая сайты SalI и XhoI, - заглавными

буквами:

ATCTGACCTCGTCGACatggccttgcaattgtcagttgatgcaggatacaccactcctca
agtttccatgtccaaggctcattcttctctttgtgctgctgattcgtctttcacaagtgctcttc
agatgttgatgaacaactgtccaagtcagtgaagataaggtattgctgccttgccgtttacaac
tctcctcatgaagatgagtcctgaagaccgaatctactggcaaaaacatgacaaagtggtgctgt
ctgtcattgctgggaaactaaaagtggtggcccgagtataagaaccggactttatatgacaacac
tacctactctcttatcatcctgggcctggctctttcagaccggggcacatacagctgtgtcgtt
caaaagaaggaaagaggaacgtatgaagttaaacacttggcctttagtaaagttgtccatcaaag
ctgactttctctacccccaacataactgagtcctggaaacccatctgcagacactaaaaggattac
ctgcttttgcttccgggggtttcccaaagcctcgcttctcttggttggaaaatggaagagaatta
cctggcatcaatacgacaattttcccaggatcctgaatctgaattgtacaccattagtagccaac
tagattttcaatacgactcgcaaccacaccattaagtgtctcattaaatatggagatgctcacgt
gtcagaggacttcacctgggaaaaacccccagaagaccctcctgatagcaagaacacacttggt
ctctttggggcaggattcggcgcagtaataacagtcgtcgtcatcgttgctcatcatcaaagtgt
tctgtaagcacagaagctgtttcagaagaaatgaggcaagcagagaaacaaacaacagccttac
cttcgggcctgaagaagcattagctgaacagaccgtcttccttttagCTCGAGTCACCAGGCG
(SEQ ID NO: 17).

[00142] Последовательность hCD80 в модифицированной области E1b-19k является следующей, кодирующая область представлена строчными буквами, а фланкирующие аденовирусные последовательности, включая сайты SalI и XhoI, – заглавными буквами:

GCGCCGTGGGCTAATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGACatggggccacacacggagggc
agggaaacatcaccatccaagtgctccatacctcaatttctttcagctcttggtgctggctggtct
ttctcacttctgttcaggtgttatccacgtgaccaaggaagtgaagaaagtggaacgctgtcc
tgtggtcacaatgtttctgttgaagagctggcacaaactcgcatctactggcaaaaggagaaga
aaatgggtgctgactatgatgtctggggacatgaatatatggcccgagtacaagaaccggaccat
ctttgatatcactaataacctctccattgtgatcctggctctgcgcccattctgacgaggggcaca
tacgagtggtgttgttctgaagtatgaaaaagacgctttcaagcgggaacacctggctgaagtga
cgttatcagtc aaagctgacttccctacacctagtatatctgactttgaaattccaacttctaa
tattagaaggataatttgctcaacctctggaggtttttccagagcctcacctctcctggttggaa
aatggagaagaattaaatgccatcaacacaacagttttcccaagatcctgaaactgagctctatg
ctgttagcagcaaaactggattttcaatatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagta
tggacatttaagagtgaatcagaccttcaactggaatacaaccaagcaagagcattttcctgat
aacctgctcccatcctggggccattacctaattctcagtaaatggaattttttgtgatatgctgcc
tgacctactgctttgccccaaagatgcagagagagaaggaggaatgagagattgagaagggaaag
tgtacgccctgtataaCTCGAGTCACCAGGCGCTTTTCCAAGAGAAGGTCATCAAG (SEQ ID
NO: 18).

[00143] Где указано, мышинный CD137L (mCD137L) или человеческий CD137L (hCD137L) клонировали в модифицированную

область Е3.

[00144] Последовательность mCD137L в модифицированной области Е3 является следующей, кодирующая область представлена строчными буквами, а фланкирующие аденовирусные последовательности – заглавными буквами:

ATGTTCTTTTCTCTTACAGTATGATTAAATGAGACatggaccagcacacacttgatgtg
gaggataccgcggatgccagacatccagcaggtacttcgtgccccctcggatgcggcgctcctca
gagataccggggtcctcgcggacgctgcgctcctctcagatactgtgcgccccacaaatgccgc
gctccccacggatgctgcctaccctgcggttaatgttcgggatcgcgaggccgcgtggccgcct
gcactgaacttctgtttcccgccacccaaagctctatggcctagtcgctttggttttgctgcttc
tgatcgccgcctgtgttcctatcttcacccgcaccgagcctcggccagcgctcacaaatcaccac
ctcgcccaacctgggtacccgagagaataatgcagaccaggtcacccctgtttccacattggc
tgccccaacactacacaacagggctctcctgtgttcgccaagctactgggtaaaaaccaagcat
cgttgtgcaatacaactctgaactggcacagccaagatggagctgggagctcatacctatctca
aggtctgaggtacgaagaagacaaaaaggagttggtggttagacagtcgccgggctctactacgta
tttttggaactgaagctcagtccaacattcacaaacacaggccacaaggtgcagggctgggtct
ctcttggttttgcaagcaaaagcctcaggtagatgactttgacaacttggccctgacagtggaaact
gttcccttgctccatggagaacaagttagtggaccgttcctggagtcaactgttgctcctgaag
gctggccaccgcctcagtggtggtctgagggcttatctgcatggagcccaggatgcatacagag
actgggagctgtcttatcccaacaccaccagcttttgactctttcttgtaaacccgacaaccc
atgggaatgaGGTCTCAAAGATCTTATTCCTTTAACTAATAAA (SEQ ID NO: 19).

[00145] Последовательность hCD137L в модифицированной области Е3 является следующей, кодирующая область представлена строчными буквами, а фланкирующие аденовирусные последовательности – заглавными буквами:

ATGTTCTTTTCTCTTACAGTATGATTAAATGAGACatggaatacgcctctgacgcttca
ctggacccccgaagccccgtggcctcctgcacctcgcgctcgcgcctgccgcgtactgccttggg
ccctgggtcgcggggctgctgctcctgctcctgctcgtgctgcatgcgctgtatttcttgcatg
cccatgggctgtgtctggggctcgcgcacacctgggtccgcggccagcccagactccgcgag
ggtcccagacttttcgcccagcatcccgcggcctcttgacactgcggcagggcatgtttgcgc
agctgggtggcccaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaaccaggcct
ggcaggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggcc
aaggctggagtctactatgtcttctttcaactagagctgcggcgcggtggtggccggcgagggct
caggctccgttttacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctgctggggccgcccgcct
ggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttccag
ggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgcctgggcgtccatcttcacactgaggccaggg
cacgccatgcctggcagcttaccagggcgccacagctcttgaggactcttcggggtgacccccga
aatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaataaGGTCTCAAAGATCTTATTCCTTTAAC
TAATAAA (SEQ ID NO: 20).

[00146] Кроме того, где указано, человеческий CD80 и CD137L

были клонированы в модифицированную область E1b-19k, разделенные участком внутренней посадки рибосомы (IRES). В этих случаях область E1b-19k содержала ген CD80 человека, включая стоп-кодон, затем IRES вируса энцефаломиокардита, а затем ген CD137L человека. Поскольку вставка генов CD80 и CD137L в область E1b-19k приводила к тому, что размер вирусного генома превышал пределы упаковки для аденовируса, этот вирус все еще имел делецию генов RID α , RID β и 14.7k в области E3.

[00147] Последовательность hCD80 и hCD137L в модифицированной области E1b-19k, разделенных IRES, является следующей: кодирующая область представлена строчными буквами, фланкирующие аденовирусные последовательности – заглавными буквами и центральный IRES – заглавными буквами:

[00148]

GCGCCGTGGGCTAATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGACatgggcccacacacggaggcagggga
 acatcaccatccaagtgtccatacctcaatttctttcagctcttggtgctggctggtctttctc
 acttctgttcaggtgttatccacgtgaccaaggaagtgaagaagtggcaacgctgtcctgtgg
 tcacaatgtttctgttgaagagctggcacaaactcgcactctactggcaaaaggagaagaaaatg
 gtgctgactatgatgtctgtgggacatgaatatatggcccgagtacaagaaccggaccatctttg
 atatacactaataacctctccattgtgatcctggctctgcgcccactctgacgagggcacatacga
 gtgtgtttgttctgaagtatgaaaaagacgctttcaagcgggaacacactggctgaagtgacgtta
 tcagtcaaagctgacttccctacacctagtatatctgactttgaaattccaacttctaataatta
 gaaggataatttctcaacctctggagggttttccagagcctcacctctcctgggttgaaaatgg
 agaagaattaaatgccatcaacacaacagtttcccaagatcctgaaactgagctctatgctgtt
 agcagcaaactggatttcaatatgacaaccaaccacagcttcatgtgtctcatcaagtatggac
 atttaagagtgaatcagaccttcaactggaatacaaccaagcaagagcattttcctgataacct
 gctcccatcctggggccattaccttaatctcagtaaatggaatttttgtgatatgctgcctgacc
 tactgctttgccccaaagatgcagagagagaaggaggaatgagagattgagaagggaagtgtac
 gccctgtataaTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATA
 TGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTT
 CTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
 GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCA
 GGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAC
 ACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAA
 TGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGG
 GATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAAAAAACGTCTA
 GGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATatggaatacggc
 tctgacgcttcactggacccccgaagccccgtggcctcctgcacctcgcgctcgcgctgcccgcg
 tactgccttgggccctggctcgcggggctgctgctcctgctcctgctcgcgctgctgcatgcgctgt
 atttcttgcatgcccatgggctgtgtctgtgggctcgcgcatcacctggctccgcggccagccccg

agactccgcgaggggtcccgagctttcgccccgacgatcccgccggcctcttgacactgcggcagg
gcatgtttgcgagctggtggcccaaatgttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacag
tgaccagggcctggcaggcggtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggag
ctggtggtggccaaggctggagtctactatgtctttctttcaactagagctgcggcgcggtggtgg
ccggcgaggggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctgctgg
ggccgcccgccttggtttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggcc
ttcgggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgccctgggctccatcttcaca
ctgagggccagggcagccatgcctggcagcttaccagggcgccacagtcttgggactcttccg
ggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaataaCTCGAGTCACCAGGC
GCTTTTCCAAGAGAAGGTCATCAAG (SEQ ID NO: 21).

[00149] Подробная информация о протестированных вирусах приведена в Таблице 1.

Таблица 1

Вирус	Промотор E1A	Модификация E1b-19k	Модификация E3 (RID α , RID β и 14.7k)
TAV- Δ 19k	TAV-255	Удален	Нарушен (содержит последовательность dl309)
TAV-mCD80	TAV-255	Удален и заменен мышинным CD80	Нарушен (содержит последовательность dl309)
TAV-mCD137L	TAV-255	Удален	Удален и заменен мышинным CD137L
TAV-mCD80-137L	TAV-255	Удален и заменен мышинным CD80	Удален и заменен мышинным CD137L
TAV-hCD80-137L	TAV-255	Удален и заменен человеческим CD80	Удален и заменен человеческим CD137L
TAV-hCD80-IRES-137L	TAV-255	Удален и заменен человеческим CD80, IRES и человеческим CD137L	Удален

Пример 2: Экспрессия генов CD80 и CD137L.

[00150] Этот пример описывает экспрессию генов CD80 и/или CD137L из рекомбинантных аденовирусов, полученных, как описано в Примере 1.

[00151] Клетки ADS-12 (клетки аденокарциномы легкого мыши)

инфицировали вирусами TAV-Δ19k, TAV-mCD80, TAV-mCD137L и TAV-mCD80-137L и инфицированные клетки окрашивали для обнаружения CD80 и CD137L при помощи иммуноцитохимии. Как показано на Фигуре 1 и Фигуре 2, mCD80 экспрессировался после заражения или TAV-mCD80, или TAV-mCD80-137L, а CD137L экспрессировался после заражения или TAV-mCD137L, или TAV-mCD80-137L. Важно отметить, что оба гена были экспрессированы вирусом TAV-mCD80-137L, что свидетельствует о том, что один вирус обеспечивал экспрессию двух терапевтических генов.

[00152] Клетки 4T1 (клетки карциномы молочной железы мыши) инфицировали вирусами TAV-Δ19k и TAV-mCD80-137L, и инфицированные клетки окрашивали для обнаружения CD80 и CD137L при помощи иммуноцитохимии. Как и в случае клеток ADS-12, CD80 и CD137L экспрессировались после инфицирования TAV-mCD80-137L (Фигура 3 и Фигура 4).

[00153] Клетки A549 (клетки карциномы легкого человека), клетки WI-38 (нераковые фибробласты легкого человека) и клетки MRC5 (нераковые фибробласты легкого человека) инфицировали вирусами TAV-Δ19k и TAV-hCD80-137L и инфицированные клетки окрашивали для обнаружения CD80 и CD137L при помощи иммуноцитохимии. Как показано на Фигуре 5, вирус TAV-hCD80-137L индуцировал экспрессию человеческого CD80 и человеческого CD137L в раковых клетках A549 с минимальной или отсутствующей экспрессией в незлокачественных клетках WI-38 и MRC5. Эти результаты демонстрируют, что двойная экспрессия трансгена может быть достигнута как в человеческих, так и в мышинных клетках, и что экспрессия трансгена может быть селективной для раковых клеток.

[00154] Клетки A549 (клетки карциномы легких человека) инфицировали вирусами TAV-Δ19k и TAV-hCD80-IRES-137L, и инфицированные клетки окрашивали для обнаружения CD80 и CD137L при помощи иммуноцитохимии. Как показано на Фигуре 6, вирус TAV-hCD80-IRES-137L индуцировал экспрессию человеческого CD80 и человеческого CD137L в раковых клетках A549. Эти результаты демонстрируют, что двойная экспрессия трансгена может быть достигнута путем встраивания обоих трансгенов в одну область генома, например область E1b-19k, разделенную участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

Пример 3: Цитотоксичность аденовирусов, экспрессирующих CD80 и CD137L

[00155] В этом примере описана цитотоксичность рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих CD80 и CD137L, полученных, как описано в Примере 1.

[00156] Клетки A549 (клетки карциномы легкого человека), клетки WI-38 (нераковые фибробласты легкого человека) и клетки MRC5 (нераковые фибробласты легкого человека) инфицировали вирусами TAV-Δ19k и TAV-hCD80-137L и инфицированные клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым, который окрашивал жизнеспособные клетки в синий цвет, в указанные моменты времени после заражения.

[00157] Как показано на Фигуре 7, TAV-hCD80-137L был литическим в клетках A549, но не в клетках WI-38 или MRC5. Эти результаты показывают, что вирус TAV-hCD80-137L может избирательно лизировать раковые клетки по сравнению с незлокачественными клетками.

[00158] Клетки ADS-12 инфицировали вирусами TAV-Δ19k, TAV-mCD80, TAV-mCD137L и TAV-mCD80-137L, и инфицированные клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым, который окрашивает жизнеспособные клетки синим цветом, в указанные моменты времени после заражения. Результаты, приведенные на Фигуре 8, демонстрируют, что вирусы TAV-mCD80, TAV-mCD137L и TAV-mCD80-137L могут избирательно лизировать раковые клетки по сравнению с незлокачественными клетками.

Пример 4: Репликация аденовирусов, экспрессирующих CD80 и CD137L

[00159] Этот пример описывает репликацию в клетках рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих CD80 и CD137L, полученных, как описано в Примере 1, в раковых клетках.

[00160] Клетки ADS инфицировали в трех повторностях вирусами TAV-Δ19k, TAV-CD80, TAV-CD137L и TAV-CD80-137L при МЗ равной 1. Клетки и среды собирали через пять дней после заражения, и титр вируса определяли при помощи анализа бляшкообразования.

[00161] Как показано на Фигуре 9, вирусы могут эффективно реплицироваться в раковых клетках.

Пример 5: Противораковая активность аденовирусов, экспрессирующих CD80 и CD137L

[00162] В этом примере описана противораковая активность рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих CD80 и/или CD137L, полученных, как описано в Примере 1.

[00163] Мышей 129S4 с опухолями ADS-12 лечили тремя внутриопухолевыми инъекциями TAV-Δ19k, TAV-mCD80, TAV-mCD137L или TAV-mCD80-137L. Результаты представлены на Фигуре 10. Мыши, получавшие TAV-mCD80, имели сравнимый рост опухоли с мышами, получавшими TAV-Δ19k. У мышей, получавших TAV-mCD137L, наблюдалась тенденция к уменьшению размера опухоли, которая не достигала статистической значимости, а опухоли мышей, получавших TAV-mCD80-137L, были значительно меньше. Эти результаты показывают, что аденовирус с двумя генами, экспрессирующий CD80 и 137L, был наиболее эффективным в уменьшении размера опухоли.

[00164] В отдельном эксперименте мышей 129S4 с опухолями ADS-12 лечили тремя внутриопухолевыми инъекциями TAV-Δ19k, TAV-mCD80, TAV-mCD137L или TAV-mCD80-137L. Результаты представлены на Фигуре 11. Мыши, получавшие TAV-mCD80-137L, имели меньший размер опухоли. Эти результаты показывают, что аденовирус с двумя генами, экспрессирующий CD80 и 137L, был наиболее эффективным в уменьшении размера опухоли.

[00165] Мышей линии BALB/c, с опухолями 4T1, ортотопически имплантированными в жировую подушку молочной железы, лечили тремя внутриопухолевыми дозами TAV-Δ19k или TAV-mCD80-137L. И снова, мыши, получавшие TAV-mCD80-137L, имели значительно меньшие размеры опухолей, чем мыши, получавшие контрольный вирус TAV-Δ19k (Фигура 12).

Пример 6: Конструирование аденовируса, экспрессирующего CD80, CD137L и ICAM-1

[00166] В этом примере описывается получение рекомбинантного аденовируса типа 5 (Ad5), который экспрессирует мышинные формы CD80, CD137L и ICAM-1. ICAM-1 представляет собой молекулу внутриклеточной адгезии, которая экспрессируется антигенпрезентирующими клетками (АПК) и стабилизирует взаимодействия между АПК и Т-клетками путем связывания с LFA1 на поверхности Т-клеток.

[00167] Был сконструирован вирус аденовируса типа 5, который имеет делецию нуклеотидной области, расположенной от -304 до -255 нуклеотидов перед сайтом инициации E1a, что делает экспрессию E1a селективной по отношению к раку (как описано ранее в патенте США No. 9073980). Полученный вирус далее именуется TAV.

[00168] TAV был дополнительно модифицирован, чтобы иметь сайт SalI в старт-сайте области E1b-19k и сайт XhoI через 200

пар оснований после 3'-конца сайта SalI для облегчения вставки терапевтических трансенов. Нуклеотидная последовательность модифицированной области E1b-19k является следующей, с подчеркнутыми остаточными основаниями из слитых сайтов SalI и XhoI:

ATCTTGGTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTTCCAA (SEQ ID NO: 15).

[00169] TAV был дополнительно модифицирован для удаления генов аденовирусного белка смерти (ADP), RID α , RID β и 14.7k из области E3. Нуклеотидная последовательность модифицированной области E3 является следующей, с дефисом, указывающим место делеции:

TTATTGAGGAAAAGAAAATGCCTTAA-TAAAAAAAATAATAAGCATCACTTAC (SEQ ID NO: 24).

[00170] TAV был дополнительно модифицирован для удаления области E4 за исключением E4-ORF6/7. Нуклеотидная последовательность модифицированной области E4 является следующей с дефисом, указывающим место делеции:

GAACGCCGACGTCATGTCAT-AACAGTCAGCCTTACCAGTAAA (SEQ ID NO: 25).

[00171] Кодированная белок область мышиного CD80 (mCD80), за которой следуют IRES EMCV, за которой следует кодирующая белок область мышиного CD137L (mCD137L), за которой следуют IRES FMDV, за которой следует кодирующая белок область мышиного ICAM-1. (mICAM-1) была клонирована в сайт E1b-19k. Полученный вирус далее называется TAV-mCD80-137L-ICAM.

[00172] Нуклеотидная последовательность вставки mCD80-EMCV IRES-137L-FMDV IRES-ICAM в область E1b-19k является следующей образом, где кодирующие области обозначены заглавными буквами, IRESs обозначены строчными буквами, а фланкирующая E1b-19k последовательность, включающая сайты рестрикции SalI и XhoI, подчеркнута:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCA
 AGTTTCCATGTCCAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTTCGTCTTTCACAAGTGTCTTC
 AGATGTTGATGAACAACGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAAC
 TCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAGTGGTGCTGT
 CTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGTGGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACAC
 TACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGGTCTTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCTGTT
 CAAAAGAAGGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAG
 CTGACTTCTCTACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
 CTGCTTTGCTTCCGGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGAAAATGGAAGAGAATTA

CCTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTGTACACCATTAGTAGCCAAC
 TAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGTGTCTCATTAAATATGGAGATGCTCACGT
 GTCAGAGGACTTCACCTGGGAAAAACCCCCAGAAGACCCTCCTGATAGCAAGAACACACTTGTG
 CTCTTTGGGGCAGGATTCGGCGCAGTAATAACAGTCGTCGTCATCGTTGTCATCATCAAATGCT
 TCTGTAAGCACAGAAGCTGTTTCAGAAGAAATGAGGCAAGCAGAGAAACAAACAACAGCCTTAC
 CTTTCGGGCCTGAAGAAGCATTAGCTGAACAGACCGTCTTCCTTTAGtaacgttactggccgaag
 ccgcttggaataaggccggtgtgctgttctatatgttattttccaccatattgccgtctttt
 ggcaatgtgagggcccggaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccc
 ctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttc
 ttgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcagcggaacccccacctggcgacagg
 tgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgcc
 acgttgtgagttggatagttgtggaagagtcaaattggctctcctcaagcgtattcaacaaggg
 gctgaaggatgccagaaggtaccccatgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgc
 ttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggtttt
 cctttgaaaaacacgatgataatATGGACCAGCACACACTTGATGTGGAGGATACCGCGGATGC
 CAGACATCCAGCAGGTACTTCGTGCCCCCTCGGATGCGGCGCTCCTCAGAGATAACGGGCTCCTC
 GCGGACGCTGCGCTCCTCTCAGATACTGTGCGCCCCACAAATGCCGCGCTCCCCACGGATGCTG
 CCTACCCTGCGGTTAATGTTTCGGGATCGCGAGGCCGCGTGGCCGCCTGCACTGAACTTCTGTTC
 CCGCCACCCAAAGCTCTATGGCCTAGTCGCTTTGGTTTTGCTGCTTCTGATCGCCGCTGTGTT
 CCTATCTTCACCCGCACCGAGCCTCGGCCAGCGCTCACAATCACACCTCGCCAACCTGGGTA
 CCCGAGAGAATAATGCAGACCAGGTCACCCCTGTTTCCACATTGGCTGCCCCAACACTACACA
 ACAGGGCTCTCCTGTGTTCGCCAAGCTACTGGCTAAAAACCAAGCATCGTTGTGCAATACAAC
 CTGAACTGGCACAGCCAAGATGGAGCTGGGAGCTCATACCTATCTCAAGGTCTGAGGTACGAAG
 AAGACAAAAAGGAGTTGGTGGTAGACAGTCCCGGGCTCTACTACGTATTTTTGGAACCTGAAGCT
 CAGTCCAACATTCACAAACACAGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTCTCTCTTGTTTTGCAAGCA
 AAGCCTCAGGTAGATGACTTTGACAACTTGGCCCTGACAGTGGAACGTTCCTTGCTCCATGG
 AGAACAAGTTAGTGGACCGTTTCTGGAGTCAACTGTTGCTCCTGAAGGCTGGCCACCGCCTCAG
 TGTGGGTCTGAGGGCTTATCTGCATGGAGCCCAGGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTCTTAT
 CCAACACACCAGCTTTGGACTCTTTCTTGTGAAACCCGACAACCCATGGGAATGAaggtttcc
 acaactgataaaaactcgtgcaacttgaaactccgcctgggtctttccagggtctagaggggttaca
 ctttgtactgtgctcgactccacgcccgggtccactggcgggtgttagtagcagcactgttgttt
 cgtagcggagcatggtggccgtgggaactcctccttggtgacaagggcccacggggccgaaagc
 cacgtccagacggacccaccatgtgtgcaaccccagcacggcaacttttactgcgaacaccacc
 ttaaggtgacactggtactggtactcggtcactggtgacaggctaaggatgcccttcaggtacc
 ccgaggtaacacgggacactcgggatctgagaaggggattgggacttctttaaaagtgccagt
 ttaaaaagcttctacgcctgaataggcgaccggaggccggcgctttccattaccactactaa
 atccATGGCTTCAACCCGTGCCAAGCCCACGCTACCTCTGCTCCTGGCCCTGGTCACCGTTGTG
 ATCCCTGGGCCTGGTGATGCTCAGGTATCCATCCATCCCAGAGAAGCCTTCCTGCCCCAGGGTG
 GGTCCGTGCAGGTGAACTGTTCTTCCTCATGCAAGGAGGACCTCAGCCTGGGCTTGAGACTCA
 GTGGCTGAAAGATGAGCTCGAGAGTGGACCCAACCTGGAAGCTGTTTGAGCTGAGCGAGATCGGG

GAGGACAGCAGTCCGCTGTGCTTTGAGAACTGTGGCACCGTGCAGTCGTCCGCTTCCGCTACCA
 TCACCGTGTATTTCGTTTTCCGGAGAGTGTGGAGCTGAGACCTCTGCCAGCCTGGCAGCAAGTAGG
 CAAGGACCTCACCTTGCCTGCCACGTGGATGGTGGAGCACCGCGGACCCAGCTCTCAGCAGTG
 CTGCTCCGTGGGGAGGAGATACTGAGCCGCCAGCCAGTGGGTGGGCACCCCAAGGACCCCAAGG
 AGATCACATTACAGGTGCTGGCTAGCAGAGGGGACCACGGAGCCAATTTCTCATGCCGCACAGA
 ACTGGATCTCAGGCCGCAAGGGCTGGCATTGTTCTCTAATGTCTCCGAGGCCAGGAGCCTCCGG
 ACTTTTCGATCTTCCAGCTACCATCCCAAAGCTCGACACCCCTGACCTCCTGGAGGTGGGCACCC
 AGCAGAAGTTGTTTTGCTCCCTGGAAGGCCTGTTTCCTGCCTCTGAAGCTCGGATATACCTGGA
 GCTGGGAGGCCAGATGCCGACCCAGGAGAGCACAAACAGCAGTGACTCTGTGTACGCCACTGCC
 TTGGTAGAGGTGACTGAGGAGTTCGACAGAACCCTGCCGCTGCGCTGCGTTTTTGGAGCTAGCGG
 ACCAGATCCTGGAGACGCAGAGGACCTTAACAGTCTACAACCTTTTCAGCTCCGGTCTTGACCCT
 GAGCCAGCTGGAGGTCTCGGAAGGGAGCCAAGTAACTGTGAAGTGTGAAGCCACAGTGGGTCTG
 AAGGTGGTTCTTCTGAGCGGCGTCGAGCCTAGGCCACCCACCCCGCAGGTCCAATTCACACTGA
 ATGCCAGCTCGGAGGATCACAAACGAAGCTTCTTTTGCTCTGCCGCTCTGGAGGTGGCGGGAAA
 GTTCCTGTTTAAAAACCAGACCCTGGAAGTGCACGTGCTGTATGGTCCTCGGCTGGACGAGACG
 GACTGCTTGGGGAAGTGGACCTGGCAAGAGGGGTCTCAGCAGACTCTGAAATGCCAGGCCTGGG
 GGAACCCATCTCCTAAGATGACCTGCAGACGGAAGGCAGATGGTGCCCTGCTGCCCATCGGGGT
 GGTGAAGTCTGTCAAACAGGAGATGAATGGTACATACGTGTGCCATGCCTTTAGCTCCCATGGG
 AATGTCACCAGGAATGTGTACCTGACAGTACTGTACCACTCTCAAAATAACTGGACTATAATCA
 TTCTGGTGCCAGTACTGCTGGTCATTGTGGGCCTCGTGATGGCAGCCTCTTATGTTTATAACCG
 CCAGAGAAAGATCAGGATATACAAGTTACAGAAGGCTCAGGAGGAGGCCATAAACTCAAGGGA
 CAAGCCCCACCTCCCTGACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID NO: 26).

[00173] Дополнительно, кодирующая белок область человеческого CD80 (hCD80), за которой следуют IRES EMCV, за которой следует кодирующая белок область человеческого CD137L (hCD137L), за которой следуют IRES FMDV, за которой следует кодирующая белок область человеческого ICAM-1 (hICAM-1) клонировали в сайт E1b-19k. Полученный вирус далее называется TAV-hCD80-137L-ICAM.

[00174] Нуклеотидная последовательность вставки hCD80-EMCV IRES-137L-FMDV IRES-ICAM в области E1b-19k является следующей, где кодирующие области обозначены заглавными буквами, IRESs обозначены строчными буквами, а фланкирующая E1b-19k последовательность включающая сайты рестрикции SalI и XhoI, подчеркнута:

ATCTGACCTCGTCGACATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTC
 CATACCTCAATTTCTTTTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAGGTGTTAT
 CCACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAA
 GAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTG
 GGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTC

CATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTAT
 GAAAAAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCC
 CTACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAAC
 CTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAAATGCCATC
 AACACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCA
 ATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGAC
 CTTCAACTGGAATACAACCAAGCAAGAGCATTTTTCTTGATAACCTGCTCCCATCCTGGGCCATT
 ACCTTAATCTCAGTAAATGGAATTTTTGTGATATGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCCCCAAGAT
 GCAGAGAGAGAAGGAGGAATGAGAGATTGAGAAGGGAAAGTGTACGCCCTGTATAAaactgta
 ctggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgctgtttgtctatatgtttatccccaccatatt
 gccgtcttttggaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctagg
 ggtctttccctctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaaatgtcgtgaaggaagcagttcctc
 tggaagcttcttgaaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcagcggaacccccacc
 tggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaa
 cccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaattggctctcctcaagcgtat
 tcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcg
 gtgcacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacgggg
 acgtgggttttcctttgaaaaacacgatgataatATGGAATACGCCTCTGACGCTTCACTGGACC
 CCGAAGCCCCGTGGCCTCCTGCACCTCGCGCTCGCGCCTGCCGCGTACTGCCTTGGGCCCTGGT
 CGCGGGGCTGCTGCTCCTGCTCCTGCTCGCTGCTGCATGCGCTGTATTTCTTGCATGCCCATGG
 GCTGTGTCTGGGGCTCGCGCATCACCTGGCTCCGCGGCCAGCCCGAGACTCCGCGAGGGTCCCCG
 AGCTTTCGCCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGT
 GGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGCCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGC
 GTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTG
 GAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTC
 CGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCTTTG
 ACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACCTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCT
 TGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCA
 TGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCA
 GCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAATAAggtttccacaactgataaaactcgtgcaacttga
 aactccgcctggtctttccaggtctagaggggttacactttgtactgtgctcgactccacgccc
 ggtccactggcggtgttagtagcagcactgttgtttcgtagcggagcatggtggccgtgggaa
 ctctctcttggtgacaagggccacggggccgaaagccacgtccagacggacccaccatgtgtg
 caaccccagcacggcaacttttactgcaacaccaccttaaggtgacactggtactggtactcg
 gtcactggtgacaggctaaggatgcccttcaggtacccccgaggtaacacgggacactcgggatc
 tgagaaggggattgggacttctttaaaagtgtccagtttaaaaagcttctacgcctgaataggc
 gaccggaggccggcgccctttccattaccactactaaatccATGGCTCCCAGCAGCCCCCGGCC
 CGCGCTGCCCGCACTCCTGGTCCTGCTCGGGGCTCTGTTCCCAGGACCTGGCAATGCCCAGACA
 TCTGTGTCCCCCTCAAAAGTCATCCTGCCCCGGGGAGGCTCCGTGCTGGTGACATGCAGCACCT
 CCTGTGACCAGCCCAAGTTGTTGGGCATAGAGACCCCGTTGCCTAAAAAGGAGTTGCTCCTGCC

TGGGAACAACCGGAAGGTGTATGAACTGAGCAATGTGCAAGAAGATAGCCAACCAATGTGCTAT
TCAAACCTGCCCTGATGGGCAGTCAACAGCTAAAACCTTCCTCACCGTGTACTGGACTCCAGAAC
GGGTGGAACCTGGCACCCCTCCCCTCTTGGCAGCCAGTGGGCAAGAACCTTACCCTACGCTGCCA
GGTGGAGGGTGGGGCACCCCGGGCCAACCTCACCGTGGTGCTGCTCCGTGGGGAGAAGGAGCTG
AAACGGGAGCCAGCTGTGGGGGAGCCCGCTGAGGTCACGACCACGGTGCTGGTGAGGAGAGATC
ACCATGGAGCCAATTTCTCGTGCCGCACTGAACTGGACCTGCGGCCCCAAGGGCTGGAGCTGTT
TGAGAACACCTCGGCCCCCTACCAGCTCCAGACCTTTGTCTGCCAGCGACTCCCCACAACCTT
GTCAGCCCCCGGGTCTTAGAGGTGGACACGCAGGGGACCGTGGTCTGTTCCCTGGACGGGCTGT
TCCCAGTCTCGGAGGCCAGGTCCACCTGGCACTGGGGGACCAGAGGTTGAACCCACAGTCAC
CTATGGCAACGACTCCTTCTCGGCCAAGGCCTCAGTCAGTGTGACCGCAGAGGACGAGGGCACC
CAGCGGCTGACGTGTGCAGTAATACTGGGGAACCCAGAGCCAGGAGACACTGCAGACAGTGACCA
TCTACAGCTTTCCGGCGCCCAACGTGATTCTGACGAAGCCAGAGGTCTCAGAAGGGACCGAGGT
GACAGTGAAGTGTGAGGCCACCCCTAGAGCCAAGGTGACGCTGAATGGGGTTCCAGCCCAGCCA
CTGGGCCCCGAGGGCCCAGCTCCTGCTGAAGGCCACCCAGAGGACAACGGGCGCAGCTTCTCCT
GCTCTGCAACCTGGAGGTGGCCGGCCAGCTTATACACAAGAACCAGACCCGGGAGCTTCTGTGT
CCTGTATGGCCCCCGACTGGACGAGAGGGATTGTCCGGGAAACTGGACGTGGCCAGAAAATTCC
CAGCAGACTCCAATGTGCCAGGCTTGGGGGAACCCATTGCCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGATG
GCACTTTCCCACTGCCCATCGGGGAATCAGTGAAGTGTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCT
CTGTCCGGGCCAGGAGCACTCAAGGGGAGGTACCCCGCAAGGTGACCGTGAATGTGCTCTCCCCC
CGGTATGAGATTGTCATCATCACTGTGGTAGCAGCCGAGTCATAATGGGCACTGCAGGCCTCA
GCACGTACCTCTATAACCGCCAGCGGAAGATCAAGAAATACAGACTACAACAGGCCCAAAAAGG
GACCCCCATGAAACCGAACACACAAGCCACGCCTCCCTGACTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID
NO: 31).

Пример 7: Экспрессия генов CD80, CD137L и ICAM-1

[00175] Этот пример описывает экспрессию CD80, CD137L и ICAM-1 из рекомбинантного аденовируса, полученного, как описано в Примере 6.

[00176] Клетки ADS-12 (клетки аденокарциномы легкого мыши) инфицировали вирусом TAV-mCD80-137L-ICAM при МЗ равной 10 или использовали в качестве неинфицированных контролей и окрашивали через четыре дня после заражения для обнаружения CD80, CD137L и ICAM-1 при помощи иммуноцитохимии. Как показано на Фигуре 13, каждый ген экспрессировался вирусом TAV-mCD80-137L-ICAM, демонстрируя, что один вирус обеспечивал экспрессию трех терапевтических генов.

[00177] Клетки F244 (клетки саркомы мыши) инфицировали вирусом TAV-mCD80-137L-ICAM при МЗ равной 5 или использовали в качестве неинфицированных контролей и окрашивали через три дня после заражения для обнаружения CD80, CD137L и ICAM-1 при помощи иммуноцитохимии. Как показано на Фигуре 14, каждый ген

экспрессировался вирусом TAV-mCD80-137L-ICAM, демонстрируя, что один вирус обеспечивал экспрессию трех терапевтических генов.

[00178] HT29 (клетки колоректальной аденокарциномы человека) инфицировали вирусом TAV-mCD80-mCD137L-mICAM-1 при МЗ равной 5 или использовали в качестве неинфицированных контролей и окрашивали через три дня после заражения для обнаружения CD80, CD137L и ICAM-1 при помощи иммуноцитохимии. Как показано на Фигуре 15, каждый ген экспрессировался вирусом TAV-mCD80-137L-ICAM, демонстрируя, что один вирус обеспечивал экспрессию трех терапевтических генов.

Пример 8: Противораковая активность аденовирусов, экспрессирующих CD80, CD137L и ICAM-1

[00179] Этот пример описывает противораковую активность рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих CD80 и CD137L, и аденовирусов, экспрессирующих CD80, CD137L и ICAM-1.

[00180] Мышей 129S4, несущих опухоли ADS-12, лечили тремя внутриопухолевыми инъекциями буфера, TAV-mCD80-137L (полученного, как описано в Примере 1), или TAV-mCD80-137L-ICAM (полученного, как описано в Примере 6). Результаты представлены на Фигуре 16. Опухоли у мышей, получавших TAV-mCD80-137L, были меньше, чем опухоли у мышей, получавших буфер. Опухоли у мышей, получавших TAV-mCD80-137L-ICAM, были меньше, чем опухоли у мышей, получавших TAV-mCD80-m137L или буфер, при этом у многих мышей наблюдалась полная потеря объема опухоли. Эти результаты показывают, что вирусы, экспрессирующие CD80 и 137L, и вирусы, экспрессирующие CD80, CD137L и mICAM-1, эффективны в уменьшении размера опухоли.

Пример 9: Конструирование аденовирусов, экспрессирующих эндостатин и ангиостатин

[00181] Этот пример описывает конструирование рекомбинантного аденовируса типа 5 (Ad5), который экспрессирует эндостатин и ангиостатин.

[00182] Плазмиду, несущую 5'-часть геномной последовательности аденовируса типа 5, модифицировали так, чтобы она несла делецию нуклеотидной области, расположенной от -304 до -255 нуклеотидов перед сайтом инициации E1a, что делает экспрессию E1a селективной по отношению к раку (как описано ранее в патенте США No. 9073980). Модифицированная плазмида в дальнейшем именуется как плазмида TAV, и любые полученные в результате вирусные частицы, полученные из нее, далее именуется

как вирус TAV.

[00183] Плазмиду TAV дополнительно модифицируют, чтобы иметь сайт SalI в старт-сайте области E1b-19k и сайт XhoI через 200 пар оснований после 3'-конца сайта SalI для облегчения вставки терапевтических трансенов. Для удаления 200 пар оснований из области E1b-19k плазмиду разрезали эндонуклеазами рестрикции SalI и XhoI и подвергали самолигированию. Нуклеотидная последовательность модифицированной области E1b-19k является следующей, с подчеркнутыми остаточными основаниями из слитых сайтов SalI и XhoI:

ATCTTG GTTACATCTGACCTCGTCGAGTCACCAGGCGCTTTTCCAA (SEQ ID NO: 15).

[00184] Кроме того, нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотные остатки 1-23 человеческого коллагена XVIII (соответствующие сигнальному пептиду), за которыми следуют остатки 1318-1516 человеческого коллагена XVIII (соответствующие С-концевому фрагменту), за которыми следует IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) с последующей нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотные остатки 1-19 человеческого плазминогена (соответствующие сигнальному пептиду), за которыми следуют остатки 97-549 человеческого плазминогена (соответствующего крингл-доменам 1-5), клонировали в модифицированную область E1b-19k. Все номера аминокислотных остатков человеческого коллагена XVIII относятся к референсной последовательности NCBI: NP_085059.2, приведенной здесь как SEQ ID NO: 33. Все номера аминокислотных остатков плазминогена человека относятся к референсной последовательности NCBI: NP_000292.1, приведенной здесь как SEQ. ID NO: 34. Модифицированная плазида в дальнейшем именуется как плазида TAV-hndo-IRES-hAng, и любые полученные в результате вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как вирус TAV-hndo-IRES-hAng. Нуклеотидная последовательность плазмиды TAV-hEndo-IRES-hAng в области E1b-19k является следующей, где кодирующие области обозначены заглавными буквами, IRES обозначен строчными буквами, а фланкирующая E1b-19k последовательность, включающая сайты рестрикции SalI и XhoI, подчеркнута:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCTACCCCTGTGGCTGCCACATCCTGCTGCTGCTCT
TCTGCTGCCTGGCGGCTGCCCCGGGCCAGCTCCTACGTGCACCTGCGGCCGGCGGACCCACAAG
CCCCCCCCACAGCCACCGCGACTTCCAGCCGGTGCTCCACCTGGTTGCGCTCAACAGCCCC
CTGTCAGGCGGCATGCGGGGCATCCGCGGGGCCGACTTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGGCCC

TGGGGCTGGCGGGCACCTTCCGCGCCTTCCTGTCCTCGCGCCTGCAGGACCTGTACAGCATCGT
 GCGCCGTGCCGACCGCGCAGCCGTGCCCATCGTCAACCTCAAGGACGAGCTGCTGTTTCCCAGC
 TGGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTCTGAGGGTCCGCTGAAGCCCGGGGCACGCATCTTCTCCTTTG
 ACGGCAAGGACGTCCTGAGGCACCCACCTGGCCCCAGAAGAGCGTGTGGCATGGCTCGGACCC
 CAACGGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTACTGTGAGACGTGGCGGACGGAGGCTCCCTCGGCCACG
 GGCCAGGCCTCCTCGCTGCTGGGGGGCAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGCGAGCTGCCATCACG
 CCTACATCGTGCTCTGCATTGAGAACAGCTTCATGACTGCCTCCAAGTAGtaacggttactggcc
 gaagccgcttggaataaggccggtgtgcggtttgtctatatgttattttccaccatattgcccgtc
 ttttggaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctt
 tcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaag
 cttcttgaagacaaacaacgtctgttagcgaccctttgcaggcagcggaacccccacctggcga
 caggtgcctctgcgggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccag
 tgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaattggctctcctcaagcgatttcaaca
 aggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcac
 atgctttacatgtgttttagtgcaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtgg
 ttttcctttgaaaaacacgatgataatATGGAACATAAGGAAGTGGTTCTTCTACTTCTTTTAT
 TTCTGAAATCAGGTCAAGGAAAAGTGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGGGAATGGAAAGAACTA
 CAGAGGGACGATGTCCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTTCCACTTCTCCC
 CACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACACACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAGAACTACTGCAGGA
 ATCCAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTGCTATACTACTGATCCAGAAAAGAGATATGACTA
 CTGCGACATTCTTGAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACCTATGACGGCAAA
 ATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCACACGCTCATG
 GATACATTCTTCCAAATTTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAATTACTGTGTAACCCCGATAG
 GGAGCTGCGGCCTTGGTGTTTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGTGACATCCCC
 CGCTGCACAACACCTCCACCATCTTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAA
 ACTATCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCACTGGAGTGCACAGAC
 CCCTCACACACATAACAGGACACCAGAAAACCTTCCCCTGCAAAAATTTGGATGAAAACCTACTGC
 CGCAATCCTGACGGAAAAAGGGCCCCATGGTGCCATAACAACCAACAGCCAAGTGCGGTGGGAGT
 ACTGTAAGATAACCGTCCTGTGACTCCTCCCCAGTATCCACGGAACAATTGGCTCCCACAGCACC
 ACCTGAGCTAACCCCTGTGGTCCAGGACTGCTACCATGGTGATGGACAGAGCTACCGAGGCACA
 TCCTCCACCACCACACAGGAAAGAAGTGTGAGTCTTGGTCATCTATGACACCACACCGGCACC
 AGAAGACCCCAGAAAACCTACCCAAATGCTGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGC
 CGATAAAGGCCCTTGGTGTTTTACCACAGACCCACGCGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGAAA
 AAATGCTCAGGAACAGAAGCGAGTGTTGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTTCCAGATGTAG
 AGACTCCTTCCGAAGAAGACTGTATGTTTGGGAATGGGAAAGGATACCGAGGCAAGAGGGCGAC
 CACTGTTACTGGGACGCCATGCCAGGACTGGGCTGCCAGGAGCCCCATAGACACAGCATTTTC
 ACTCCAGAGACAAATCCACGGGCGGGTCTGGAAAAAAATTAAGTCCGTAACCCCTGATGGTGATG
 TAGGTGGTCCCTGGTGCTACACGACAAATCCAAGATAGCTCGAGTCACCAGGCG (SEQ ID
 NO: 35) .

[00185] Кроме того, нуклеотидную последовательность,

кодирующую аминокислотные остатки 1-26 мышинового коллагена XVIII (соответствующие сигнальному пептиду), за которыми следуют остатки 1577-1774 мышинового коллагена XVIII (соответствующие С-концевому фрагменту), за которыми следует IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV) с последующей нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотные остатки 1-19 мышинового плазминогена (соответствующие сигнальному пептиду), за которыми следуют остатки 96-549 мышинового плазминогена (соответствующие крингл-доменам 1-5), клонировали в модифицированную область E1b-19k. Модифицированная плазмида в дальнейшем именуется как плазмида TAV-Endo-IRES-Ang, а любые производные вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как вирус TAV-Endo-IRES-Ang. Нуклеотидная последовательность плазмиды TAV-Endo-IRES-Ang в области E1b-19k является следующей, где кодирующие области обозначены заглавными буквами, IRES обозначен строчными буквами, а фланкирующая E1b-19k последовательность, включающая сайты рестрикции SalI и XhoI, подчеркнута:

ATCTGACCTCGTCGACATGGCTCCCGACCCAGCAGACGCCTCTGCCTGCTGCTGCTGT
TGCTGCTCTCCTGCCGCCTTGTGCCTGCCAGCGCTTATGTGCACCTGCCGCCAGCCCGCCCCAC
CCTCTCACTTGCTCATACTCATCAGGACTTTCAGCCAGTGCTCCACCTGGTGGCACTGAACACC
CCCCTGTCTGGAGGCATGCGTGGTATCCGTGGAGCAGATTTCCAGTGCTTCCAGCAAGCCCGAG
CCGTGGGGCTGTGCGGCACCTTCCGGGCTTTCTGTCTCTAGGCTGCAGGATCTCTATAGCAT
CGTGCGCCGTGCTGACCGGGGTCTGTGCCCATCGTCAACCTGAAGGACGAGGTGCTATCTCCC
AGCTGGGACTCCCTGTTTTCTGGCTCCCAGGGTCAACTGCAACCCGGGGCCCGCATCTTTTCTT
TTGACGGCAGAGATGTCCTGAGACACCCAGCCTGGCCGCAGAAGAGCGTATGGCACGGCTCGGA
CCCCAGTGCGGAGGCTGATGGAGAGTTACTGTGAGACATGGCGAACTGAACTACTGGGGCT
ACAGGTCAGGCCTCCTCCCTGCTGTCAGGCAGGCTCCTGGAACAGAAAGCTGCGAGCTGCCACA
ACAGCTACATCGTCCTGTGCATTGAGAATAGCTTCATGACCTCTTTCTCCAAATAGtaacgtta
ctggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtttatccccaccatatt
gccgtcttttggaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctagg
ggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaaatgtcgtgaaggaagcagttcctc
tggaagcttcttgaaagacaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcagcggaacccccacc
tggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcaca
ccccagtgccacgttgtagtgatgttgatagttgtggaaagagtcaaattggctctcctcaagcgtat
tcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcg
gtgcacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacgggg
acgtgggttttccctttgaaaaacacgatgataatATGGACCACAAGGAAGTAATCCTTCTGTTTC
TCTTGCTTCTGAAACCAGGACAAGGGAAGAGAGTGTATCTGTCAGAAATGTAAGACCGGCATCGG
CAACGGCTACAGAGGAACAATGTCCAGGACAAAGAGTGGTGTTCCTGTCAAAAGTGGGGTGCC

ACGTTCCCCCACGTACCCAACTACTCTCCCAGTACACATCCCAATGAGGGACTAGAAGAAAATT
 ACTGTAGGAACCCAGACAATGATGAACAAGGGCCTTGGTGCTACACTACAGATCCGGACAAGAG
 ATATGACTACTGCAACATTTCCTGAATGTGAAGAAGAATGCATGTACTGCAGTGGCGAAAAGTAT
 GAGGGGAAAATCTCCAAGACCATGTCTGGACTTGAAGTCCAGGCCTGGGATTCTCAGAGCCCAC
 ATGCTCATGGATACATCCCTGCCAAATTCCTCAAGCAAGAACCTGAAGATGAATTTATGCCGCAA
 CCCTGACGGGGAGCCAAGGCCCTGGTGCTTCACAACAGACCCACCAAACGCTGGGAATACTGT
 GACATCCCCCGCTGCACAACACCCCGCCCCACCCAGCCCAACCTACCAATGTCTGAAAGGAA
 GAGGTGAAAATTACCGAGGGACCGTGTCTGTCACCGTGTCTGGGAAAACCTGTCAGCGCTGGAG
 TGAGCAAACCCCTCATAGGCACAACAGGACACCAGAAAATTTCCCCTGCAAAAATCTGGAGGAG
 AATTACTGCCGGAACCCGGATGGAGAACTGCTCCCTGGTGCTATACCACTGACAGCCAGCTGA
 GGTGGGAGTACTGTGAGATTCCATCCTGCGAGTCCTCAGCATCACCAGACCAGTCAGATTCCTC
 AGTTCCACCAGAGGAGCAAACACCTGTGGTCCAGGAATGCTACCAGAGCGATGGGCAGAGCTAT
 CGGGGTACATCGTCCACTACCATCACAGGGAAGAAGTGCCAGTCCTGGGCAGCTATGTTTCCAC
 ATAGGCATTCGAAGACGCCAGAGAACTTCCCAGATGCTGGCTTGGAGATGAACTATTGCAGGAA
 CCCGGATGGTGACAAGGGGCCCTTGGTGCTACACCACTGACCCGAGCGTCAGGTGGGAATACTGC
 AACCTGAAGCGGTGCTCAGAGACAGGAGGGAGTGTTGTGGAATTGCCACAGTTTCCCAGGAAC
 CAAGTGGGCCGAGCGACTCTGAGACAGACTGCATGTATGGGAATGGCAAAGACTACCGGGGCAA
 AACGGCCGTCCTGTCAGCTGGCACCCCTTGCCAAGGATGGGCTGCCCAGGAGCCCCACAGGCAC
 AGCATCTTACCCACAGACAAACCCACGGGCAGGTCTGGAAAAGAATTTATGCCGAAACCCCG
 ATGGGGATGTGAATGGTCCTTGGTGCTATACAACAAACCCCTAGATGATAGCTCGAGTCACCAGG
 CG (SEQ ID NO: 36).

[00186] Различные описанные плазмиды используются вместе с другими плазмидами, несущими остаток геномной последовательности аденовируса типа 5 (на основе штамма dl309), для получения рекомбинантных аденовирусов.

Включение путем ссылки

[00187] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в настоящей заявке, включено в настоящее изобретение путем ссылки для всех целей.

Эквиваленты

[00188] Изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отступления от его сущности или основных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления изобретения следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие описанное здесь изобретение. Таким образом, объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и предполагается, что все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны быть включены в нее.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденовирус, содержащий:

(а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19K; где сайт вставки E1b-19K расположен между сайт-сайтом E1b-19K и сайт-сайтом E1b-55K; и

(b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E3, где сайт вставки E3 расположен между сайт-сайтом pVIII и сайт-сайтом Fiber.

2. Рекомбинантный аденовирус по п.1, где рекомбинантный аденовирус представляет собой аденовирус типа 5 (Ad5).

3. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 1 или 2, где сайт вставки E1b-19K расположен между сайт-сайтом E1b-19K и сайт-сайтом E1b-19K.

4. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-3, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300, от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от 150 до приблизительно 305, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K.

5. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-4, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K.

6. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-5, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию 202 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K.

7. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-5, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию 203 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K.

8. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-7, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1917 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

9. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-7, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

10. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-9, где первый терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1917 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

11. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-9, где первый терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

12. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-11, где первый терапевтический трансген встроен между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

13. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-12, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

14. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-13, где сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от 2000 до 2500, от 2500 до 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов.

15. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-14, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-grp19K и стоп-сайтом E3-14.7K.

16. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-15, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-10.5K и стоп-сайтом E3-14.7K.

17. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-16, где сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до

приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

18. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-17, где сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

19. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-18, где сайт вставки E3 содержит делецию 1063 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

20. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-18, где сайт вставки E3 содержит делецию 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

21. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-18, где сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 Ad5 dl309.

22. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-21, где сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

23. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-22, где второй терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

24. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-23, где второй терапевтический трансген встроен между последовательностями CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4).

25. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-24, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) второй терапевтический трансген и последовательность TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4).

26. Рекомбинантный аденовирус по п.15, где сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K.

27. Рекомбинантный аденовирус по п.26, где сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающую к стоп-сайту E3-gr19K.

28. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 26 или 27, где сайт вставки E3 содержит делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-gr19K.

29. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 26-28, где сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29218-30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

30. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 26-29, где второй терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

31. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 26-30, где второй терапевтический трансген встроен между последовательностями TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

32. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 26-31, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29), второй терапевтический трансген и последовательность TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

33. Рекомбинантный аденовирус, содержащий:

(a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первый терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19k; и

(b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E1b-19k,

где сайт вставки E1b-19k расположен между старт-сайтом E1b-19k и старт-сайтом E1b-55k, и где первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность разделены первым участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

34. Рекомбинантный аденовирус по п.33, где аденовирус представляет собой аденовирус типа 5 (Ad5).

35. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 33 или 34, где сайт вставки E1b-19K расположен между старт-сайтом E1b-19K и стоп-сайтом E1b-19K.

36. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-35, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию от приблизительно 100 до приблизительно 305, от приблизительно 100 до приблизительно 300,

от приблизительно 100 до приблизительно 250, от приблизительно 100 до приблизительно 200, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от 150 до приблизительно 305, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 250 или от приблизительно 150 до приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K.

37. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-36, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию приблизительно 200 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K.

38. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-37, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию 202 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K.

39. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-37, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию 203 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K.

40. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-39, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1917 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

41. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-39, где сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

42. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-41, где первый и второй терапевтические трансгены встроены между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1917 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

43. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-41, где первый и второй терапевтические трансгены встроены между нуклеотидами, соответствующими 1714 и 1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

44. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-43, где первый и второй терапевтические трансгены встроены между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

45. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-44, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген, IRES, второй терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

46. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-45, где

рекомбинантный аденовирус содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий терапевтический трансген, встроенный в сайт вставки E1b-19k, где вторая нуклеотидная последовательность и третья нуклеотидная последовательность разделены вторым участком внутренней посадки рибосомы (IRES).

47. Рекомбинантный аденовирус по п.46, где первый, второй и третий терапевтические трансгены встроены между последовательностью CTGACCTC (SEQ ID NO: 1) и последовательностью TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

48. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 46 или 47, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 1), первый терапевтический трансген, первый IRES, второй терапевтический трансген, второй IRES, третий терапевтический трансген и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 2).

49. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33-48, где рекомбинантный аденовирус дополнительно содержит делецию E3, где делеция E3 расположена между стоп-сайтом pVIII и старт-сайтом Fiber.

50. Рекомбинантный аденовирус по п.49, где делеция E3 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 2000 до приблизительно 2500, от приблизительно 2500 до приблизительно 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов.

51. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 49 или 50, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-grp19K и стоп-сайтом E3-14.7K.

52. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-51, где делеция E3 расположена между стоп-сайтом E3-10.5K и стоп-сайтом E3-14.7K и сайт-старт Fiber.

53. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-52, где делеция E3 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

54. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-53, где делеция E3 включает делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

55. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-54, где делеция E3 включает делецию 1063 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

56. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-54, где делеция E3 включает делецию 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

57. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-54, где делеция E3 включает делецию, соответствующую делеции Ad3 dl309 E3.

58. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-57, где делеция E3 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

59. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 49-51, где делеция E3 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K.

60. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 59, где делеция E3 включает делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K.

61. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 59 или 60, где делеция E3 включает делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K.

62. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 59–61, где делеция E3 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 29218–30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

63. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33–45, где рекомбинантный аденовирус содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую третий терапевтический трансген, встроенную в сайт вставки E3, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом pVIII и сайт-сайтом Fiber.

64. Рекомбинантный аденовирус по п.63, где сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 3185, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3185, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 3185, от приблизительно 1500 до приблизительно 3000, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3185, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от 2000 до 2500, от 2500 до 3185, от приблизительно 2500 до приблизительно 3000 или от приблизительно 3000 до приблизительно 3185 нуклеотидов.

65. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 63 или 64, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-grp19K и стоп-сайтом E3-14.7K.

66. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63–65, где сайт вставки E3 расположен между стоп-сайтом E3-10.5K и стоп-сайтом E3-14.7K.

67. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63–66, где сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1551, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1551, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1551 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

68. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63–67, где

сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1050 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

69. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-68, где сайт вставки E3 содержит делецию 1063 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

70. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-68, где сайт вставки E3 содержит делецию 1064 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-10.5K.

71. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-68, где сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую делеции E3 Ad5 dl309.

72. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-71, где сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29773-30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

73. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-72, где третий терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29773 и 30836 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

74. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-73, где третий терапевтический трансген встроен между последовательностями CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) и TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4).

75. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-74, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CAGTATGA (SEQ ID NO: 3) третий терапевтический трансген и последовательность TAATAAAAAA (SEQ ID NO: 4).

76. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 63-65, где сайт вставки E3 содержит делецию от приблизительно 500 до приблизительно 1824, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1824, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 или от приблизительно 1500 до приблизительно 1824 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K.

77. Рекомбинантный аденовирус по п.76, где сайт вставки E3 содержит делецию приблизительно 1600 нуклеотидов, примыкающую к стоп-сайту E3-grp19K.

78. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 76 или 77, где сайт вставки E3 содержит делецию 1622 нуклеотидов, примыкающих к стоп-сайту E3-grp19K.

79. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 76–78, где сайт вставки E3 содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 29218–30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

80. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 76–78, где третий терапевтический трансген встроен между нуклеотидами, соответствующими 29218 и 30839 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

81. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 76–80, где третий терапевтический трансген встроен между последовательностями TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29) и TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

82. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 76–81, где рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность TGCCTTAA (SEQ ID NO: 29), третий терапевтический трансген и последовательность TAAAAAAAAAAT (SEQ ID NO: 30).

83. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 33–82, где IRES выбран из группы, состоящей из IRES вируса энцефаломиокардита, IRES вируса ящура и IRES вируса полиомиелита.

84. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1–83, где рекомбинантный аденовирус дополнительно содержит делецию E4, где делеция E4 находится между старт-сайтом E4-ORF6/7 и правым инвертированным концевым повтором (ITR).

85. Рекомбинантный аденовирус по п.84, где делеция E4 расположена между старт-сайтом E4-ORF6/7 и старт-сайтом E4-ORF1.

86. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 84 или 85, где делеция E4 включает делецию от приблизительно 500 до приблизительно 2500, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2500, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1500 до приблизительно 2500, от приблизительно 1500 до приблизительно 2000 или от приблизительно 2000 до приблизительно 2500 нуклеотидов.

87. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 84–86, где делеция E4 включает делецию от приблизительно 250 до приблизительно 1500, от приблизительно 250 до приблизительно 1250, от приблизительно 250 до приблизительно 1000, от приблизительно 250 до приблизительно 750, от приблизительно 250

до приблизительно 500, от 500 до приблизительно 1500, от приблизительно 500 до приблизительно 1250, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 500 до приблизительно 750, от 750 до около 1500, от около 750 до около 1250, от около 750 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 1500, от приблизительно 1000 до приблизительно 1250 или от приблизительно 1250 до приблизительно 1500 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7.

88. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 84-87, где делеция E4 включает делецию приблизительно 1450 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7.

89. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 84-88, где делеция E4 включает делецию 1449 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7.

90. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 84-89, где делеция E4 включает делецию, соответствующую нуклеотидам 34078-35526 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

91. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-90, где первый и/или второй терапевтические трансгены не связаны функционально с последовательностью экзогенного промотора.

92. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-90, где первый, второй и/или третий терапевтические трансгены не связаны функционально с последовательностью экзогенного промотора.

93. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-90, где ни один из терапевтических трансгенов не связан функционально с последовательностью экзогенного промотора.

94. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-93, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно 5000

нуклеотидов.

95. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-93, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

96. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-93, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно

5000 нуклеотидов.

97. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-93, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

98. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-97, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов.

99. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-97, где общий размер каждого из терапевтических трансенов составляет от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

100. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-99, где размер первого и второго терапевтических трансенов вместе составляет по меньшей мере от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов.

101. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-99, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет по меньшей мере от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

102. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-99, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет по меньшей мере от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000 или от приблизительно 4000 до

приблизительно 5000 нуклеотидов.

103. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-99, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет по меньшей мере от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

104. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-99, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет по меньшей мере от приблизительно 500 до приблизительно 5000 от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно

4000 или от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов.

105. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-99, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет по меньшей мере от приблизительно 500 до приблизительно 7000, от приблизительно 500 до приблизительно 6000, от приблизительно 500 до приблизительно 5000, от приблизительно 500 до приблизительно 4000, от приблизительно 500 до приблизительно 3000, от приблизительно 500 до приблизительно 2000, от приблизительно 500 до приблизительно 1000, от приблизительно 1000 до приблизительно 7000, от приблизительно 1000 до приблизительно 6000, от приблизительно 1000 до приблизительно 5000, от приблизительно 1000 до приблизительно 4000, от приблизительно 1000 до приблизительно 3000, от приблизительно 1000 до приблизительно 2000, от приблизительно 2000 до приблизительно 7000, от приблизительно 2000 до приблизительно 6000, от приблизительно 2000 до приблизительно 5000, от приблизительно 2000 до приблизительно 4000, от приблизительно 2000 до приблизительно 3000, от приблизительно 3000 до приблизительно 7000, от приблизительно 3000 до приблизительно 6000, от приблизительно 3000 до приблизительно 5000, от приблизительно 3000 до приблизительно 4000, от приблизительно 4000 до приблизительно 7000, от приблизительно 4000 до приблизительно 6000, от приблизительно 4000 до приблизительно 5000 нуклеотидов, от приблизительно 5000 до приблизительно 7000, от приблизительно 5000 до приблизительно 6000 или от приблизительно 6000 до приблизительно 7000 нуклеотидов.

106. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-105, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000 или приблизительно 5000 нуклеотидов.

107. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-105, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000 или приблизительно 7000 нуклеотидов.

108. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-105, где размер первого, второго и третьего терапевтических

трансгенов вместе составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000 или приблизительно 5000 нуклеотидов.

109. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-105, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000 или приблизительно 7000 нуклеотидов.

110. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-109, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000 или приблизительно 5000 нуклеотидов.

111. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-109, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет по меньшей мере приблизительно 500, приблизительно 1000, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 4000, приблизительно 5000, приблизительно 6000 или приблизительно 7000 нуклеотидов.

112. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-111, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет приблизительно 1650 нуклеотидов.

113. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-111, где размер первого и второго терапевтических трансгенов вместе составляет приблизительно 3100 нуклеотидов.

114. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-111, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет приблизительно 1650 нуклеотидов.

115. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-111, где размер первого, второго и третьего терапевтических трансгенов вместе составляет приблизительно 3100 нуклеотидов.

116. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-115, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет приблизительно 1650 нуклеотидов.

117. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-115, где общий размер каждого из терапевтических трансгенов составляет приблизительно 3100 нуклеотидов.

118. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-117, где первый и/или второй терапевтический трансген кодируют

терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1 и ловушки TGF- β .

119. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-117, где первый, второй и/или третий терапевтические трансгены кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1 и ловушки TGF- β .

120. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-117, где любой из терапевтических трансгенов кодирует терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1 и ловушки TGF- β .

121. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-117, где первый и/или второй терапевтический трансген кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

122. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-117, где первый, второй и/или третий терапевтические трансгены кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

123. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-117, где любой из терапевтических трансгенов кодирует терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23A/p19, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

124. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-117, где

первый и/или второй терапевтический трансген кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23, IL-23A/p19, IL-27, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

125. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-117, где первый, второй и/или третий терапевтические трансгены кодируют терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23, IL-23A/p19, IL-27, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

126. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-117, где любой из терапевтических трансгенов кодирует терапевтический полипептид, выбранный из группы, состоящей из CD80, CD137L, IL-23, IL-23A/p19, IL-27, IL-27A/p28, IL-27B/EBI3, эндостатина, ангиостатина, ICAM-1, ловушки TGF- β , TGF- β , CD19, CD20, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, CD154, CD86, BORIS/CTCFL, FGF, IL-24, MAGE, NY-ESO-1, ацетилхолина, интерферона-гамма, DKK1/Wnt, p53, тимидинкиназы, тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-1 и тяжелой цепи или легкой цепи антитела к PD-L1.

127. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-126, где первый и второй терапевтический трансген кодируют первую и вторую субъединицу, соответственно, гетеродимерного цитокина.

128. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-126, где первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из CD80 и CD137L.

129. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-126, где первый, второй и/или третий терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из CD80, CD137L и ICAM-1.

130. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 127 или 128, где первый терапевтический трансген кодирует CD80.

131. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 127-130,

где второй терапевтический трансген кодирует CD137L.

132. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-131, где третий терапевтический трансген кодирует ICAM-1.

133. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-132, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 5.

134. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-133, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 6.

135. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-134, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 7.

136. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-135, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 8.

137. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-136, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 27.

138. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-137, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая кодируется SEQ ID NO: 32.

139. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-138, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 9.

140. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-137, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 31.

141. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 128-137, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22.

142. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-127, где первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из IL-27A/p28 и IL-27B/EBI3.

143. Рекомбинантный аденовирус по п.142, где первый терапевтический трансген кодирует IL-27A/p28.

144. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 142 или 143, где второй терапевтический трансген кодирует IL-27B/EBI3.

145. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-126, где первый и/или второй терапевтические трансгены выбраны из группы, состоящей из эндостатина и ангиостатина.

146. Рекомбинантный аденовирус по п.145, где первый терапевтический трансген кодирует эндостатин.

147. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 145 или 146, где второй терапевтический трансген кодирует ангиостатин.

148. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 145-147, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или SEQ ID NO: 38.

149. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 145-148, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

150. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 145-149, где рекомбинантный аденовирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11.

151. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-150, где рекомбинантный аденовирус дополнительно содержит делецию связывания Р_{еа3} или его функционального фрагмента.

152. Рекомбинантный аденовирус по п.151, где рекомбинантный аденовирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам, расположенным приблизительно от -300 до приблизительно -250 перед сайтом инициации E1 α .

153. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 151 или 152, где рекомбинантный аденовирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам, расположенным приблизительно от -305 до приблизительно -255 перед сайтом инициации E1 α .

154. Рекомбинантный аденовирус по п.п. 151 или 152, где рекомбинантный аденовирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам, расположенным приблизительно от -304 до приблизительно -255 перед сайтом инициации E1 α .

155. Рекомбинантный аденовирус, содержащий SEQ ID NO: 14, или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

156. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-155, где рекомбинантный аденовирус избирательно реплицируется в

гиперпролиферативной клетке.

157. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-156, где рекомбинантный аденовирус избирательно экспрессирует первый и/или второй терапевтический трансген в гиперпролиферативной клетке.

158. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 46-157, где рекомбинантный аденовирус избирательно экспрессирует первый, второй и/или третий терапевтический трансген в гиперпролиферативной клетке.

159. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 156-158, где гиперпролиферативная клетка представляет собой раковую клетку.

160. Рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-159, где рекомбинантный аденовирус представляет собой онколитический аденовирус.

161. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный аденовирус по любому из п.п. 1-160 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

162. Способ экспрессии двух терапевтических трансгенов в клетке-мишени, включающий воздействие на клетку эффективным количеством рекомбинантного аденовируса по любому из п.п. 1-160 для экспрессии двух терапевтических трансгенов.

163. Способ экспрессии трех терапевтических трансгенов в клетке-мишени, включающий воздействие на клетку эффективным количеством рекомбинантного аденовируса по любому из п.п. 46-160 для экспрессии трех терапевтических трансгенов.

164. Способ ингибирования пролиферации опухолевой клетки, включающий воздействие на клетку эффективным количеством рекомбинантного аденовируса по любому из п.п. 1-160 для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

165. Способ ингибирования роста опухоли у пациента, способ включает введение пациенту эффективного количества рекомбинантного аденовируса по любому из п.п. 1-160 для ингибирования роста опухоли.

166. Способ лечения рака у пациента, способ включает введение пациенту эффективного количества рекомбинантного аденовируса по любому из п.п. 1-160 для лечения рака у пациента.

167. Способ по п.166, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, плоскоклеточного рака кожи, базально-клеточного рака, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака анального

канала, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга, рака эндометрия, нейроэндокринного рака, карциномы из клеток Меркеля, желудочно-кишечной стромальной опухоли, саркомы и рака поджелудочной железы.

168. Способ по п.п. 165-167, где рекомбинантный аденовирус вводят в комбинации с одной или несколькими терапиями, выбранными из группы, состоящей из хирургического вмешательства, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виротерапии.

169. Способ по любому из п.п. 162-168, где эффективное количество рекомбинантного аденовируса составляет 10^2 - 10^{15} бляшкообразующих единиц (БОЕ).

170. Способ по любому из п.п. 165-169, где пациент является человеком.

171. Способ по п.170, где пациент является ребенком.

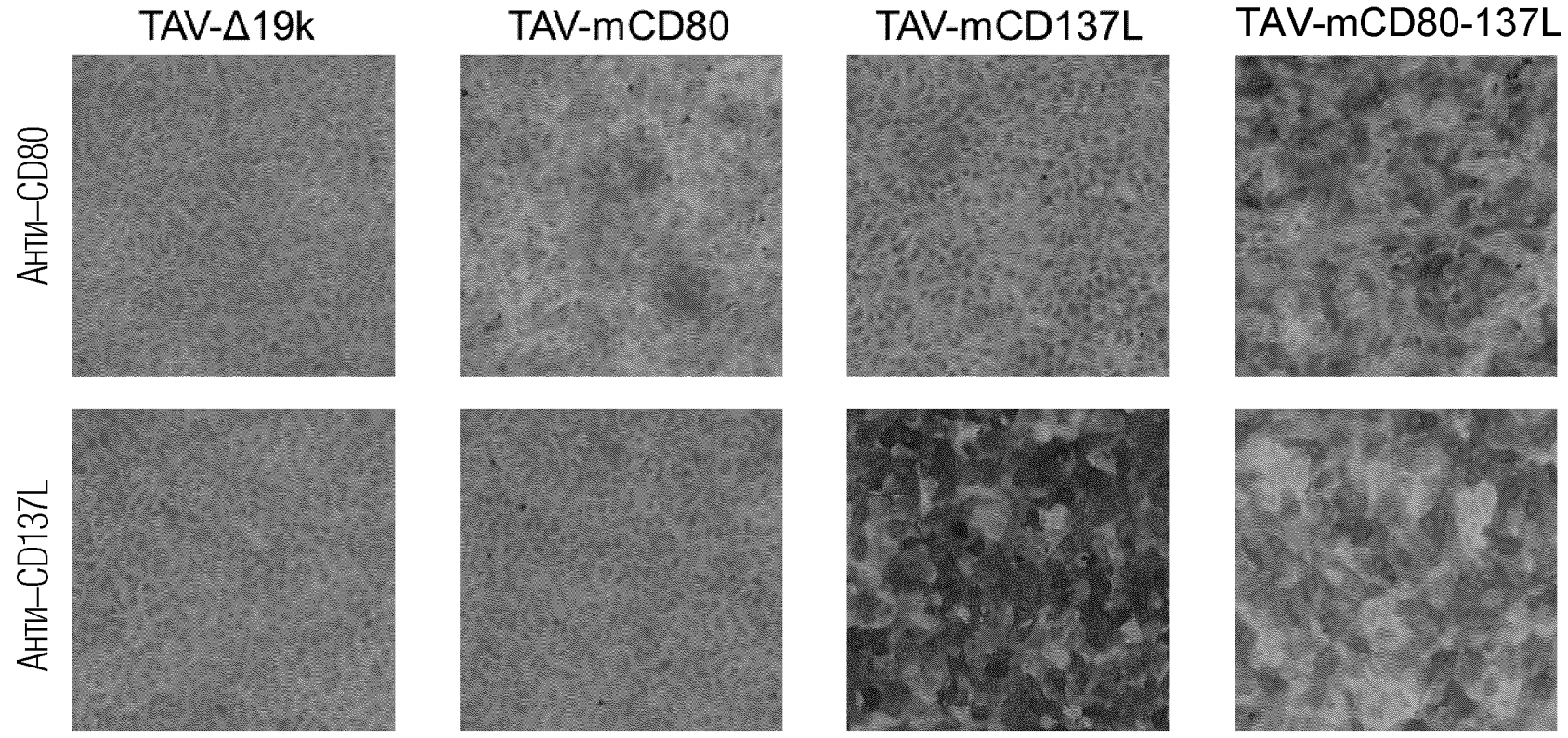
172. Способ по любому из п.п. 165-171, где способ дополнительно включает измерение иммунного ответа на антиген у пациента.

173. Способ по любому из п.п. 165-172, где эффективное количество рекомбинантного вируса идентифицируют путем измерения иммунного ответа на антиген у пациента.

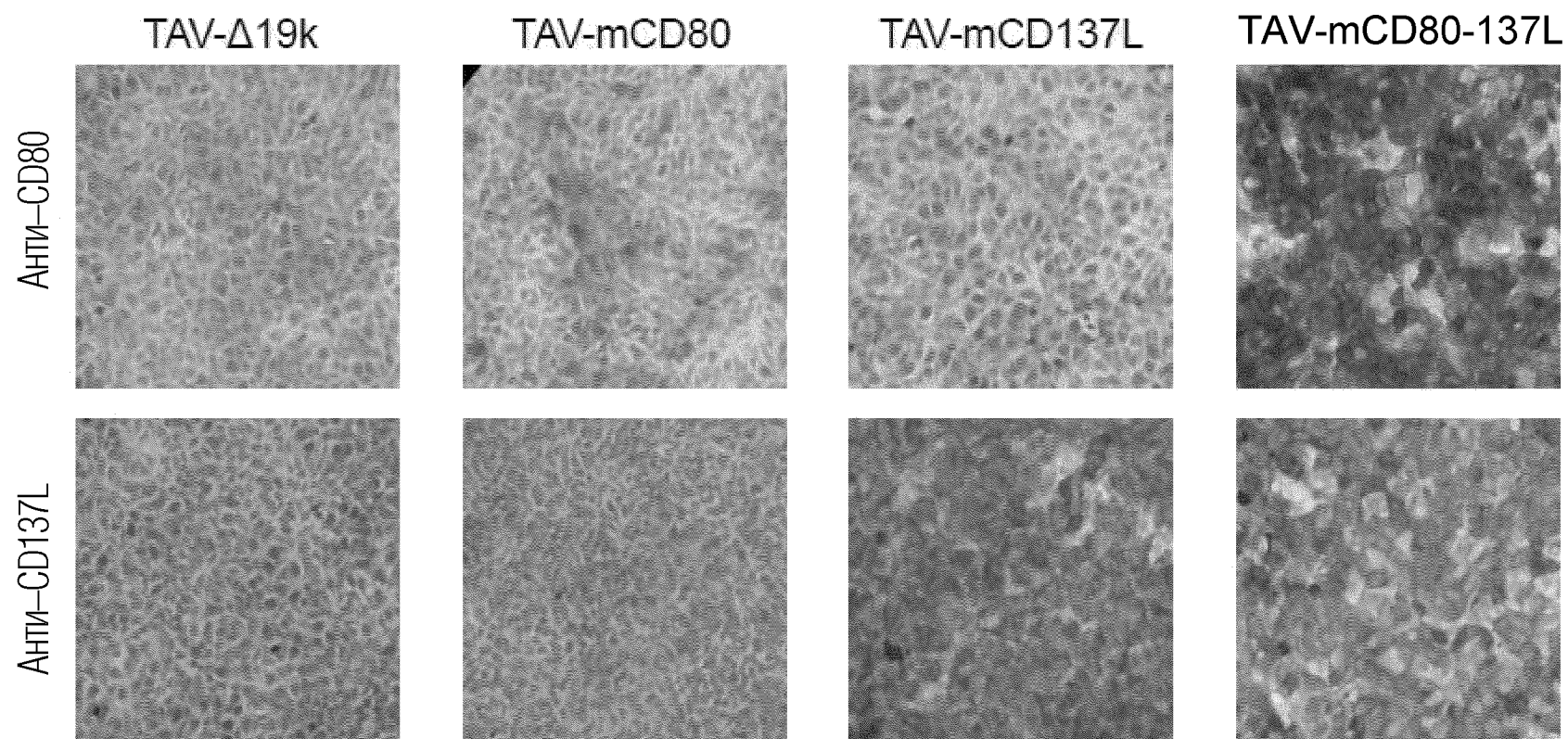
174. Способ по п.п. 172 или 173, где иммунный ответ на антиген измеряют путем инъекции пациенту антигена в место инъекции на коже пациента и измерения величины индукции в месте инъекции.

По доверенности

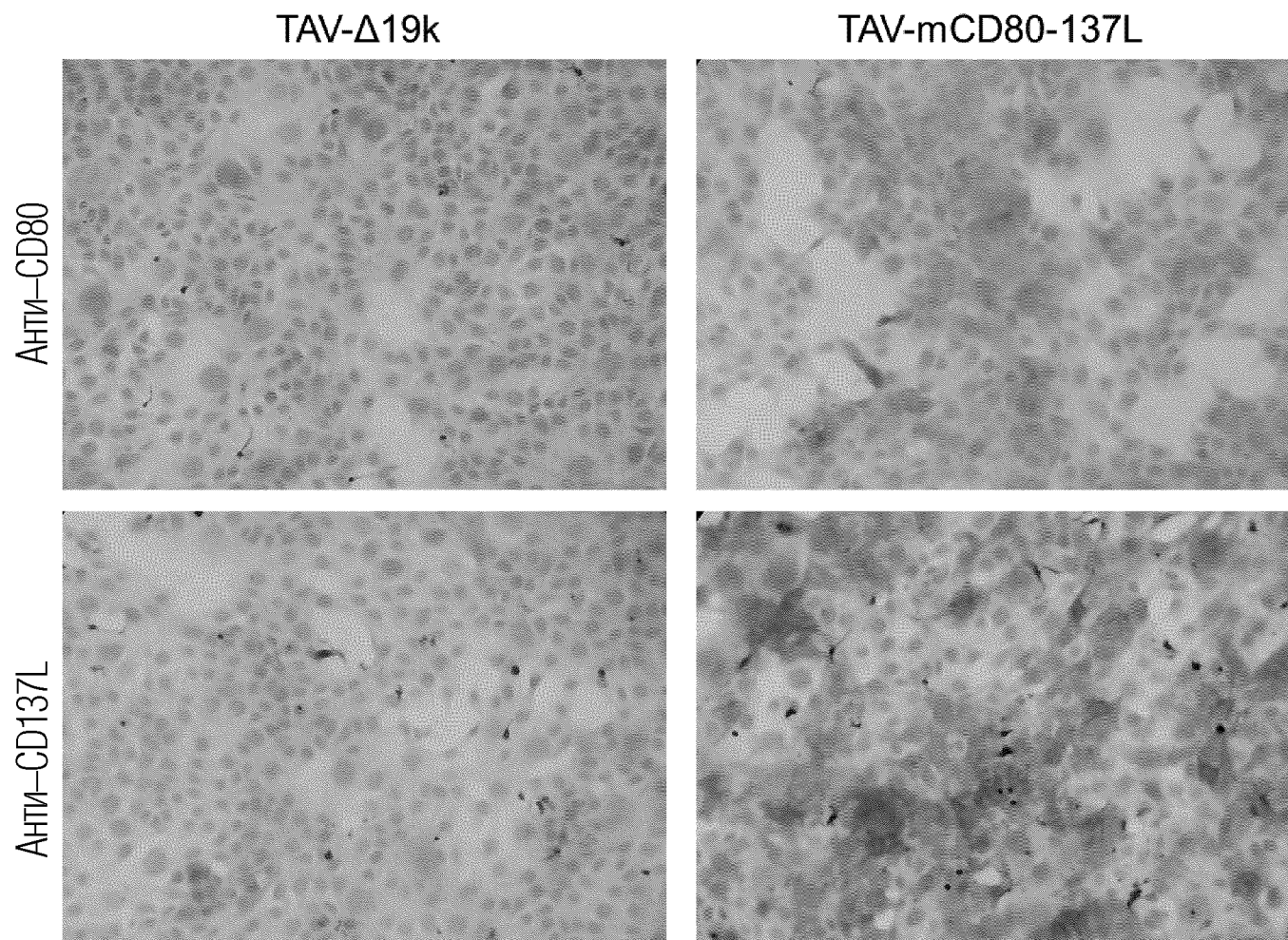
ФИГ. 1



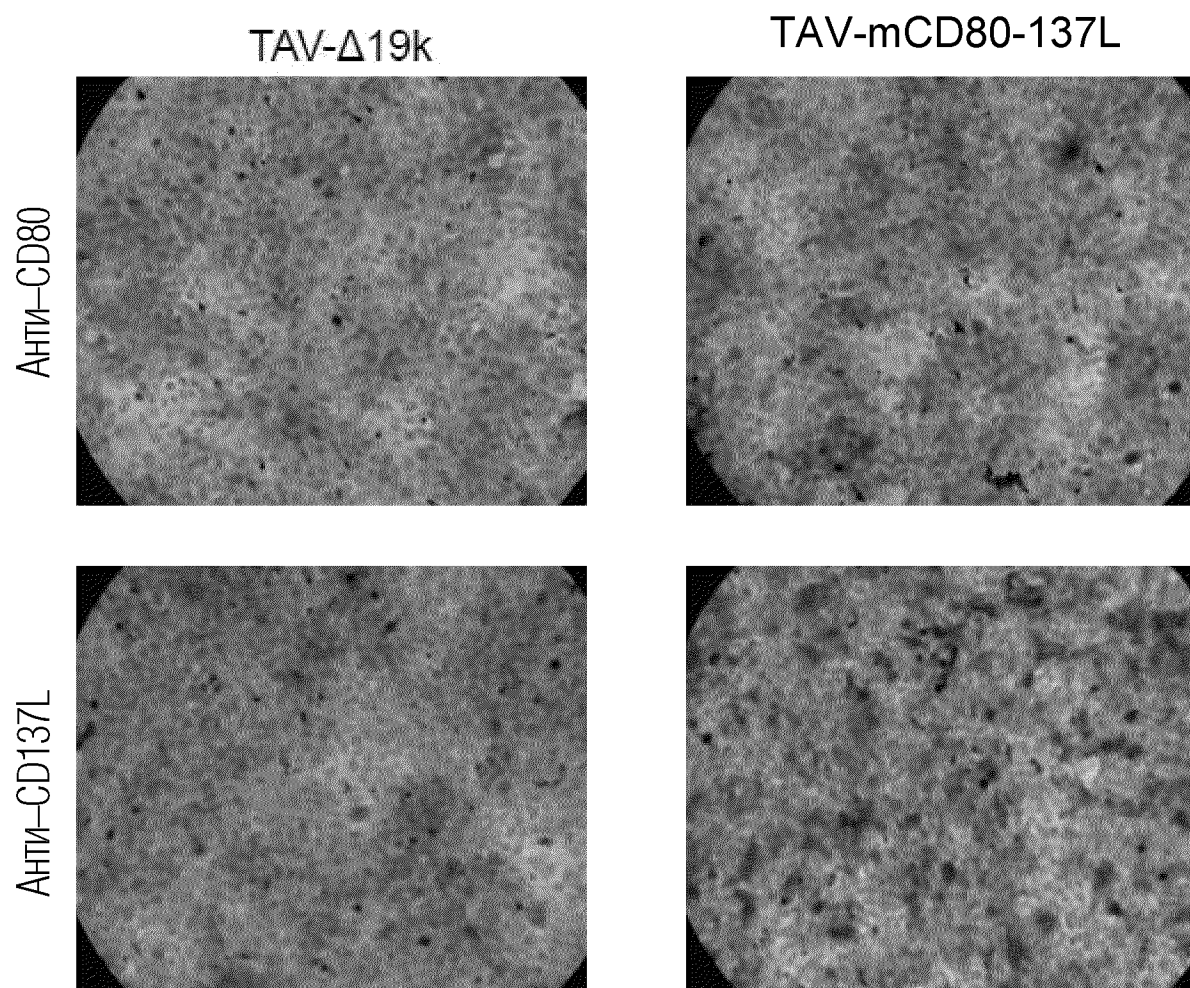
ФИГ. 2



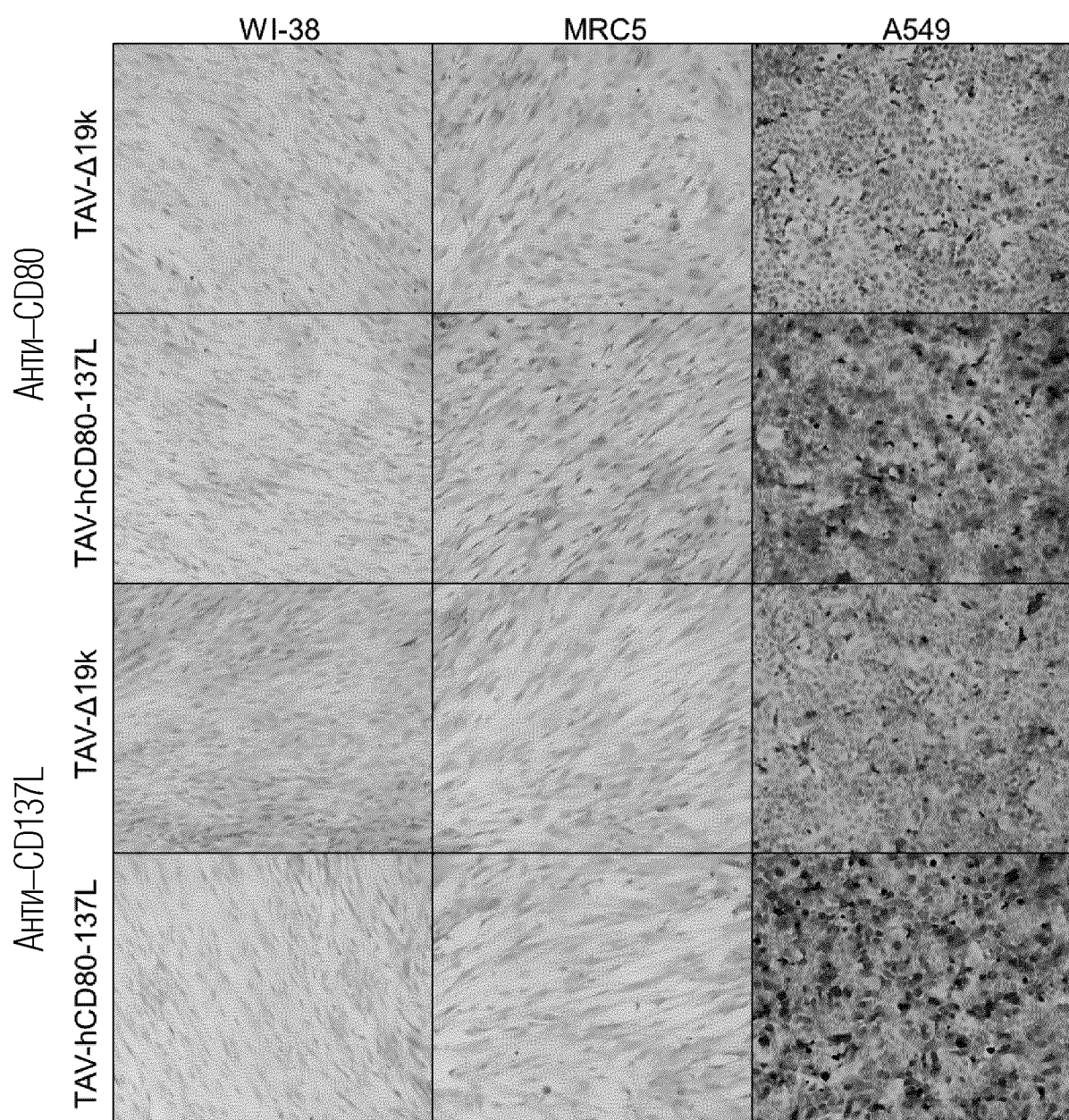
ФИГ. 3



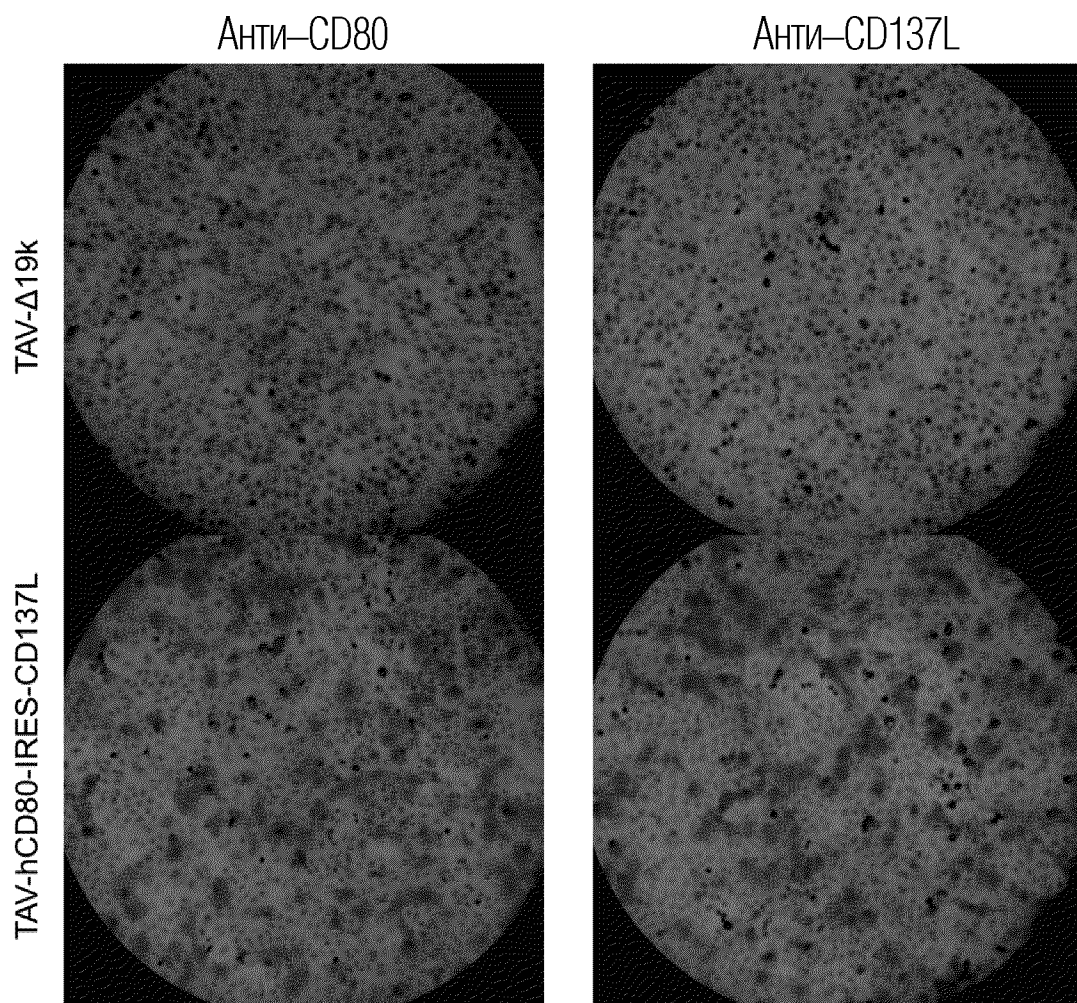
ФИГ. 4



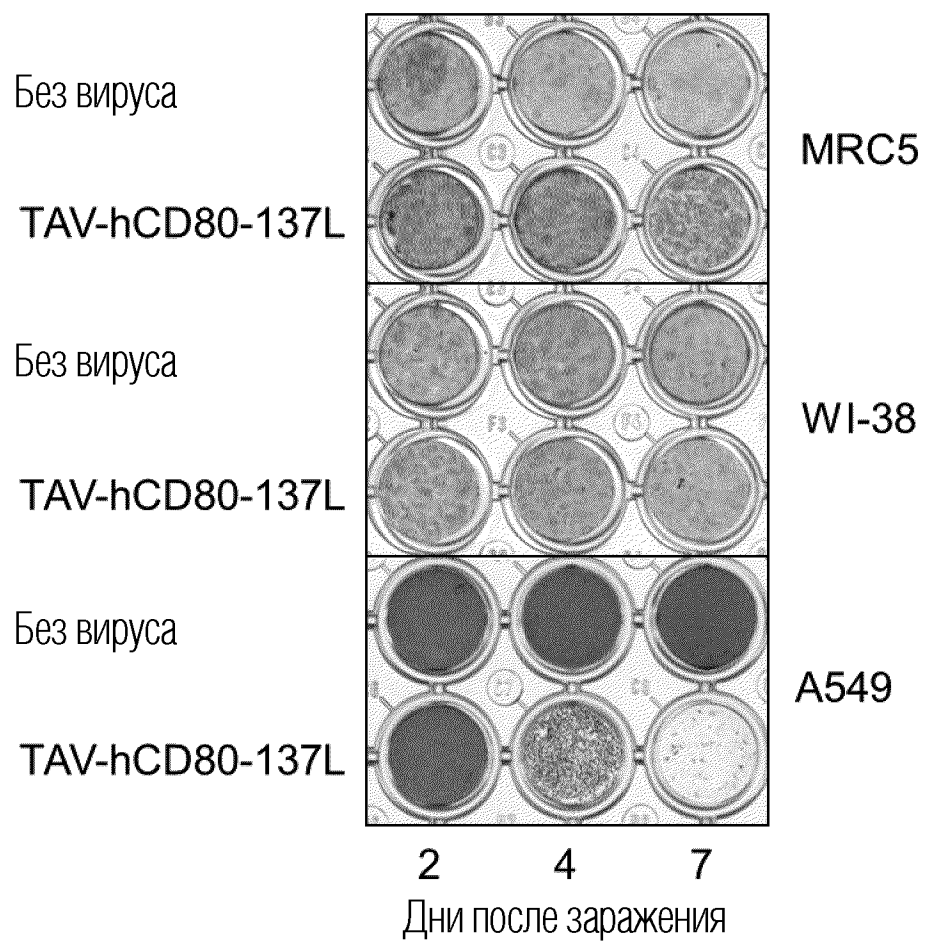
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8

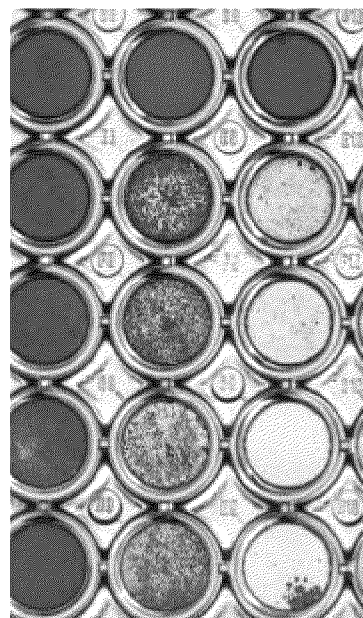
Без вируса

TAV- Δ 19k

TAV-mCD80

TAV-mCD137L

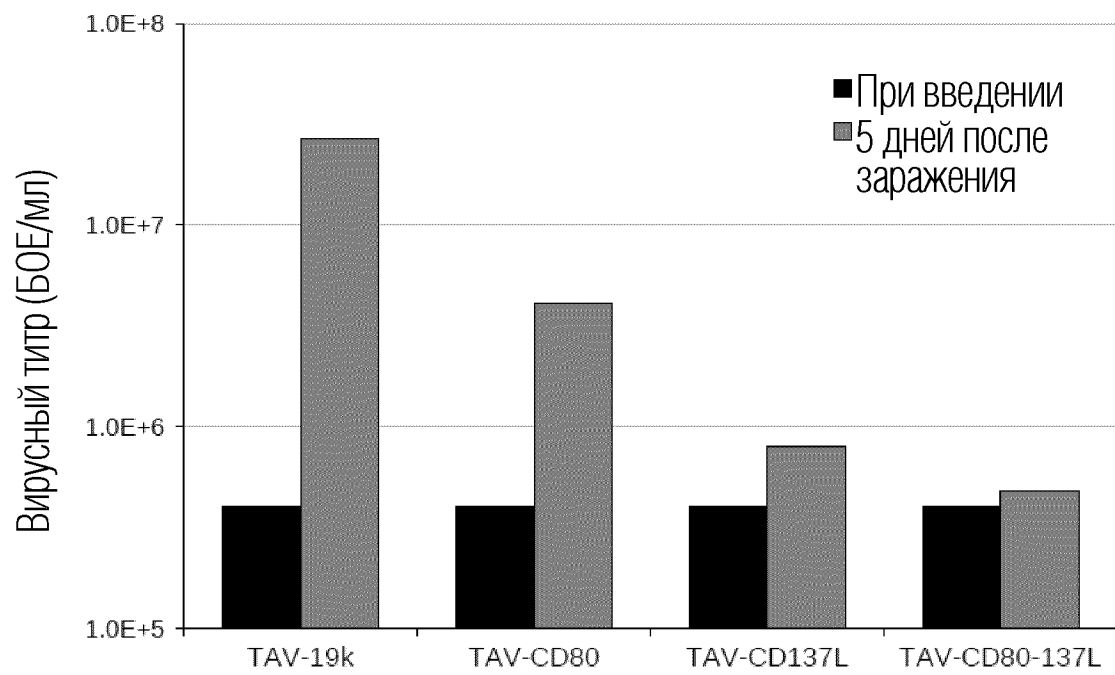
TAV-mCD80-137L



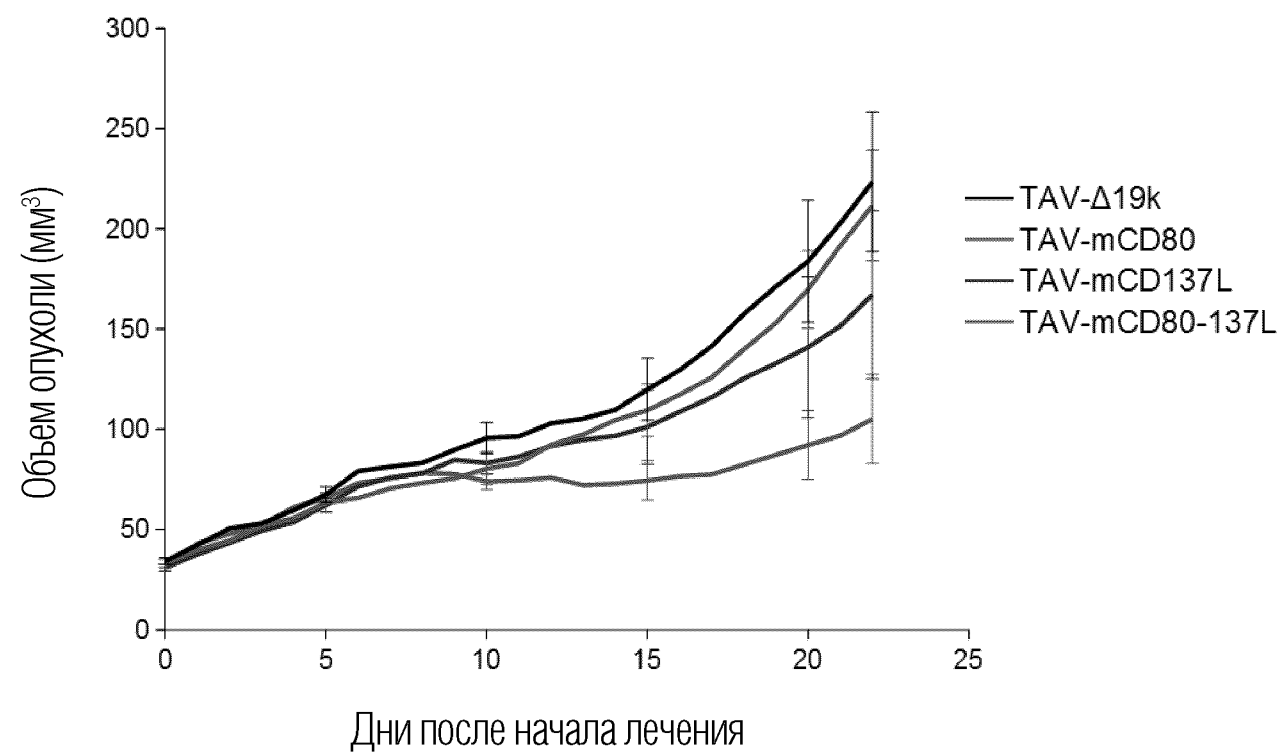
2 4 7

Дни после заражения

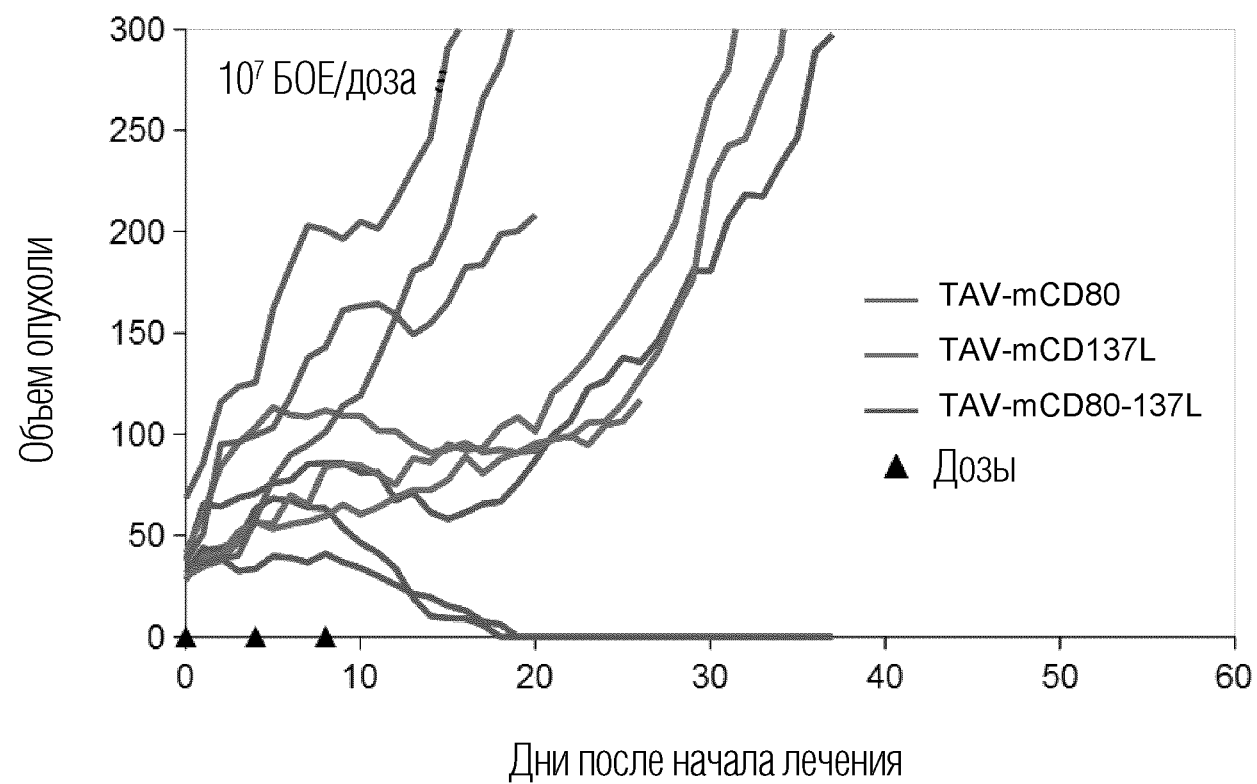
ФИГ. 9



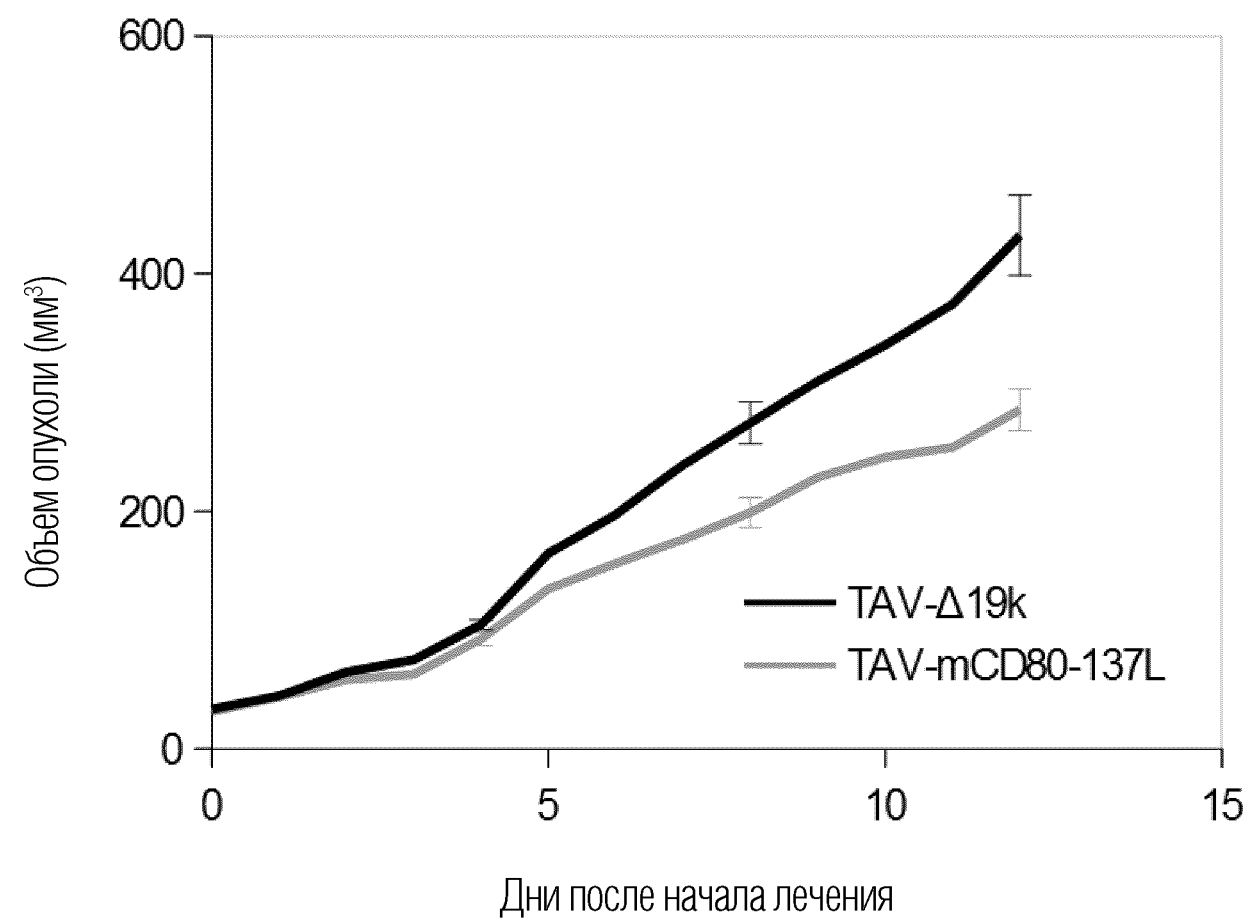
ФИГ. 10



ФИГ. 11

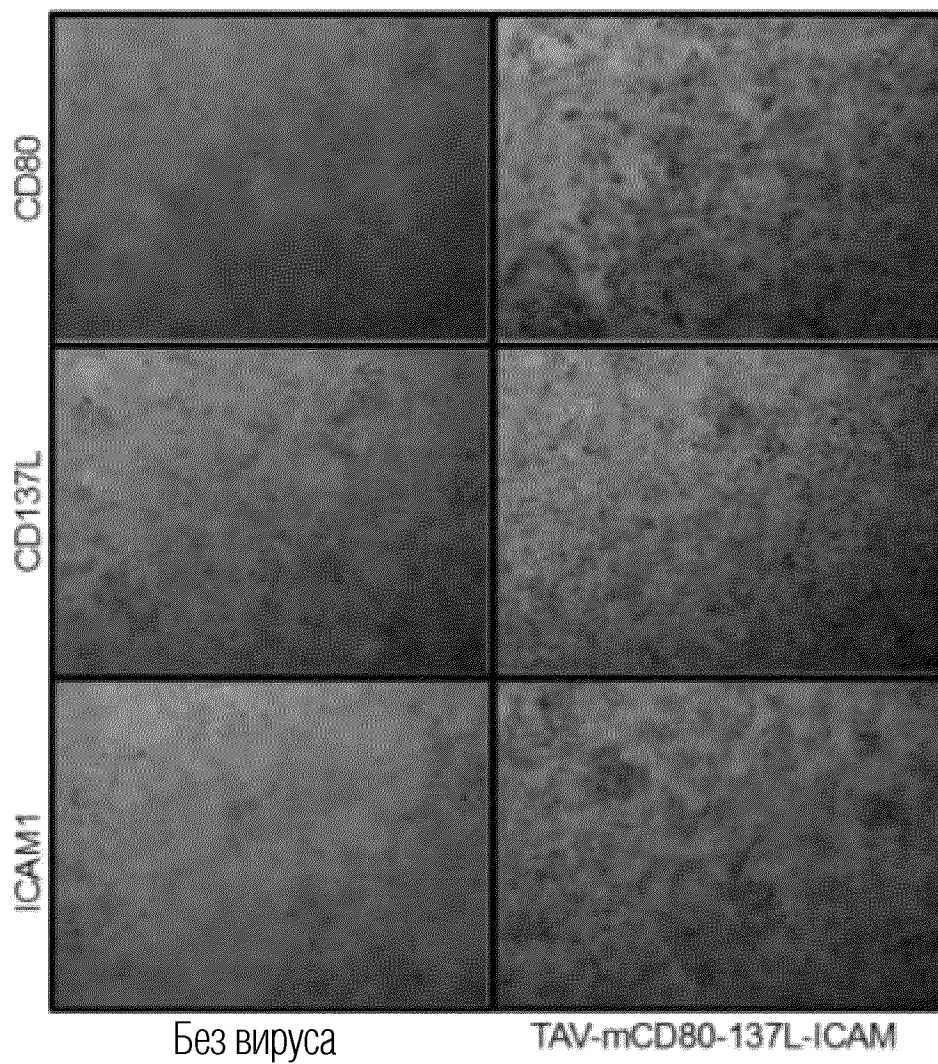


ФИГ. 12

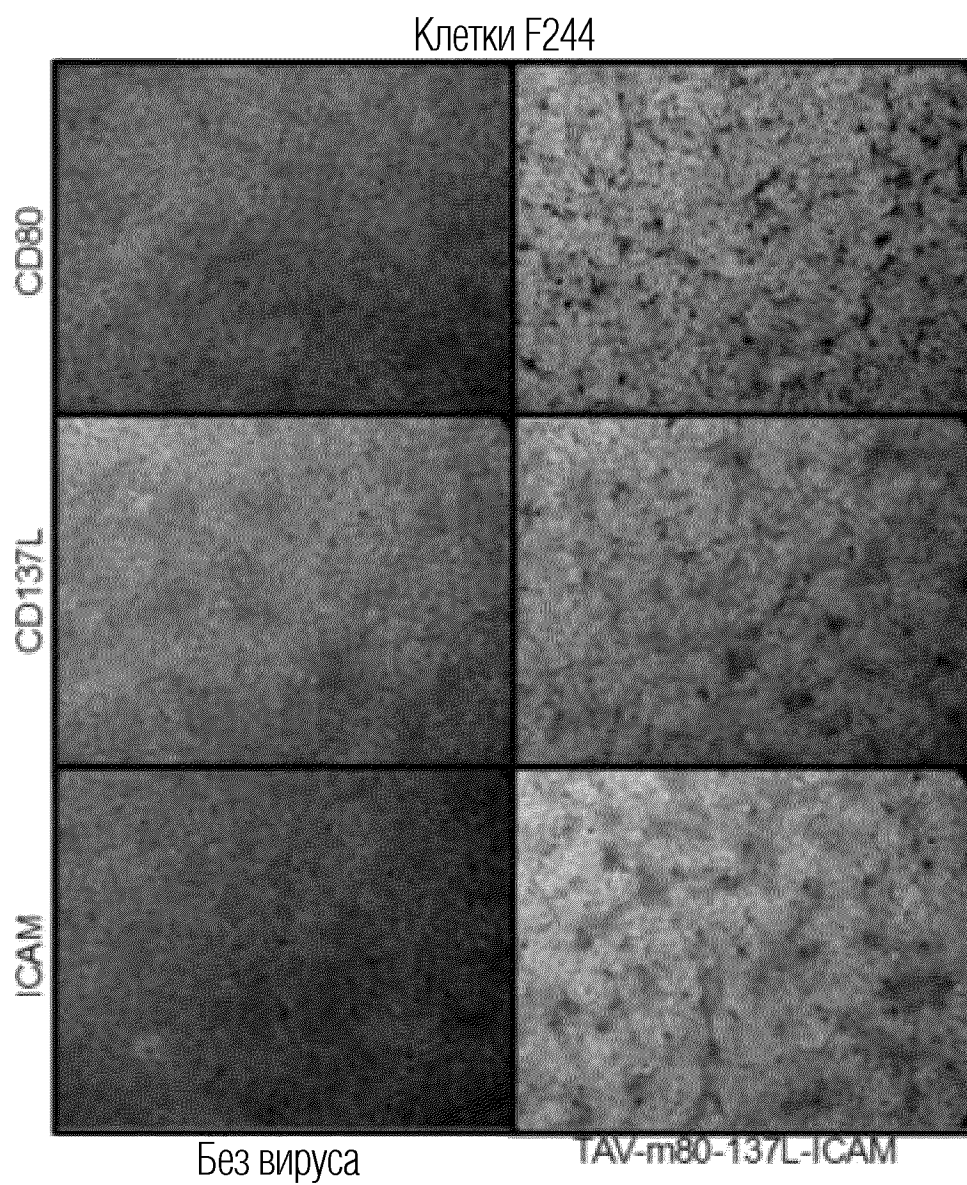


ФИГ. 13

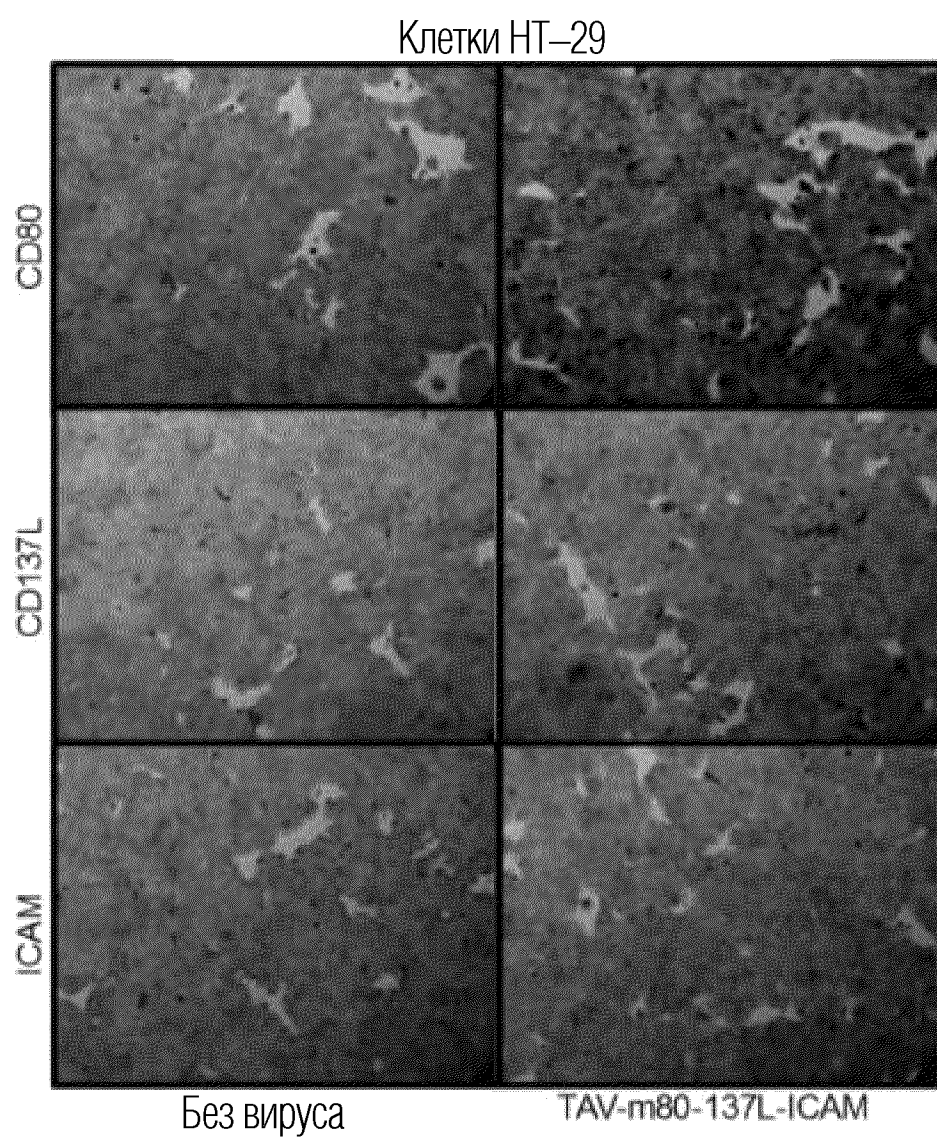
Клетки ADS-12



ФИГ. 14

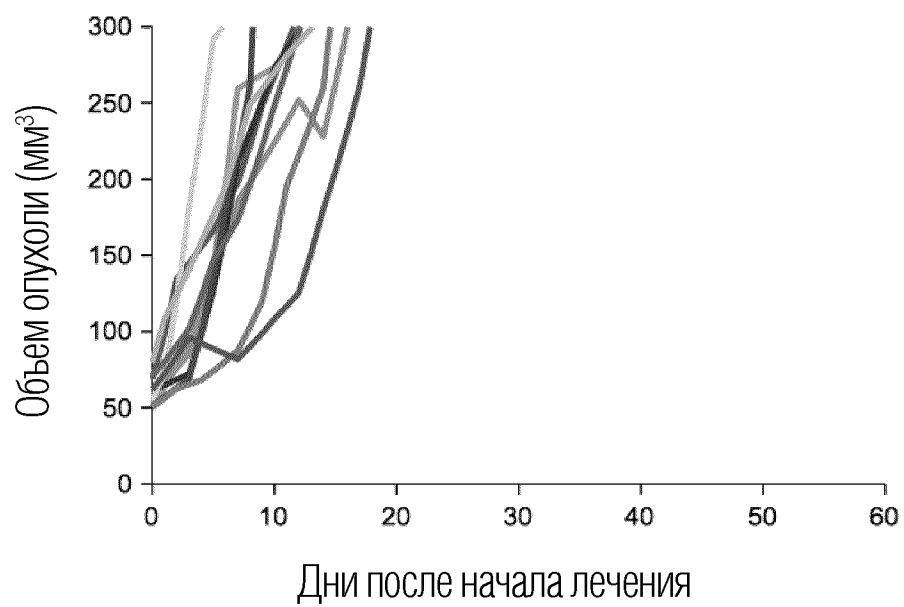


ФИГ. 15



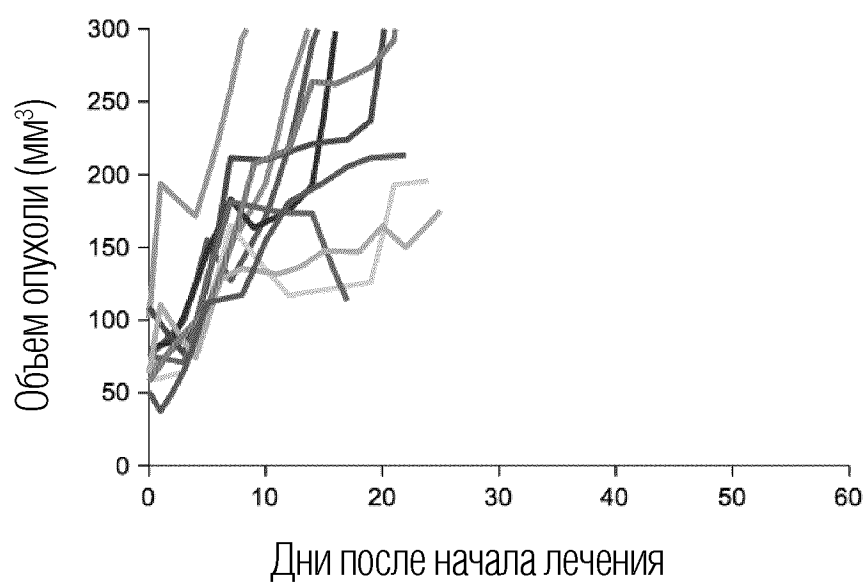
ФИГ. 16А

Буфер



ФИГ. 16В

TAV-mCD80-137L



ФИГ. 16С

TAV-mCD80-137L-ICAM

