

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201991806 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.02.13

(51) Int. Cl. *A61K 35/76* (2015.01)  
*C12N 15/86* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.01.30

---

(54) ОПУХОЛЬ-СЕЛЕКТИВНЫЕ МУТАНТЫ ТАТА-БОКСА И СААТ-БОКСА

---

(31) 62/452,075

(32) 2017.01.30

(33) US

(86) PCT/US2018/016025

(87) WO 2018/140970 2018.08.02

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

(72) Изобретатель:

Рид Тони Р., Оронски Брайан Т.,  
Хеджран Фарах, Ларсон Кристофер  
(US)

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

(57) Настоящее изобретение относится, например, к рекомбинантному вирусу, содержащему (i) промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или (ii) промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс и/или СААТ-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке. Эти рекомбинантные вирусы могут применяться для лечения клеточных пролиферативных заболеваний и нарушений, включая некоторые формы рака.

A1

201991806

201991806

A1

**ОПУХОЛЬ-СЕЛЕКТИВНЫЕ МУТАНТЫ ТАТА-БОКСА И СААТ-БОКСА**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет предварительной заявки на Патент США порядковый номер 62/452075, поданной 30 января 2017 года, которая полностью включена в настоящее изобретение путем ссылки.

**Область техники, к которой относится изобретение**

[0002] Областью техники настоящего изобретения является молекулярная биология и вирусология, в частности модифицированные вирусы, которые преимущественно инфицируют гиперпролиферативные клетки и/или клетки с неограниченным ростом.

**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 транстенов, которые копируются и экспрессируются каждый раз, когда вирус реплицируется.

[0004] Ранее разработанные онколитические вирусы включают в себя онколитический аденовирус серотипа 5 (Ad5), называемый TAV-255, который транскрипционно ослабляется 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 Рea3 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, которые, в частности, обладают свойствами опухоли-селективной репликации, вирус-опосредованного лизиса и/или экспрессии терапевтического трангена для лечения рака и гиперпролиферативных нарушений у пациентов-людей.

#### **Сущность изобретения**

[0006] Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что для некоторых вирусных промоторов ТАТА и/или СААТ-бокс, хотя и является необходимым для управления транскрипцией в нормальных здоровых клетках, но не является необходимым для активной транскрипции в раковых клетках.

[0007] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему: (i) промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом; и/или (ii) промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0008] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0009] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, что позволяет избирательно

экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0010] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов рекомбинантный вирус выбран из рекомбинантного вируса осповакцины, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса простого герпеса 1 (HSV1), вируса миксомы, реовируса, полиовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса кори (MV) и вируса болезни Ньюкасла (NDV). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус представляет собой аденовирус, например аденовирус типа 5 (Ad5) или аденовирус типа 35 (Ad35), например аденовирус типа 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор на основе модифицированного TATA-бокса и/или промотор на основе модифицированного CAAT-бокса является промотором раннего гена, например, промотором E1a, промотором E1b или промотором E4, например промотором E1a.

[0011] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов модификация, включенная в промотор на основе модифицированного TATA-бокса, включает в себя удаление всего TATA-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -27 до -24, от -31 до -24, от -44 до +54 или от -146 до +54 промотора E1a аденовируса типа 5, которые соответствуют, соответственно, нуклеотидам с 471 по 474, с 467 по 474, с 454 по 551 и с 352 по 551 в последовательности SEQ ID NO: 2, и нуклеотидам с 472 по 475, с 468 по 475, с 455 по 552 и с 353 по 552 в последовательности SEQ ID NO: 8.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -29 до -26, от -33 до -26, от -44 до +52 или от -148 до +52 промотора E1a аденовируса типа 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 471 по 475, с 467 по 475, с 446 по 551 и с 352 по 551 в последовательности SEQ ID NO: 2.

[0013] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, и вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -27 до -24, от -31 до -24, от -44 до +54 или от -146 до +54 промотора E1a аденовируса типа 5, которые соответствуют, соответственно, нуклеотидам с 471 по 474, с 467 по 474, с 454 по



551 и с 352 по 551 в последовательности SEQ ID NO: 2, и нуклеотидам с 472 по 475, с 468 по 475, с 455 по 552 и с 353 по 552 в последовательности SEQ ID NO: 8.

[0014] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, и вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -29 до -26, от -33 до -26, от -44 до +52 или от -148 до +52 промотора E1a аденовируса типа 5, или делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 471 по 475, с 467 по 475, с 446 по 551 и с 352 по 551 в последовательности SEQ ID NO: 2.

[0015] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, и вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к рекомбинантному аденовирусу типа 5, содержащему последовательность CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7), AGTGCCCG (SEQ ID NO: 12) или TATTCCCG (SEQ ID NO: 13), которые возникают в результате соединения двух полинуклеотидных последовательностей, которые в противном случае фланкировали бы удаленную полинуклеотидную последовательность.

[0016] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов модификация, включенная в промотор на основе модифицированного CAAT-бокса, включает в себя удаление всего CAAT-бокса. В некоторых вариантах осуществления вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -76 до -68 промотора E1a аденовируса типа 5, что соответствует нуклеотидам с 422 по 430 SEQ в последовательности ID NO: 2 и нуклеотидам с 423 по 431 в последовательности SEQ ID NO: 8.

[0017] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, и вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -76 до -68 промотора E1a аденовируса типа 5, что соответствует нуклеотидам с 422 по 430 в последовательности SEQ ID NO: 2 и нуклеотидам с 423 по 431 в последовательности SEQ ID NO: 8.

[0018] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов вирус содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23, или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по последовательности с SEQ ID NO:

3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23.

[0019] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, и вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к рекомбинантному аденовирусу типа 5, содержащему последовательность TTCCGTGGCG (SEQ ID NO: 14), которая возникает в результате соединения двух полинуклеотидных последовательностей, которые в противном случае фланкировали бы удаленную полинуклеотидную последовательность.

[0020] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 477 по 484 генома Ad35.

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический трансген. Терапевтический трансген может кодировать терапевтический полипептид, например, апоптотический агент, антитело, CTL-чувствительный пептид, цитокин, цитолитический агент, цитотоксический агент, фермент, гетерологичный антиген, экспрессированный на поверхности опухолевой клетки, чтобы вызвать иммунный ответ, иммуностимулирующий или иммуномодулирующий агент, интерферон, литический пептид, онкопротеин, полипептид, который катализирует процессы, приводящие к гибели клеток, полипептид, который исправляет генетические дефекты в соматических клетках, белок-супрессор опухолей, вакцинный антиген и любые их комбинации. Терапевтический трансген может кодировать терапевтическую нуклеиновую кислоту, например антисмысловую РНК или рибозим. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический трансген выбран из ацетилхолина, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-1, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-L1, BORIS/CTCF, CD19, CD20, CD80, CD86, CD137L, CD154, DKK1/Wnt, ICAM-1, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-17, IL-23, IL-23A/p19, интерферона-гамма, TGF- $\beta$ , ловушки TGF- $\beta$ , FGF, IL-24, IL-27, IL-35, MAGE, NY-ESO-1, p53 и тимидинкиназы. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический трансген представляет собой ловушку TGF- $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный

вирус содержит сайт-старт E1b-19K и E1b-55K, и нуклеотидная последовательность, кодирующая терапевтический трансген, встраивается между сайт-старт E1b-19K и сайт-старт E1b-55K.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов может содержать делецию, по меньшей мере, одного сайта связывания Рea3 или его функциональной части.

[0023] В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов может избирательно реплицироваться в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов может избирательно экспрессировать E1a, E1b и/или терапевтический трансген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения любой из вышеупомянутых рекомбинантных вирусов может избирательно обладать цитолитической активностью в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0024] Гиперпролиферативная клетка и/или клетка с неограниченным ростом может быть раковой клеткой, эндотелиальной клеткой, эпидермальной клеткой, фибробластом и/или иммунной клеткой. Гиперпролиферативная клетка и/или клетка с неограниченным ростом может быть раковой клеткой, например клеткой анального рака, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, холангиокарциномы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, гастроэзофагеального рака, рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), желудочно-кишечной стромальной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, гинекологического рака, рак головы и шеи, гематологического рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, мезотелиомы, нейроэндокринного рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака у детей, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, саркомы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака кожи, рака желудка, рака яичка или рака щитовидной железы.

[0025] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему любую модифицированную или

удаленную вирусную регуляторную последовательность, которая обеспечивает избирательную экспрессию вируса в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0026] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любой один или комбинацию вышеупомянутых рекомбинантных вирусов и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[0027] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения гиперпролиферативного заболевания у субъекта. Способ включает в себя введение субъекту эффективного количества описанного здесь рекомбинантного вируса для лечения гиперпролиферативного заболевания у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения гиперпролиферативное заболевание выбрано из рака, атеросклероза, ревматоидного артрита, псориаза, волчанки, идиопатического легочного фиброза, легочной гипертензии при склеродермии, астмы, фиброза почек, ХОБЛ, кистозного фиброза, десквамативной интерстициальной пневмонии, обычной интерстициальной пневмонии, дегенерации желтого пятна, рестеноза, ретинопатии, гиперпролиферативных нарушения фибробластов, склеродермии, гломерулонефрита, диабетической нефропатии, злокачественного нефросклероза, синдрома тромботической микроангиопатии, отторжения трансплантата, гломерулопатии и цирроза.

[0028] В некоторых вариантах осуществления изобретения гиперпролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из анального рака, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, холангиокарциномы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, гастроэзофагеального рака, рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), желудочно-кишечной стромальной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, гинекологического рака, рак головы и шеи, гематологического рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, мезотелиомы, нейроэндокринного рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака у детей, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, саркомы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака

кожи, рака желудка, рака яичка или рака щитовидной железы.

[0029] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста опухоли у субъекта. Способ включает в себя введение субъекту эффективного количества описанного здесь рекомбинантного вируса для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

[0030] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации опухолевой клетки. Способ включает в себя воздействие на клетку эффективным количеством описанных здесь рекомбинантных вирусов для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

[0031] В каждом из вышеупомянутых способов рекомбинантный вирус можно, например, вводить в комбинации с одной или несколькими терапиями, выбранными из хирургического вмешательства, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виро-терапии. В каждом из вышеупомянутых способов эффективное количество рекомбинантного вируса может составлять, например,  $10^2$ – $10^{15}$  бляшкообразующих единиц (БОЕ). В каждом из вышеуказанных способов субъект может быть, например, человеком, например ребенком, или животным.

[0032] В каждом из вышеупомянутых способов эффективное количество рекомбинантного вируса может быть, например, идентифицировано путем измерения иммунного ответа на антиген у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунный ответ на антиген измеряют путем инъекции субъекту антигена в место инъекции на коже субъекта и измерения величины индукции в месте инъекции.

[0033] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспрессии терапевтического трансгена в клетке-мишени. Этот способ включает в себя воздействие на клетку эффективным количеством описанного здесь рекомбинантного вируса для экспрессии целевого трансгена.

[0034] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу конструирования онколитического вируса. Способ включает в себя модификацию вирусного промотора на основе ТАТА-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0035] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу конструирования онколитического вируса. Способ включает в себя модификацию вирусного промотора на основе СААТ-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0036] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу конструирования онколитического вируса. Способ включает в себя модификацию вирусного промотора на основе ТАТА-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом, и/или модификацию вирусного промотора на основе СААТ-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0037] В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23, или последовательность, имеющую 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4. Изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим одну или несколько вышеуказанных нуклеиновых кислот.

[0038] В другом аспекте изобретение относится к способу получения рекомбинантного вируса. Способ включает в себя: (a) выращивание одной или нескольких из указанных выше клеток-хозяев в условиях, при которых клетка-хозяин продуцирует рекомбинантный вирус; и (b) очистку рекомбинантного вируса.

[0049] Эти и другие аспекты и преимущества настоящего

изобретения иллюстрируются следующими фигурами, подробным описанием и формулой изобретения.

#### Описание чертежей

[0040] Изобретение может быть более полно понято со ссылкой на следующие чертежи.

[0041] На **фигуре 1A** изображена нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-Δ350 (которая включает в себя делеции как TATA-бокса, так и CAAT-бокса) до старт-кодона гена E1a. Сайт делеции из 200 нуклеотидов из аденовирусной последовательности дикого типа обозначен дефисом. На **фигуре 1B** изображена нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-TATA до старт-кодона гена E1a. Сайт делеции 8 нуклеотидов из аденовирусной последовательности дикого типа обозначен дефисом. На **фигуре 1C** изображена нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-CAAT до старт-кодона гена E1a. Сайт делеции 9 нуклеотидов из аденовирусной последовательности дикого типа обозначен дефисом. На **фигуре 1D** изображена нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-CAAT-TATA до старт-кодона гена E1a. Сайты делеции 9 нуклеотидов и 8 нуклеотидов из аденовирусной последовательности дикого типа обозначены дефисами. На **фигуре 1E** изображена нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-CAAT-mTATA до старт-кодона гена E1a. Сайты делеции 9 нуклеотидов и 4 нуклеотидов из аденовирусной последовательности дикого типа обозначены дефисами. На **фигуре 1F** изображена нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad5 дикого типа до старт-кодона гена E1a. CAAT-бокс (GGTCAAAGT) и TATA-бокс (TATTTATA) обозначены рамками.

[0042] На **фигуре 2A** изображен вестерн-блот, показывающий уровни экспрессии E1a в раковых клетках Panc-1 в указанные часы после заражения Ad-Δ350 или Ad-TAV-255. На **фигуре 2B** изображен вестерн-блот, показывающий уровни экспрессии E1a в незлокачественных клетках WI-38 в указанные часы после заражения Ad-Δ350 или Ad-TAV-255. M представляет собой маркер, а НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0043] На **фигуре 3A** изображен вестерн-блот, показывающий уровни экспрессии E1a в раковых клетках Panc-1 через 72 часа после заражения Ad-Δ350 или Ad-TAV-255 при множественности заражения (МЗ) равной 3 или 5. На **фигуре 3B** изображен вестерн-блот, показывающий уровни экспрессии E1a в раковых клетках A549 через 72 часа после заражения Ad-Δ350 или Ad-TAV-255 при

множественности заражения (МЗ) равной 3 или 5. М представляет собой маркер, а НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0044] На **фигуре 4А** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток HCT116, клеток Panc-1 и клеток A549 в указанные моменты времени после инфицирования Ad-Δ350 при указанной МЗ. ИНЖИР. На **фигуре 4В** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым незлокачественных клеток MRC5 и клеток WI38 через 10 дней после заражения Ad-Δ350 или Ad-TAV-255 при указанной МЗ. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0045] На **фигуре 5** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток A549, Panc1, HCT116 и Hep3b в качестве неинфицированных контролей и через три дня после заражения Ad-CAAT или Ad-CAAT-mTATA при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0046] На **фигуре 6** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток ADS-12, ASPC1, HT-29 и Hep3b в качестве неинфицированных контролей и через три дня после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0047] На **фигуре 7** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток ADS-12, ASPC1, HT-29 и Hep3b в качестве неинфицированных контролей и через четыре дня после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k в при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0048] На **фигуре 8** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток Panc1, A549, MeWo и HCT-116 в качестве неинфицированных контролей и через три дня после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k в при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0049] На **фигуре 9** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток Panc1, A549, MeWo и HCT-116 в качестве неинфицированных контролей и через четыре дня после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.



[0050] На **фигуре 10** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток A549, HCT116, Hep3b и Panc1 в качестве неинфицированных контролей и через пять дней после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0051] На **фигуре 11** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток MeWo, HT29, ADS12 и ASPC в качестве неинфицированных контролей и через пять дней после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0052] На **фигуре 12** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым незлокачественных клеток WI38 в качестве неинфицированных контролей и через четыре дня после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k при указанной МЗ. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0053] На **фигуре 13** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым незлокачественных клеток WI38 в качестве неинфицированных контролей и через шесть дней после заражения Ad-TATA, Ad-CAAT, Ad-CAAT-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k при указанной МЗ. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет.

[0054] На **фигуре 14** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток Panc-1, клеток A549 и ADS12 через пять дней после заражения Ad-Δ350-Δ19k при указанной МЗ. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0055] На **фигуре 15** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток Panc-1, клеток A549 и ADS12 через пять дней после заражения Ad-Δ350-GM-CSF при указанной МЗ. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0056] На **фигуре 16** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток A549 через три дня после заражения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-Δ350-mGM-CSF и Ad-TAV-19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0057] На **фигуре 17** показано окрашивание кристаллическим

фиолетовым раковых клеток A549 через пять дней после заражения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-Δ350-mGM-CSF и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0058] На **фигуре 18** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток HCT116 через три дня после заражения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-Δ350-mGM-CSF и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0059] На **фигуре 19** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток HCT116 через пять дней после заражения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-Δ350-mGM-CSF и Ad-TAV-19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0060] На **фигуре 20** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток Her3b через три дня после заражения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-Δ350-mGM-CSF и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0061] На **фигуре 21** показано окрашивание кристаллическим фиолетовым раковых клеток MeWo через пять дней после заражения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-Δ350-mGM-CSF и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5. Кристаллический фиолетовый окрашивает жизнеспособные клетки в синий цвет. НК представляет собой неинфицированный контроль.

[0062] На **фигуре 22** изображена столбчатая диаграмма, показывающую экспрессию mGM-CSF при анализе с помощью ИФА после заражения клеток A549 Ad-Δ350-Δ19k или Ad-Δ350-mGM-CSF при МЗ равной 10.

[0063] На **фигуре 23** изображена столбчатая диаграмма, показывающую экспрессию mGM-CSF при анализе с помощью ИФА после заражения клеток ADS12 Ad-Δ350-Δ19k или Ad-Δ350-mGM-CSF при при указанной МЗ.

[0064] На **фигуре 24** показаны объемы опухолей у мышей, несущих подкожные опухоли ADS-12, которых лечили тремя внутриопухолевыми инъекциями или буфера, Ad-Δ350-Δ19k (обозначены 350-19k), либо Ad-TAV-Δ19k (обозначены TAV-19k). Каждая линия на этой фигуре представляет объем опухоли отдельной мыши.

[0065] На **фигуре 25** приведено изображение, иллюстрирующее вирусное цитопатическое действие в клетках HEK-293,

трансфицированных геномом аденовируса человека типа 35, имеющим делецию ТАТА-бокса в промоторе Е1А.

#### **Подробное описание**

[0065] Для осуществления транскрипции необходимо правильное расположения РНК-полимеразы II (РНК pol II) на короткой последовательности ДНК, называемой промотором. Промоторная последовательность часто включает в себя высококонсервативную А/Т-богатую последовательность, называемую ТАТА-боксом, часто фланкированную G/С-богатыми последовательностями, расположенными приблизительно в 30 парах оснований перед старт-сайтом транскрипции. Гены, у которых отсутствует идентифицируемый бокс ТАТА, обычно являются генами домашнего хозяйства, и их транскрипция зависит от транскрипционного фактора Sp1, тогда как гены, содержащие ТАТА-бокс, обычно являются в высокой степени регулируемые гены, и их экспрессия зависит от биологических сигнальных путей. ТАТА-бокс распознается фактором транскрипции IIB (TFIIB) и ТАТА-связывающим белком (TBP), которые необходимы для рекрутирования РНК pol II. Центральная роль ТАТА-бокса в транскрипции подтверждается экспериментальными наблюдениями нарушенной или инактивированной транскрипции после мутации или удаления ТАТА-бокса, например, путем удаления ТАТА-бокса в промоторе гена аденовируса Е1а (Wu et al. (1987) NATURE 326(6112): 512-5).

[0067] Дополнительная последовательность, присутствующая во многих промоторах, представляет собой СААТ-бокс. СААТ-бокс обычно расположен приблизительно в 60-100 основаниях перед старт-сайтом транскрипции гена и имеет консенсусную последовательность GG(T/C)СААТСТ. СААТ-бокс распознается основными связывающим факторами (также называемым ядерным фактором Y или NF-Y) и ССААТ/энхансер-связывающим белкам (С/EBPs).

[0068] Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что для некоторых вирусных промоторов, например промотора гена Е1а аденовируса типа 5 (Ad5), ТАТА и/или СААТ-бокс, хотя и является необходимым для управления транскрипцией в нормальных здоровых клетках, но не является необходимым для активной транскрипции в раковых клетках. Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему: (i) промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на

основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом; и/или (ii) промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. Промотор на основе ТАТА-бокса и промотор на основе СААТ-бокса могут быть одним и тем же промотором (например, промотором E1a Ad5) или могут быть разными промоторами.

[0069] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0070] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом.

[0071] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, содержащему любую модифицированную или удаленную вирусную регуляторную последовательность, которая обеспечивает избирательную экспрессию вируса в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. Типичные вирусные регуляторные последовательности в дополнение к ТАТА- и СААТ-боксам включают в себя иницирующую последовательность Ad5 E1a и промоторный элемент Ad5 E1a после ТАТА-бокса.

[0072] Используемый здесь термин «ТАТА-бокс» относится к нуклеотидной последовательности, которая способна связываться с ТАТА-связывающим белком (ТВР). ТАТА-бокс, как правило, содержит А/Т-богатый 8-нуклеотидный сегмент, содержащий основную последовательность ТАТААА (SEQ ID NO: 1), где этот 8-нуклеотидный сегмент фланкирован G/C-богатыми

последовательностями, однако ТАТА-бокс может иметь небольшое сходство с типичной последовательностью ТАТА.

[0073] Используемый здесь термин «модифицированный ТАТА-бокс» относится к ТАТА-боксу, который имеет делецию, замену или добавление одного или нескольких нуклеотидов относительно последовательности ТАТА-бокса дикого типа.

[0074] Используемый здесь термин «функциональный ТАТА-бокс» относится к ТАТА-боксу, который способен связываться с ТВР, например, к ТАТА-боксу, который имеет, по меньшей мере, 100%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 50% или, по меньшей мере, 40% от активности связывания с ТВР соответствующей последовательности ТАТА-бокса дикого типа. Используемый здесь термин «нефункциональный ТАТА-бокс» относится к ТАТА-боксу, который, например, имеет менее 30%, менее 20%, менее 10% или 0% от активности связывания с ТВР соответствующей последовательности ТАТА-бокса дикого типа. Анализы для определения того, связывается ли ТВР с ТАТА-боксом, известны в данной области техники. Типичные анализы связывания включают в себя анализ сдвига электрофоретической подвижности, анализ иммунопреципитации хроматина и анализ футпринтинга ДНКазы.

[0075] Используемый здесь термин «промотор на основе ТАТА-бокса» относится к любому генному промотору, который содержит ТАТА-бокс.

[0076] Используемый здесь термин «промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса» относится к промотору на основе ТАТА-бокса, который был модифицирован путем делеции, замены или добавления одного или нескольких нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию одного или нескольких нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, состоит из делеции одного или нескольких нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию всего ТАТА-бокса последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления

изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, состоит из делеции всего ТАТА-бокса последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию всего промотора на основе ТАТА-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, состоит из делеции всего промотора на основе ТАТА-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, не включает в себя добавление или замену отдельной функциональной промоторной последовательностью.

[0077] В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию от 1 до 300, от 1 до 200, от 1 до 100, от 1 до 75, от 1 до 50, от 1 до 25, от 1 до 10, от 1 до 8, от 1 до 4 нуклеотидов, от 4 до 300, от 4 до 200, от 4 до 150, от 4 до 100, от 4 до 75, от 4 до 50, от 4 до 25, от 4 до 10, от 4 до 8, от 8 до 300, от 8 до 200, от 8 до 150, от 8 до 100, от 8 до 75, от 8 до 50, от 8 до 25, от 8 до 10, от 10 до 300, от 10 до 200, от 10 до 150, от 10 до 100, от 10 до 75, от 10 до 50, от 10 до 25, от 25 до 300, от 25 до 200, от 25 до 150, от 25 до 100, от 25 до 75, от 25 до 50, от 50 до 300, от 50 до 200, от 50 до 150, от 50 до 100, от 50 до 75, от 75 до 300, от 75 до 200, от 75 до 150, от 75 до 100, от 100 до 300, от 100 до 200, от 100 до 150, от 150 до 300, от 150 до 200 или от 200 до 300 нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию примерно 10, примерно 25, примерно 50, примерно 75, примерно 100, примерно 150, примерно 200 или примерно 300 нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию примерно 200 нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса,

включает в себя делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, включает в себя делецию 4 или 8 нуклеотидов последовательности промотора на основе ТАТА-бокса дикого типа.

[0078] Используемый здесь термин «СААТ-бокс» относится к нуклеотидной последовательности, которая способна связываться с белком С/ЕВР или NF- $\Upsilon$ . СААТ-бокс, как правило, содержит консенсусную последовательность GG(T/C)СААТСТ.

[0079] Используемый здесь термин «модифицированный СААТ-бокс» относится к СААТ-боксу, который имеет делецию, замену или добавление одного или нескольких нуклеотидов относительно последовательности СААТ-бокса дикого типа.

[0080] Используемый здесь термин «функциональный СААТ-бокс» относится к СААТ-боксу, который способен связываться с белком С/ЕВР или NF- $\Upsilon$ , например, к СААТ-боксу, который имеет, по меньшей мере, 100%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 50% или, по меньшей мере, 40% от активности связывания С/ЕВР или NF- $\Upsilon$  соответствующей последовательности СААТ-бокса дикого типа. Используемый здесь термин «нефункциональный СААТ-бокс» относится к СААТ-боксу, который, например, имеет менее 30%, менее 20%, менее 10% или 0% от активности связывания с С/ЕВР или NF- $\Upsilon$  соответствующей последовательности СААТ-бокса дикого типа. Анализы для определения того, связывается ли белок С/ЕВР или NF- $\Upsilon$  с СААТ-боксом, известны в данной области техники. Типичные анализы связывания включают в себя анализ сдвига электрофоретической подвижности, анализ иммунопреципитации хроматина и анализ футпринтинга ДНКазы.

[0081] Используемый здесь термин «промотор на основе СААТ-бокса» относится к любому генному промотору, который содержит СААТ-бокс.

[0082] Используемый здесь термин «промотор на основе модифицированного СААТ-бокса» относится к промотору на основе СААТ-бокса, который был модифицирован путем делеции, замены или добавления одного или нескольких нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию одного или нескольких нуклеотидов последовательности

промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, состоит из делеции одного или нескольких нуклеотидов последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию всего СААТ-бокса последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, состоит из делеции всего СААТ-бокса последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию всего промотора на основе СААТ-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, состоит из делеции всего промотора на основе СААТ-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, не включает добавление или замену отдельной функциональной промоторной последовательностью.

[0083] В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию от 1 до 300, от 1 до 200, от 1 до 100, от 1 до 75, от 1 до 50, от 1 до 25, от 1 до 10, от 1 до 8, от 1 до 4 нуклеотидов, от 4 до 300, от 4 до 200, от 4 до 150, от 4 до 100, от 4 до 75, от 4 до 50, от 4 до 25, от 4 до 10, от 4 до 8, от 8 до 300, от 8 до 200, от 8 до 150, от 8 до 100, от 8 до 75, от 8 до 50, от 8 до 25, от 8 до 10, от 10 до 300, от 10 до 200, от 10 до 150, от 10 до 100, от 10 до 75, от 10 до 50, от 10 до 25, от 25 до 300, от 25 до 200, от 25 до 150, от 25 до 100, от 25 до 75, от 25 до 50, от 50 до 300, от 50 до 200, от 50 до 150, от 50 до 100, от 50 до 75, от 75 до 300, от 75 до 200, от 75 до 150, от 75 до 100, от 100 до 300, от 100 до 200, от 100 до 150, от 150 до 300, от 150 до 200 или от 200 до 300 нуклеотидов последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию примерно



10, примерно 25, примерно 50, примерно 75, примерно 100, примерно 150, примерно 200 или примерно 300 нуклеотидов последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию примерно 200 нуклеотидов последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 нуклеотидов последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя делецию 9 нуклеотидов последовательности промотора на основе СААТ-бокса дикого типа.

[0084] 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. В некоторых вариантах осуществления изобретения ген (кодирующая область) функционально связан с промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и или промотором на основе модифицированного СААТ-бокса.

[0085] 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 субъекте.

[0086] В некоторых вариантах осуществления изобретения

рекомбинантный вирус проявляет селективную экспрессию гена, функционально связанного с промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или промотором на основе модифицированного СААТ-бокса в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом, например раковой клетке по сравнению с негиперпролиферативной клеткой и/или клеткой с ограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия гена в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от экспрессии гена в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус не обнаруживает детектируемой экспрессии гена в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена, функционально связанного с промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса, рекомбинантным вирусом негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом, составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от экспрессии гена соответствующим вирусом без промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный вирус проявляет селективную экспрессию раннего гена, например аденовирусного гена Е1а или Е1b. Экспрессия гена может быть определена любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, при помощи Вестерн-блоттинга, как описано здесь в Примере 2.

[0087] В некоторых вариантах осуществления изобретения селективная экспрессия гена, функционально связанного с промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса, например, раннего гена, рекомбинантным вирусом в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом, например раковой клетке, приводит к избирательной репликации вируса в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения репликация вируса в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом составляет примерно 90%,

примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от репликации вируса гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения репликация вируса в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от репликации соответствующего вируса без промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса. Репликацию вируса можно определить любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, путем анализа экспрессии вирусных белков, например, с помощью вестерн-блоттинга, как описано здесь в Примере 2, путем анализа опосредованного вирусами лизиса, например, путем окрашивания кристаллическим фиолетовым, как описано здесь в Примере 3 или при помощи количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

[0088] В некоторых вариантах осуществления изобретения селективная экспрессия гена, функционально связанного с промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса, например, раннего гена, рекомбинантным вирусом в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом, например раковой клетке, приводит к избирательному вирус-опосредованному лизису (то есть цитолитической активности) гиперпролиферативной клетки и/или клетки с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус-опосредованный лизис негиперпролиферативной клетки и/или клетки с ограниченным ростом, составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от вирус-опосредованного лизиса гиперпролиферативной клетки и/или клетки с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус не обнаруживает вирус-опосредованного лизиса негиперпролиферативной клетки и/или клетки с ограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус-опосредованный лизис негиперпролиферативной клетки и/или клетки с ограниченным ростом, составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% вирус-опосредованного лизиса клетки соответствующим вирусом без

промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса. Опосредованный вирусом лизис может быть определен любым подходящим способом, известным в данной области техники, например путем окрашивания кристаллическим фиолетовым, как описано в здесь Примере 3.

[0089] В некоторых вариантах осуществления изобретения селективная экспрессия гена, функционально связанного с промотором на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса, например раннего гена, рекомбинантным вирусом в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом, например раковой клетке, приводит к избирательной экспрессии терапевтического трансгена рекомбинантным вирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия терапевтического трансгена в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом, составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от экспрессии терапевтического трансгена в гиперпролиферативной клетке и/или клетке с неограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус не имеет обнаруживаемой экспрессии терапевтического трансгена в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия терапевтического трансгена в негиперпролиферативной клетке и/или клетке с ограниченным ростом, составляет примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20%, примерно 10% или примерно 5% от экспрессии терапевтического трансгена в клетке соответствующим вирусом без промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса. Экспрессия терапевтического трансгена может быть определена любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, при помощи ИФА, как описано в здесь в Примере 4.

[0090] Гиперпролиферативная клетка и/или клетка с неограниченным ростом может быть раковой клеткой, эндотелиальной клеткой, эпидермальной клеткой, фибробластом и/или иммунной клеткой. Гиперпролиферативная клетка и/или клетка с неограниченным ростом может быть раковой клеткой, например клеткой анального рака, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной

железы, карциномы, холангиокарциномы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, гастрозофагеального рака, рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), желудочно-кишечной стромальной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, гинекологического рака, рак головы и шеи, гематологического рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, мезотелиомы, нейроэндокринного рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака у детей, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, саркомы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака кожи, рака желудка, рака яичка или рака щитовидной железы. В других вариантах осуществления изобретения гиперпролиферативная клетка появляется в результате гиперпролиферативного нарушения. Типичные гиперпролиферативные нарушения включают в себя нарушения пролиферации кровеносных сосудов (например, рестеноз, ретинопатию и атеросклероз), фиброзные расстройства (например, цирроз, например, цирроз печени (который может быть вторичным по отношению к вирусной инфекции, такой как гепатит)), мезангиальные расстройства (например, заболевания почек человека, например, гломерулонефрит, диабетическая нефропатия, злокачественный нефросклероз, синдромы тромботической микроангиопатии, отторжение трансплантата и гломерулопатия), предраковые заболевания (например, гиперплазия или дисплазия), аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, псориаз, волчанку, идиопатический легочный фиброз, легочную гипертензию при склеродермии, астму, фиброз почек, ХОБЛ, кистозный фиброз, десквамативную интерстициальную пневмонию, обычную интерстициальную пневмонию, дегенерацию желтого пятна, гиперпролиферативные нарушения фибробластов и склеродермию.

[0091] Идентичность по 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 мегаблеста/3 для белков; -y, сброс (X) для расширений блеста 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 в себя, 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.

### I. Вирусы

[0092] 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 в себя 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 в себя экспрессию экзогенных трансгенов. 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. WO98/27216. 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 применяться в генной терапии человека, поскольку, как утверждается, они избегают антител против аденовирусных векторов человека. Такие векторы описаны в публикации Международной патентной заявки No. WO97/06826.

[0093] Вирусы, применимые в практике настоящего изобретения, содержат промотор на основе ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор на основе ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса является промотором для гена ранней фазы, например, гена, кодирующего белок, который продуцируется после проникновения в клетку-хозяина, но до репликации, что обычно инициирует репликацию генома и экспрессию поздних генов.

[0094] Примеры вирусов с промоторами ранних генов на основе ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса включают в себя вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), вирус простого герпеса типа 1, аденоассоциированный вирус, вирус гриппа, реовирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус болезни Ньюкасла, вирус осповакцины, полиовирус, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус Синдбис (SIN) и вирус Сендай (SV).

[0095] 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 в себя подроды А–F, а также их отдельные серотипы, отдельные серотипы и подроды А–F, включают в себя без ограничений аденовирусы человека типов 1, 2, 3, 4, 4а, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Ad11а и Ad11р), 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 типов 2, 5 и 35. Если не указано иное, то все номера нуклеотидов аденовируса типа 5 относятся к эталонной последовательности NCBI AC\_000008.1, которая приводится здесь в последовательности SEQ ID NO: 8, и все номера нуклеотидов аденовируса типа 35 относятся к эталонной последовательности NCBI AC\_000019.1, которая приводится здесь в последовательности SEQ ID NO: 24. Последовательность приводимой в качестве примера векторной плазмиды, которая кодирует 5'-конец генома аденовируса типа 5 (pXC1) приводится здесь в



последовательности SEQ ID NO: 2.

[0096] Цикл репликации аденовируса имеет две фазы: раннюю фазу, во время которой экспрессируются четыре единицы транскрипции E1, E2, E3 и E4, и позднюю фазу, которая наступает 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 и необходимы для роста вируса.

[0097] В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор на основе модифицированного TATA-бокса представляет собой аденовирусный промотор E1a, E1b или E4. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор на основе модифицированного TATA-бокса представляет собой аденовирусный промотор E1a, например, промотор Ad5 E1a. Модификация, включенная в промотор на основе модифицированного TATA-бокса, может, например, включать в себя делецию всего TATA-бокса промотора E1a, например, включать в себя делецию, соответствующую нуклеотидам от -27 до -24 промотора E1a Ad5. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -27 до -24, от -31 до -24, от -44 до +54 или от -146 до +54 промотора Ad5 E1a, которые соответствуют, соответственно, нуклеотидам с 471 по 474, с 467 по 474, с 454 по 551 и с 352 по 551 последовательности SEQ ID NO: 2 и нуклеотидам с 472 по 475, с 468 по 475, с 455 по 552 и с 353 по 552 последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -29 до -26, от -33 до -26, от -44 до +52 или от -148 до +52 промотора Ad5 E1a.

[0098] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от примерно -50 до примерно -10, от примерно -50 до примерно -20, от примерно -50 до примерно -30, от примерно -50 до примерно -40, от примерно -40 до примерно -10, от примерно -40 до примерно -20, от примерно -40 до примерно -30, от примерно -30 до примерно -10, от примерно -30 до примерно -20 или от примерно -20 до примерно -10 промотора Ad5 E1a.

[0099] В некоторых вариантах осуществления изобретения

вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к получению вируса, содержащего последовательность CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7), AGTGCCCG (SEQ ID NO: 12) или TATTCCCG (SEQ ID NO: 13), в результате объединения двух полинуклеотидных последовательностей, которые в противном случае фланкировали бы удаленную полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит последовательность CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7), AGTGCCCG (SEQ ID NO: 12) или TATTCCCG (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 по последовательности с последовательностью CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7), AGTGCCCG (SEQ ID NO: 12) или TATTCCCG (SEQ ID NO: 13).

[00100] В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор на основе модифицированного CAAT-бокса представляет собой аденовирусный промотор E1a, E1b или E4. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор на основе модифицированного CAAT-бокса представляет собой аденовирусный промотор E1a, например, промотор Ad5 E1a. Модификация, включенная в промотор на основе модифицированного CAAT-бокса, может, например, включать в себя делецию всего CAAT-бокса промотора E1a, например, включать в себя делецию, соответствующую нуклеотидам от -76 до -68 промотора E1a аденовируса типа 5, что соответствует нуклеотидам с 422 по 430 последовательности SEQ ID NO: 2 и нуклеотидам с 423 по 431 последовательности SEQ ID NO: 8.

[00101] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от примерно -90 до примерно -50, от примерно -90 до примерно -60, от примерно -90 до примерно -70, от примерно -90 до примерно -80, от примерно -80 до примерно -50, от примерно -80 до примерно -60, от примерно -80 до примерно -70, от примерно -70 до примерно -50, от примерно -70 до примерно -60 или от примерно -60 до примерно -50 промотора Ad5 E1a.

[00102] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к получению вируса, содержащего последовательность TTCCGTGGCG (SEQ ID NO: 14), которая является результатом объединения двух полинуклеотидных последовательностей, которые в противном случае фланкировали бы удаленную полинуклеотидную последовательность. В

некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит последовательность TTCCGTGGCG (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 по последовательности с TTCCGTGGCG (SEQ ID NO: 14).

[00103] В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от примерно -200 до примерно +50, от примерно -175 до примерно +50, от примерно -150 до примерно +50, от примерно -125 до примерно +50, от примерно -100 до примерно +50, от примерно -75 до примерно +50, от примерно -50 до примерно +50, от примерно -25 до примерно +50, от примерно +1 до примерно +50, от примерно +25 до примерно +50, от примерно -200 до примерно +25, от примерно -175 до примерно +25, от примерно -150 до примерно +25, от примерно -125 до примерно +25, от примерно -100 до примерно +25, от примерно -75 до примерно +25, от примерно -50 до примерно +25, от примерно -25 до примерно +25, от примерно +1 до примерно +25, от примерно -200 до примерно +1, от примерно -175 до +1, от -150 до +1, от -125 до +1, от -100 до примерно +1, от примерно -75 до примерно +1, от примерно -50 до примерно +1, от примерно -25 до примерно +1, от примерно -200 до примерно -25, от примерно -175 до примерно -25, от примерно -150 до примерно -25, от примерно -125 до примерно -25, от примерно -100 до примерно -25, от примерно -75 до примерно -25, от примерно -50 до примерно -25, от примерно -200 до примерно -50, от примерно -175 до примерно -50, от примерно -150 до примерно -50, от примерно -125 до примерно -50, от примерно -100 до примерно -50, от примерно -75 до примерно -50, от примерно -200 до примерно -75, от примерно -175 до примерно -75, от примерно -150 до примерно -75, от примерно -125 до примерно -75, от примерно -100 до примерно -75, от примерно -200 до примерно -100, от примерно -175 до примерно -100, от примерно -150 до примерно -100, от примерно -125 до примерно -100, от примерно -200 до примерно -125, от примерно -175 до примерно -125, от примерно -150 до примерно -125, от примерно -200 до примерно -150, от примерно -175 до примерно -150 или от примерно -200 до примерно -175 промотора Ad5 E1a.

[00104] В некоторых вариантах осуществления изобретения, в дополнение к промотору на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса, вирус имеет одну или несколько дополнительных модификаций регуляторной последовательности или промотора.

Дополнительная модификация регуляторной последовательности или промотора включает в себя делецию, замену или добавление одного или нескольких нуклеотидов по сравнению с последовательностью дикого типа регуляторной последовательности или промотора. Дополнительная модификация может быть примыкающей или удаленной от промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса и/или СААТ-бокса.

[00105] В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительная модификация регуляторной последовательности или промотора включает в себя модификацию последовательности сайта связывания фактора транскрипции для уменьшения сродства к фактору транскрипции, например, путем удаления его части или путем вставки точечной мутации в сайт связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительная модифицированная регуляторная последовательность усиливает экспрессию в раковых клетках, но ослабляет экспрессию в нормальных клетках.

[00106] В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительная модификация регуляторной последовательности или промотора включает в себя дополнительную модификацию регуляторной последовательности E1a. Регуляторная последовательность E1a содержит пять сайтов связывания для фактора транскрипции Рea3, обозначенных как Рea3 I, Рea3 II, Рea3 III, Рea3 IV и Рea3 V, где Рea3 I является сайтом связывания Рea3, наиболее проксимальным к старт-сайту E1a, и Рea3 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: Рea3 I, E2F I, Рea3 II, E2F II, Рea3 III, Рea3 IV и Рea3 V.

[00107] 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 (Рea3 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 в себя 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.

[00108] 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.

[00109] 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 Rea3 II, Rea3 III, Rea3 IV и/или Rea3 V или их функциональных частей. В некоторых вариантах осуществления изобретения вирус имеет делецию области из 50 пар оснований, расположенной от -305 до -255 нуклеотидов перед сайтом инициации E1a, далее именуется как делеция TAV-255. 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: 8), 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: 11).

[00110] Раскрытый рекомбинантный вирус может содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует терапевтический трансген. Терапевтический трансген может кодировать терапевтическую нуклеиновую кислоту, например антисмысловую РНК или рибозимную РНК. Терапевтический трансген может кодировать терапевтический пептид или полипептид, например, апоптотический агент, антитело, CTL-чувствительный пептид, цитокин, цитолитический агент, цитотоксический агент, фермент, гетерологичный антиген, экспрессированный на поверхности опухолевой клетки, чтобы вызвать иммунный ответ, иммуностимулирующий или иммуномодулирующий агент, интерферон, литический пептид, онкопротеин, полипептид, который катализирует процессы, приводящие к гибели клеток, полипептид, который исправляет генетические дефекты в соматических клетках, белок-супрессор опухолей, вакцинный антиген и любые их комбинации.

[00111] В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический трансген кодирует терапевтический полипептид, выбранный из ацетилхолина, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-1, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-L1, BORIS/CTCF, CD19, CD20, CD80, CD86, CD137L, CD154, DKK1/Wnt, ICAM-1, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-17, IL-23, IL-23A/p19, интерферона-гамма, TGF- $\beta$ , ловушки TGF- $\beta$ , FGF, IL-24, IL-27, IL-35, MAGE, NY-ESO-1, p53 и тимидинкиназы. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический трансген представляет собой ловушку TGF- $\beta$ . Белки-ловушки TGF- $\beta$ , подходящие для использования в настоящем изобретении, описаны в заявке на патент США No. 15/717199, поданной 27 сентября 2017 года.

[00112] Аденовирусный ген E1b-19k функционирует в основном как антиапоптотический ген и является гомологом клеточного антиапоптотического гена BCL-2. Поскольку гибель клеток-хозяев до созревания следующего поколения вирусных частиц будет ограничивать репликацию вируса, E1b-19k экспрессируется как часть кассеты E1 для предотвращения преждевременной гибели клеток, что позволяет инфекции протекать и давать зрелые

вирионы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантному вирусу, который включает в себя сайт вставки E1b-19K, например, аденовирус имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический трансген, встроенный в сайт вставки E1b-19K.

[00113] 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 в последовательности SEQ ID NO: 8) и сайт-сайтом E1b-55K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей сайт-кодон E1b-55k, например, соответствующей нуклеотидам 2019-2021 в последовательности SEQ ID NO: 8). Подразумевается, что во всем тексте описания и формуле изобретения вставка между двумя сайтами, например вставка между (i) сайт-сайтом первого гена (например, E1b-19k) и сайт-сайтом второго гена (например, E1b-55K), (ii) сайт-сайтом первого гена и стоп-сайтом второго гена, (iii) стоп-сайтом первого гена и сайт-сайтом второго гена, или (iv) стоп-сайтом первого гена и стоп-сайтом второго гена означает, что все или часть нуклеотидов, составляющих данный сайт-сайт или стоп-сайт, фланкирующий вставку, могут присутствовать или отсутствовать в конечном вирусе. Аналогично, под вставкой между двумя нуклеотидами подразумевается, что фланкирующий вставку нуклеотиды могут присутствовать или отсутствовать в конечном вирусе.

[00114] 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 в последовательности SEQ ID NO 8) и стоп-сайтом E1b-19K (то есть нуклеотидной последовательностью, кодирующей стоп-кодон E1b-19k, например, соответствующей нуклеотидам 2242-2244 в последовательности SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию от примерно 100 до примерно 305, от примерно 100 до примерно 300, от примерно 100 до примерно 250, от примерно 100 до примерно 200, от примерно 100 до примерно 150, от примерно 150 до примерно 305 от примерно 150 до примерно 300, от примерно 150 до примерно 250 или от примерно 150 до примерно 200 нуклеотидов, примыкающих к сайт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах

осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию примерно 200 нуклеотидов, например, 203 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E1b-19K. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт вставки E1b-19K содержит делецию, соответствующую нуклеотидам 1714-1916 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8), или нуклеотидная последовательность, кодирующая терапевтический трансген, встроена между нуклеотидами, соответствующими с 1714 по 1916 в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая терапевтический трансген, встроена между последовательностями CTGACCTC (SEQ ID NO: 9) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 10), например, рекомбинантный аденовирус содержит в ориентации от 5'-конца к 3'-концу последовательность CTGACCTC (SEQ ID NO: 9), нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический трансген, и последовательность TCACCAGG (SEQ ID NO: 10). Последовательности CTGACCTC (SEQ ID NO: 9) и TCACCAGG (SEQ ID NO: 10) определяют уникальные фланкирующие последовательности для сайта вставки E1b-19K в геноме Ad5 (SEQ ID NO: 8). Подразумевается, что во всем тексте описания и формуле изобретения делеция, примыкающая к сайту, например делеция, примыкающая к старт-сайту гена, или делеция, примыкающая к стоп-сайту гена, означает, что делеция может включать в себя удаление всех, части или ни одного из нуклеотидов, составляющих данный старт-сайт или стоп-сайт.

[00115] 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 в последовательности SEQ ID NO: 23) и правым инвертированным концевым повтором (ITR; например, соответствующим нуклеотидам 35836-35938 в последовательности 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 в последовательности SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает в себя делецию нуклеотидной последовательности между



старт-сайтом E4-ORF6/7 и старт-сайтом E4-ORF1. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает в себя делецию от примерно 500 до примерно 2500, от примерно 500 до примерно 2000, от примерно 500 до примерно 1500, от примерно 500 до примерно 1000, от примерно 1000 до примерно 2500, от примерно 1000 до примерно 2000, от примерно 1000 до примерно 1500, от примерно 1500 до примерно 2500, от примерно 1500 до примерно 2000 или от примерно 2000 до примерно 2500 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает в себя делецию от примерно 250 до примерно 1500, от примерно 250 до примерно 1250, от примерно 250 до примерно 1000, от примерно 250 до примерно 750, от примерно 250 до примерно 500, от 500 до примерно 1500, от примерно 500 до примерно 1250, от примерно 500 до примерно 1000, от примерно 500 до примерно 750, от примерно 750 до примерно 1500, от примерно 750 до примерно 1250, от примерно 750 до примерно 1000, от примерно 1000 до примерно 1500, или от примерно 1000 до примерно 1250 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7. В некоторых вариантах осуществления изобретения делеция E4 включает в себя делецию примерно 1450 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7, например, делеция E4 включает в себя делецию примерно 1449 нуклеотидов, примыкающих к старт-сайту E4-ORF6/7. В некоторых вариантах осуществления делеция E4 включает в себя делецию, соответствующую нуклеотидам 34078-35526 генома Ad5 (SEQ ID NO: 23).

## **II. Способы получения вирусов**

[00116] 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 в себя 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).

[00117] Альтернативные технологии для получения аденовируса включают в себя использование системы бактериальной искусственной хромосомы (BAC), бактериальной рекомбинации *in vivo* в бактериальном штамме *recA*<sup>-</sup> с использованием двух плазмид, содержащих комплементарные аденовирусные последовательности, и системы искусственной хромосомы дрожжей (YAC).

[00118] После продуцирования инфекционные вирусные частицы выделяют из культуры и при необходимости очищают. Типичные стадии очистки могут включать в себя 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 композиции и способы лечения**

[00119] 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 в себя буферы, растворители, дисперсионные среды, покрытия, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

[00120] Фармацевтические композиции, содержащие раскрытые здесь рекомбинантные аденовирусы, могут находиться в единичной дозированной 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, трансдермальное, местное, 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 в себя 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.

[00121] Для внутривенного введения подходящие носители включают в себя 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.

[00122] 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.

[00123] 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 препаратом или способом введения.

[00124] 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. Состав лекарственных препаратов 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.

[00125] Раскрытые здесь рекомбинантные аденовирусы могут применяться для лечения при различных медицинских показаниях. Например, рекомбинантные вирусы могут применяться для лечения различных гиперпролиферативных заболеваний, например рака. Гиперпролиферативные клетки, например раковые клетки, подвергаются воздействию терапевтически эффективного количества рекомбинантного аденовируса, чтобы ингибировать или уменьшать пролиферацию раковых клеток. Настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта. Этот способ включает в себя введение субъекту эффективного количества рекомбинантного

аденовируса настоящего изобретения или отдельно, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом для лечения рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение эффективного количества рекомбинантного аденовируса субъекту снижает опухолевую нагрузку у этого субъекта, 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%.

[00126] Используемый здесь термин «лечить», «способ лечения» и «лечение» означает лечение заболевания у субъекта, например у человека. Это включает в себя: (a) подавление заболевания, то есть прекращение его развития; и (b) облегчение заболевания, то есть вызывание регрессии болезненного состояния. Используемые здесь термины «субъект» и «пациент» относятся к организму, подлежащему лечению описанными здесь способами и композициями. Такие организмы предпочтительно включают в себя без ограничений млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек и тому подобное), и более предпочтительно включают в себя людей.

[00127] Примеры раковых заболеваний включают в себя солидные опухоли, опухоли мягких тканей, гематопозитические опухоли и метастатические поражения. Примеры гематопозитических опухолей включают в себя 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, миелодиспластический синдром (МДС), лимфому, болезнь Ходжкина, злокачественную лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, множественную миелому или синдром Рихтера (преобразование Рихтера). Примеры солидных опухолей включают в себя 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 пузыря, яичники, матку, шейку матки, эндометрий, предстательную железу, яичко), ЦНС (например, нервные или глиальные клетки, например, нейробластома или глиома) или кожу (например, меланома).

[00128] В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбран из группы, состоящей из анального рака, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, холангиокарциномы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, гастроэзофагеального рака, рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), желудочно-кишечной стромальной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, гинекологического рака, рак головы и шеи, гематологического рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, мезотелиомы, нейроэндокринного рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака у детей, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, саркомы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака кожи, рака желудка, рака яичка и рака щитовидной железы.

[00129] Дополнительные примеры гиперпролиферативных заболеваний включают в себя нарушения пролиферации кровеносных сосудов (например, рестеноз, ретинопатию и атеросклероз), фиброзные расстройства (например, цирроз, например, цирроз печени (который может быть вторичным по отношению к вирусной инфекции, такой как гепатит)), мезангиальные расстройства (например, заболевания почек человека, например, гломерулонефрит, диабетическая нефропатия, злокачественный нефросклероз, синдромы тромботической микроангиопатии, отторжение трансплантата и гломерулопатия), предраковые заболевания (например, гиперплазия или дисплазия), аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, псориаз, волчанку, идиопатический легочный фиброз, легочную гипертензию при склеродермии, астму, фиброз почек, ХОБЛ, кистозный фиброз, десквамативную интерстициальную пневмонию, обычную интерстициальную пневмонию, дегенерацию желтого пятна, гиперпролиферативные нарушения фибробластов и склеродермию.

[00130] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус вводят субъекту в комбинации с одной или несколькими терапиями, например хирургическим

вмешательством, лучевой терапией, химиотерапией, иммунотерапией, гормональной терапией или виротерапией.

[00131] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус настоящего изобретения вводят в комбинации с ингибитором тирозинкиназы, например эрлотинибом.

[00132] В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный аденовирус настоящего изобретения вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки, например антителом против CTLA-4, антителом против PD-1 или антителом против PD-L1. Типичные антитела против PD-1 включают в себя, например, ниволумаб (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb Co.), пембролизумаб (Keytruda®, Merck Sharp & Dohme Corp.), PDR001 (Novartis Pharmaceuticals) и пидилизумаб (CT-011, Cure Tech). Типичные антитела против PD-L1 включают в себя, например, атезолизумаб (Tecentriq®, Genentech), дувалумаб (AstraZeneca), MEDI4736, авелумаб и BMS 936559 (Bristol Myers Squibb Co.).

[00133] Используемый здесь термин «в комбинации» означает, что два (или более) различных способа лечения проводятся субъекту в течение заболевания субъекта, 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.

[00134] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективное количество рекомбинантного вируса идентифицируют путем измерения иммунного ответа на антиген у субъекта, и/или способ лечения субъекта дополнительно включает в себя измерение иммунного ответа на антиген у субъекта. Гиперпролиферативные заболевания, например раковые заболевания, могут характеризоваться иммуносупрессией, и измерение иммунного ответа на антиген у субъекта может указывать на уровень иммуносупрессии у субъекта. Соответственно, измерение иммунного ответа на антиген у субъекта может указывать на эффективность лечения и/или эффективное количество рекомбинантного вируса. Иммунный ответ на антиген у субъекта может быть измерен любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунный ответ на антиген измеряют путем инъекции субъекту антигена в место инъекции на коже субъекта 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 субъекта (например, гамма-интерферона, IL-4 и/или IL-5) при воздействии антигена.

[00135] Во всем тексте описании, где вирусы, композиции и системы описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие определенные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие конкретные этапы, предполагается, что, кроме того, существуют композиции, устройства и системы настоящего изобретения, которые в основном состоят из перечисленных компонентов или состоят из перечисленных компонентов, и что существуют процессы и способы настоящего изобретения, которые в основном состоят из перечисленных этапов способа или состоят из них.

[00136] 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.

[00137] 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 конкретное химическое соединение, это химическое соединение можно использовать в различных вариантах осуществления композиций настоящего изобретения и/или в способах настоящего изобретения, 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 данной заявке, могут быть применимы ко всем аспектам изобретения, описанным и изображенным в данной заявке.

[00138] Следует понимать, что выражение «по меньшей мере, один из» включает в себя 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.

[00139] Использование термина «включать в себя», «включает в себя», «включающий в себя», «иметь», «имеет», «имеющий», «содержать», «содержит» или «содержащий», включая их грамматические эквиваленты, следует понимать, как правило, как открытое и неограничивающее, например, не исключая дополнительные не указанные элементы или этапы, если иное не указано или иным образом не следует из контекста.

[00140] 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.

[00141] Когда использование термина «примерно» предшествует количественному значению, настоящее изобретение также включает в себя само конкретное количественное значение, если специально не указано иное. Используемый здесь термин «примерно» относится к отклонению  $\pm 10\%$  от номинального значения, если иное не указано или не предполагается.

[00142] Необходимо понимать, что порядок этапов или порядок выполнения определенных действий не имеет значения, если настоящее изобретение остается работоспособным. Кроме того, два или более этапов или действий могут быть выполнены одновременно.

[00143] Использование в данной 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**

[00144] Следующие примеры являются только иллюстративными и не предназначены для какого-либо ограничения объема или содержания изобретения.

#### **Пример 1: Конструирование плазмиды и аденовируса**

[00145] В этом примере описано получение рекомбинантных аденовирусов типа 5 (Ad5) с делециями в области промотора E1a, которые включают в себя TATA-бокс и/или CAAT-бокс.

[00146] Аденовирусная векторная плазмида pXC1, которая несет 5'-часть генома Ad5, была приобретена у Microbix Biosystem (Торонто, Канада). Нуклеотидная последовательность векторной плазмиды pXC1 изображена здесь в последовательности SEQ ID NO: 2. Эталонная последовательность генома Ad5 в NCBI AC\_000008.1 изображена здесь последовательности в SEQ ID NO: 8. На Фигуре 1F показана нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad5 дикого типа вплоть до старт-кодона гена E1a, с указанием местоположения CAAT-бокса и блока TATA-бокса.

[00147] Получали модифицированную векторную плазмиду pXC1, которая имела делецию 200 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 352-551 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 353-552 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя CAAT-бокс и TATA-бокс в промоторе E1a. Мутированная векторная

плазмида в дальнейшем упоминается как рХС1-Δ350, а любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как Ad-Δ350. Нуклеотидная последовательность 5'-конца рХС1-Δ350 вплоть до старт-кодона гена Е1а показана в последовательности SEQ ID NO: 20. Полноразмерная нуклеотидная последовательность рХС1-Δ350 показана в последовательности SEQ ID NO: 4. Нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-Δ350 вплоть до старт-кодона гена Е1а показана на Фигуре 1А и в последовательности SEQ ID NO: 3. Двадцать один нуклеотид на 5'-конце векторной плазмиды рХС1 (и любые модифицированные векторные плазмиды рХС1) отличаются от аденовирусной последовательности дикого типа, однако эти нуклеотиды превращаются в дикий тип аденовирусной последовательности в процессе получения рекомбинантного аденовируса.

[00148] Там, где это указано, рХС1-Δ350 дополнительно модифицировали, чтобы иметь сайт SalI в старт-сайте области Е1b-19k и сайт XhoI через 200 пар оснований после 3'-конца сайта SalI для облегчения вставки терапевтических трансгенов. Нуклеотидная последовательность модифицированной области Е1b-19k приведена в SEQ ID NO: 5. Полученная векторная плазмида в дальнейшем обозначается как рХС1-Δ350-Δ19k, а любые вирусные частицы, полученные из нее, далее называются Ad-Δ350-Δ19k.

[00149] Там, где это указано, ген мышиноного GM-CSF клонировали в рХС1-Δ350-Δ19k в модифицированную область Е1b-19k между сайтами SalI и XhoI. Аминокислотная последовательность мышиноного GM-CSF приведена в SEQ ID NO: 6. Полученная векторная плазмида далее именуется как рХС1-Δ350-mGM-CSF, а любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как Ad-Δ350-mGM-CSF.

[00150] Получали дополнительно модифицированную векторную плазмиду рХС1, которая имела делецию 8 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 467-474 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 468-475 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя TATA-бокс в промоторе Е1а. Мутированная векторная плазмида в дальнейшем именуется как рХС1-TATA, и любые вирусные частицы, полученные из нее, далее упоминаются как Ad-TATA. Нуклеотидная последовательность 5'-конца рХС1-TATA, вплоть до старт-кодона гена Е1а, показана в последовательности SEQ ID NO: 21. Нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-TATA, вплоть до старт-кодона гена Е1а, показана на Фигуре 1В и в последовательности SEQ ID NO: 15.

[00151] Получали дополнительно модифицированную векторную плазмиду рХС1, которая имела делецию 9 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 422-430 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 423-431 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя СААТ-бокс коробка в промоторе Е1а. Мутированная векторная плазмида в дальнейшем именуется как рХС1-СААТ, и любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как Ad-СААТ. Нуклеотидная последовательность 5'-конца рХС1-СААТ, вплоть до старт-кодона гена Е1а, показана в последовательности SEQ ID NO: 22. Нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-СААТ, вплоть до старт-кодона гена Е1а, показана на Фигуре 1С и в последовательности SEQ ID NO: 16.

[00152] Получали дополнительно модифицированную векторную плазмиду рХС1, которая имела делецию 9 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 422-430 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 423-431 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя СААТ0-бокс в промоторе Е1а, и делецию 8 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 467-474 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 468-475 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя ТАТА-бокс в промоторе Е1а. В дальнейшем мутированная векторная плазмида именуется как рХС1-СААТ-ТАТА, а любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как Ad-СААТ-ТАТА. Нуклеотидная последовательность 5'-конца рХС1-СААТ-ТАТА, вплоть до старт-кодона гена Е1а, показана в последовательности SEQ ID NO: 23. Нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-СААТ-ТАТА, вплоть до старт-кодона гена Е1а, показана на Фигуре 1D и в последовательности SEQ ID NO: 17.

[00153] Получали дополнительно модифицированную векторную плазмиду рХС1, которая имела делецию 9 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 422-430 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 423-431 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя СААТ-бокс в промоторе Е1а, и делецию 4 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 471-474 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 472-475 в SEQ ID NO: 8), которая включала в себя последовательность из четырех нуклеотидов ТАТА ТАТА-бокса в промоторе Е1а (в дальнейшем именуемая минимальной делецией ТАТА или mТАТА). В дальнейшем мутированная векторная плазмида именуется как рХС1-СААТ-mТАТА, а любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуются как

Ad-CAAT-mTATA. Нуклеотидная последовательность 5'-конца рXC1-CAAT-mTATA, вплоть до старт-кодона гена E1a, показана в последовательности SEQ ID NO: 25. Нуклеотидная последовательность 5'-конца Ad-CAAT-TATA, вплоть до старт-кодона гена E1a, показана на Фигуре 1E и в последовательности SEQ ID NO: 26.

[00154] Получали дополнительно модифицированную векторную плазмиду рXC1, которая имела делецию 50 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 194-243 в SEQ ID NO: 2 (которые соответствуют нуклеотидам 195-244 в SEQ ID NO: 8 и нуклеотидам от -304 до -255 перед сайтом инициации E1a), что делает экспрессию E1a селективной в отношении рака (как ранее описано в патенте США No.9073980). Мутированная векторная плаزمида далее именуется как рXC1-TAV-255, и любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуется как Ad-TAV-255. Там где это указано, рXC1-TAV-255 дополнительно модифицировали, 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, как описано выше. Полученная в результате векторная плазмида в дальнейшем именуется как рXC1-TAV-Δ19k, а любые вирусные частицы, полученные из нее, далее именуется как Ad-TAV-Δ19k.

[00155] Различные модифицированные плазмиды рXC1 котрансфицировали плазмидой рJM17 в клетках HEK-293A, чтобы обеспечить гомологичную рекомбинацию для спасения рекомбинантного вируса. Вирус собирали и подвергали двум раундам очистки бляшек и при необходимости секвенировали для проверки на наличие соответствующей делеции.

#### **Пример 2: Экспрессия E1a из Ad-Δ350 в нормальных и раковых клетках**

[00156] Этот пример описывает сравнение между экспрессией вирусного белка модифицированным аденовирусом Ad-Δ350 в раковых и нормальных клетках.

[00157] Клетки Panc1 (клетки рака поджелудочной железы человека) и клетки WI-38 (нераковые фибробласты легких человека) инфицировали вирусами Ad-Δ350 или Ad-TAV-255, полученными, как описано в Примере 1. Экспрессию E1a анализировали с помощью вестерн-блоттинга в указанные часы после заражения.

[00158] Как показано на Фигурах 2A и 2B, после заражения вирусом Ad-Δ350 клетки WI-38 экспрессировали аденовирусный белок

E1a на более низком уровне и в более поздние моменты времени, чем клетки Panc1.

[00159] Клетки Panc1 и клетки A549 (клетки рака легких человека) инфицировали Ad-TAV-255 или Ad-Δ350 при множественности заражения (МЗ) равной 3 или 5, и экспрессию E1a анализировали при помощи вестерн-блоттинга через 72 часа после заражения. Как показано на Фигуре 3А (клетки Panc1) и Фигуре 3В (клетки A549), обе линии раковых клеток имели высокий уровень экспрессии E1a вирусами Ad-Δ350 или Ad-TAV-255.

[00160] Вместе эти результаты показывают, что 200-нуклеотидная область в Ad5, включая TATA-бокс E1a, необходима для экспрессии E1a в незлокачественных клетках, в то время как эта область не является обязательной для экспрессии E1a в опухолевых клетках.

**Пример 3: Цитотоксичность Ad-Δ350, Ad-CAAT, Ad-TATA, Ad-CAAT-TATA и Ad-CAAT-mTATA в нормальных и раковых клетках**

[00161] Этот пример описывает сравнение между цитотоксичностью модифицированных аденовирусов Ad-Δ350, Ad-CAAT, Ad-TATA, Ad-CAAT-TATA и Ad-CAAT-mTATA в раковых и нормальных клетках.

[00162] Клетки HCT116 (клетки рака толстой кишки человека), клетки Panc1 и клетки A549 инфицировали Ad-Δ350, полученным, как описано в Примере 1. Клетки инфицировали при указанной МЗ или использовали в качестве неинфицированных контролей и окрашивали кристаллическим фиолетовым, который окрашивал жизнеспособные клетки в синий цвет, в указанные моменты времени после заражения. Как показано на Фигуре 4А, каждая из линий раковых клеток имела значительную гибель клеток через четыре-пять дней после заражения.

[00163] Панель раковых клеточных линий инфицировали Ad-CAAT, Ad-TATA, Ad-CAAT-TATA или Ad-CAAT-mTATA, полученными, как описано в Примере 1. Панель включала в себя клетки A549, Panc1, HCT116, Hep3b, ADS-12m, ASPC1, HT-29 и MeWo. Клетки инфицировали при МЗ равной 5 и окрашивали кристаллическим фиолетовым через 3-4 дня после заражения. В качестве контроля клеточные линии или культивировали без заражения или инфицировали ранее описанным онколитическим вирусом Ad-TAV-Δ19k. Результаты показаны на Фигурах 5-11. Все линии раковых клеток человека показали значительную гибель клеток после заражения, особенно через пять дней после заражения, тогда как линия мышинных клеток ADS-12

показала переменную гибель клеток после заражения каждым из вирусов.

[00164] Незлокачественные клетки MRC5 (фибробласты легких человека) и клетки WI38 инфицировали Ad-Δ350 или Ad-TAV, полученными, как описано в Примере 1. Клетки инфицировали при указанной МЗ и окрашивали кристаллическим фиолетовым через десять дней после заражения. Как показано на Фигуре 4В, в отличие от раковых клеток, которые погибали в течение 4-5 дней после заражения, незлокачественные клетки оставались жизнеспособными даже через 10 дней после заражения.

[00165] Незлокачественные клетки WI38 инфицировали Ad-СААТ, Ad-TATA, Ad-СААТ-TATA, Ad-Δ350 и Ad-TAV-Δ19k, полученными, как описано в Примере 1, при МЗ равной 3 и 5 и окрашивали кристаллическим фиолетовым через четыре дня (Фигура 12) или через шесть дней (Фигура 13) после заражения. Результаты показывают, что каждый вирус после заражения обладал минимальной цитотоксичностью.

[00166] Вместе эти результаты показывают, что 200-нуклеотидная область в Ad5, включающая в себя TATA-бокс E1a, является необходимой для Ad5-опосредованной цитотоксичности в незлокачественных клетках, в то время как эта область является необязательной для Ad5-опосредованной цитотоксичности в опухолевых клетках. Аналогично, вирусы Ad5 с делециями в промоторе E1a или одного TATA-бокса, или одного СААТ-бокса, или обоих TATA- и СААТ-боксов обладали селективную по отношению к раку цитотоксичностью.

#### **Пример 4: Экспрессия терапевтического трансгена из Ad-Δ350 в нормальных и раковых клетках**

[00167] Аденовирусы, имеющие делецию Δ350, дополнительно исследовали на предмет их способности нести терапевтический трансген вместо вирусного гена E1b-19k. Следующие вирусы были получены, как описано в Примере 1: вирус Ad-Δ350-Δ19k, который содержал делецию Δ350 и имел делецию области 19k без последующей вставки какого-либо трансгена; вирус Ad-Δ350-mGM-CSF, который содержал делецию Δ350 и нес ген GM-CSF мыши, клонированный в область E1b-19k между сайтами SalI и XhoI; и вирус Ad-TAV-Δ19k, который содержал делецию TAV-255 и имел делецию области 19k без последующей вставки какого-либо трансгена.

[00168] Раковые клетки Panc1, клетки A549 и клетки ADS12 (карцинома легкого мыши) инфицировали Ad-Δ350-Δ19k при указанной

МЗ и окрашивали кристаллическим фиолетовым через пять дней после заражения. Как показано на Фигуре 14, линии раковых клеток уничтожались дозозависимым образом.

[00169] Раковые клетки Panc1, клетки A549 и клетки ADS12 инфицировали Ad-Δ350-mGM-CSF при указанной МЗ и окрашивали кристаллическим фиолетовым через пять дней после заражения. Как показано на Фигуре 15 вирус, несущий ген GM-CSF мыши, сохранил онколитическую активность.

[00170] Клетки A549, HCT116, Hep3b и MeWo инфицировали Ad-Δ350-mGM-CSF, Ad-Δ350-Δ19k и Ad-TAV-Δ19k при МЗ равной 5 и окрашивали кристаллическим фиолетовым через 3-5 дней после заражения. Как показано на Фигурах 16-21, вирус Ad-Δ350-mGM-CSF сохранял цитолитическую активность, сравнимую с Ad-Δ350-Δ19k и Ad-TAV-Δ19k.

[00171] Клетки A549 инфицировали вирусами Ad-Δ350-Δ19k или Ad-Δ350-mGM-CSF при МЗ равной 10. Кондиционированные среды через четыре дня после заражения использовали в ИФА для определения mGM-CSF. Как показано на Фигуре 22, Ad-Δ350-mGM-CSF индуцирует экспрессию mGM-CSF.

[00172] Клетки ADS12 инфицировали Ad-Δ350-Δ19k или Ad-Δ350-mGM-CSF при указанной МЗ, и кондиционированные среды через четыре дня после заражения использовали в ИФА для определения mGM-CSF. Как показано на Фигуре 23, Ad-Δ350-mGM-CSF индуцирует экспрессию mGM-CSF в этой линии клеток рака мыши.

[00173] Вместе эти результаты свидетельствуют о том, что 200 нуклеотидная область в Ad5, включающая в себя TATA- и CAAT-боксы E1a, необходима для экспрессии терапевтического трангена из сайта экспрессии E1b-19k в незлокачественных клетках, в то время как эта область не является обязательной для экспрессии терапевтического трангена из сайта экспрессии E1b-19k в опухолевых клетках.

#### **Пример 5: Противораковая активность Ad-Δ350**

[00174] В этом примере описана противораковая активность рекомбинантных аденовирусов с делециями TATA- и/или CAAT- бокса, полученных, как описано в Примере 1.

[00175] Мышам (линия 129S4) подкожно вводили клетки ADS-12 (рак легких мыши) и позволяли им образовывать опухоли. После того, как опухоли достигли объема приблизительно 50-100 мм<sup>3</sup>, мышей случайным образом распределяли для лечения Ad-Δ350-Δ19k, Ad-TAV-Δ19k (в качестве положительного контроля для эффективного



онколитического вируса) или буфером (в качестве отрицательного контроля). Мышам внутрь опухоли вводили указанные препараты каждые четыре дня по три дозы. Как показано на Фигуре 24, мыши, получавшие буфер, имели быстрый рост опухоли, в то время как мыши, получавшие или Ad-Δ350-Δ19k, или Ad-TAV-Δ19k, имели уменьшение размера опухоли, и во многих случаях оставшиеся опухоли не поддавались обнаружению.

[00176] Эти результаты позволяют предположить, что вирус Ad-Δ350-Δ19k, несущий делецию, которая удаляет как CAAT-бокс, так и TATA-бокс промотора вирусного гена E1A, является эффективным в лечении рака.

#### **Пример 6: Делеция TATA-бокса в Ad35**

[00177] В этом примере описано получение рекомбинантных аденовирусов типа 35 (Ad35) с делециями в области промотора E1a, которые включают в себя TATA-бокс.

[00178] Промотор E1a аденовируса типа 35 (Ad35) содержит TATA-бокс в нуклеотидах, соответствующих нуклеотидам с 477 по 484 в последовательности SEQ ID NO: 24. Получали рекомбинантный аденовирус Ad35 с удалением TATA-бокса, путем преобразования природной последовательности

TTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCTAGGGTATTTATACCTCAGGGTTTGTGTCAAGAG  
GCCACTCTT (SEQ ID NO: 18; TATA-бокс подчеркнут)

в

TTTTACGTAGGTGTCAGCTGATCGCTAGGGCCTCAGGGTTTGTGTCAAGAGGCCACTCT  
T (SEQ ID NO: 19).

[00179] Клетки HEK-293 трансфицировали геномами для вируса Ad35 с делетированным TATA-боксом и, как показано на Фигуре 25, наблюдали цитопатический эффект, свидетельствующий о росте вируса. Эти результаты позволяют предположить, что рекомбинантный аденовирус Ad35 с делецией TATA-бокса, может быть пригоден в качестве онколитического вируса.

#### **Включение путем ссылки**

[00180] Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в настоящей заявке, включено в настоящее изобретение путем ссылки для всех целей.

#### **Эквиваленты**

[00181] 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 вирус, содержащий: (i) промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке; и/или (ii) промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке.

2. Рекомбинантный вирус, содержащий промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке.

3. Рекомбинантный вирус, содержащий промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, функционально связанный с геном, где в промоторе на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, что позволяет избирательно экспрессировать ген в гиперпролиферативной клетке.

4. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-3, где рекомбинантный вирус выбран из рекомбинантного вируса осповакцины, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), вируса простого герпеса 1 (HSV1), вируса миксомы, реовируса, полиовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса кори (MV) и вируса болезни Ньюкасла (NDV).

5. Рекомбинантный вирус по п.4, где рекомбинантный вирус представляет собой рекомбинантный аденовирус.

6. Рекомбинантный вирус по п.5, где рекомбинантный вирус выбран из аденовируса типа 5 и аденовируса типа 35.

7. Рекомбинантный вирус по п.6, где рекомбинантный вирус представляет собой аденовирус типа 5.

8. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-2 или 4-7, где промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса является промотором раннего гена.

9. Рекомбинантный вирус по п.8, где промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса является промотором E1a, промотором E1b или промотором E4.

10. Рекомбинантный вирус по п.9, где промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса является промотором E1a.

11. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-2 или 4-10, где модификация, включенная в промотор на основе модифицированного TATA-бокса, включает в себя удаление всего TATA-бокса.

12. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-11, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -27 до -24 промотора E1a.

13. Рекомбинантный вирус по п.12, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -31 до -24 промотора E1a.

14. Рекомбинантный вирус по п.13, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -44 до +54 промотора E1a.

15. Рекомбинантный вирус по п.14, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -146 до +54 промотора E1a.

16. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-11, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 472 по 475 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

17. Рекомбинантный вирус по п.16, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 468 по 475 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

18. Рекомбинантный вирус по п.17, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 455 по 552 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

19. Рекомбинантный вирус по п.18, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 353 по 552 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

20. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-19, где вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к вирусу, содержащему последовательность CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7), AGTGCCCG (SEQ ID NO: 12) или TATTCCTG (SEQ ID NO: 13).

21. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, содержащий делецию нуклеотидов, соответствующих от -27 до -24 области промотора E1a.

22. Рекомбинантный вирус по п.21, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -31 до -24 области промотора E1a.

23. Рекомбинантный вирус по п.22, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -44 до +54 области

промотора E1a.

24. Рекомбинантный вирус по п.23, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -146 до +54 области промотора E1a.

25. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, содержащий делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 472 по 475 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

26. Рекомбинантный вирус по п.25, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 468 по 475 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

27. Рекомбинантный вирус по п.26, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 455 по 552 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

28. Рекомбинантный вирус по п.27, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 353 по 552 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

29. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, где вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к аденовирусу типа 5, содержащему последовательность CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7), AGTGCCCG (SEQ ID NO: 12) или TATTCCCG (SEQ ID NO: 13).

30. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, где вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к аденовирусу типа 5, содержащему последовательность CTAGGACTG (SEQ ID NO: 7).

31. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1 или 3-20, где промотор на основе модифицированного СААТ-бокса является промотором раннего гена.

32. Рекомбинантный вирус по п.31, где промотор на основе модифицированного СААТ-бокса является промотором E1a, промотором E1b или промотором E4.

33. Рекомбинантный вирус по п.32, где промотор на основе модифицированного СААТ-бокса является промотором E1a.

34. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1, 3-20 или 31-33, где модификация, включенная в промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, включает в себя удаление всего СААТ-бокса.

35. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-34, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих от -76 до -68

промотора E1a.

36. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-34, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 423 по 431 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

37. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-36, где вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к вирусу, содержащему последовательность TTCCGTGGCG (SEQ ID NO: 14).

38. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, содержащий делецию нуклеотидов, соответствующих от -76 до -68 области промотора E1a.

39. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, содержащий делецию нуклеотидов, соответствующих с 423 по 431 генома Ad5 (SEQ ID NO: 8).

40. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 5, где вирус содержит делецию полинуклеотида, которая приводит к аденовирусу типа 5, содержащему последовательность TTCCGTGGCG (SEQ ID NO: 14).

41. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-40, где вирус содержит делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 477 по 484 генома Ad35 (SEQ ID NO: 24).

42. Рекомбинантный вирус, где вирус представляет собой аденовирус типа 35, содержащий делецию нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам с 477 по 484 генома Ad35 (SEQ ID NO: 24).

43. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-42, где модификация, включенная в промотор на основе модифицированного ТАТА-бокса или промотор на основе модифицированного СААТ-бокса, не включает в себя добавление или замену отдельной последовательностью функционального промотора.

44. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-42, дополнительно включающий в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтический трансген.

45. Рекомбинантный вирус по п.44, где терапевтический трансген кодирует терапевтический полипептид, выбранный из онкопротеина, белка-супрессора опухолей, фермента, цитокина, иммуномодулирующего пептида, антитела, литического пептида, вакцинного антигена, полипептида, который исправляет генетические дефекты в соматических клетках, и полипептида, который катализирует процессы, приводящие к гибели клеток.

46. Рекомбинантный вирус по п.44, где терапевтический

трансен кодирует терапевтический полипептид, выбранный из апоптотического агента, антитела, CTL-чувствительного пептида, цитокина, цитолитического агента, цитотоксического агента, фермента, гетерологичного антигена, экспрессированного на поверхности опухолевой клетки, чтобы вызвать иммунный ответ, иммуностимулирующего или иммуномодулирующего агента, интерферона, литического пептида, онкопротеина, полипептида, который катализирует процессы, приводящие к гибели клеток, полипептида, который исправляет генетические дефекты в соматических клетках, белка-супрессора опухолей, вакцинного антигена и любых их комбинаций.

47. Рекомбинантный вирус по п.44, где терапевтический трансен кодирует терапевтический полипептид, выбранный из ацетилхолина, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-1, тяжелой цепи или легкой цепи антитела против PD-L1, BORIS/CTCF, CD19, CD20, CD80, CD86, CD137L, CD154, DKK1/Wnt, ICAM-1, IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-17, IL-23, IL-23A/p19, интерферона-гамма, TGF- $\beta$ , ловушки TGF- $\beta$ , FGF, IL-24, IL-27, IL-35, MAGE, NY-ESO-1, p53 и тимидинкиназы.

48. Рекомбинантный вирус по п.44, где терапевтический трансен кодирует ловушку TGF- $\beta$ .

49. Рекомбинантный вирус по п.44, где терапевтический трансен кодирует терапевтическую нуклеиновую кислоту, выбранную из антисмысловой РНК или рибозима.

50. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 44-49, где аденовирус содержит сайт-старт E1b-19K и E1b-55K, и где нуклеотидная последовательность, кодирующая терапевтический трансен, встраивается между сайтом-старт E1b-19K и сайтом-старт E1b-55K.

51. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-50, где рекомбинантный вирус избирательно реплицируется в гиперпролиферативной клетке.

52. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-51, где рекомбинантный вирус избирательно реплицируется в клетке с неограниченным ростом.

53. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-52, где рекомбинантный вирус избирательно обладает цитолитической активностью в гиперпролиферативной клетке.

54. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-53, где рекомбинантный вирус избирательно обладает цитолитической

активностью в клетке с неограниченным ростом.

55. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 5-54, где рекомбинантный вирус избирательно экспрессирует E1a и/или E1b в гиперпролиферативной клетке.

56. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 5-55, где рекомбинантный вирус избирательно экспрессирует E1a и/или E1b в клетке с неограниченным ростом.

57. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 44-56, где рекомбинантный вирус избирательно экспрессирует терапевтический трансген в гиперпролиферативной клетке.

58. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 44-57, где рекомбинантный вирус избирательно экспрессирует терапевтический трансген в клетке с неограниченным ростом.

59. Рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-58, где гиперпролиферативная клетка представляет собой раковую клетку, эндотелиальную клетку, эпидермальную клетку, фибробласт и/или иммунную клетку.

60. Рекомбинантный вирус по п.59, где гиперпролиферативная клетка представляет собой раковую клетку.

61. Рекомбинантный вирус по п.60, где раковая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки анального рака, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, холангиокарциномы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, гастроэзофагеального рака, рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), желудочно-кишечной стромальной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, гинекологического рака, рак головы и шеи, гематологического рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, мезотелиомы, нейроэндокринного рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака у детей, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, саркомы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака кожи, рака желудка, рака яичка или рака щитовидной железы.

62. Рекомбинантный вирус по п.60, где раковая клетка выбрана из клетки рака легкого, клетки рака толстой кишки и клетки рака поджелудочной железы.

63. Рекомбинантный вирус, содержащий модифицированную или удаленную вирусную регуляторную последовательность, которая



обеспечивает избирательную экспрессию вируса в гиперпролиферативной клетке.

64. Фармацевтическая композиция, рекомбинантный вирус по любому из п.п. 1-63 и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

65. Способ экспрессии терапевтического трансгена в клетке-мишени, включающий в себя воздействие на клетку эффективным количеством рекомбинантного вируса по любому из п.п. 44-63 для экспрессии целевого трансгена.

66. Способ ингибирования пролиферации опухолевой клетки, включающий в себя воздействие на клетку эффективным количеством рекомбинантного вируса по любому из п.п. 1-63 для ингибирования пролиферации опухолевой клетки.

67. Способ ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества рекомбинантного вируса по любому из п.п. 1-63 для ингибирования пролиферации опухолевой клетки

68. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту эффективного количества рекомбинантного вируса по любому из п.п. 1-63 для лечения рака у субъекта.

69. Способ по п.68, где рак выбран из меланомы, плоскоклеточного рака кожи, базальноклеточной карциномы, рака головы и шеи, рака молочной железы, анального рака, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, мелкоклеточного рак легкого, почечно-клеточного рака, рака предстательной железы, гастроэзофагеального рака, колоректального рака, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака яичника, гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы, рака головного мозга, рак эндометрия, нейроэндокринного рака, карциномы из клеток Меркеля, желудочно-кишечной стромальной опухоли, саркомы и рака поджелудочной железы.

70. Способ по п.68, где рак выбран из анального рака, базальноклеточной карциномы, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, холангиокарциномы, рака шейки матки, рака толстой кишки, колоректального рака, рака эндометрия, гастроэзофагеального рака, рака желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), желудочно-кишечной стромальной опухоли, гепатоцеллюлярной карциномы, гинекологического рака, рак головы и шеи, гематологического

рака, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, карциномы из клеток Меркеля, мезотелиомы, нейроэндокринного рака, немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака у детей, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, саркомы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака кожи, рака желудка, рака яичка или рака щитовидной железы.

71. Способ по п.п. 67–70, где рекомбинантный вирус вводят в комбинации с одной или несколькими терапиями, выбранными из хирургического вмешательства, лучевой терапии, химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии и виротерапии.

72. Способ лечения гиперпролиферативного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает в себя введение субъекту эффективного количества рекомбинантного вируса по любому из п.п. 1–63 для лечения гиперпролиферативного заболевания у субъекта.

73. Способ по п.72, где гиперпролиферативное заболевание выбрано из атеросклероза, ревматоидного артрита, псориаза, волчанки, идиопатического легочного фиброза, легочной гипертензии при склеродермии, астмы, фиброза почек, ХОБЛ, кистозного фиброза, десквамативной интерстициальной пневмонии, обычной интерстициальной пневмонии, дегенерации желтого пятна, рестеноза, ретинопатии, гиперпролиферативных нарушения фибробластов, склеродермии, гломерулонефрита, диабетической нефропатии, злокачественного нефросклероза, синдрома тромботической микроангиопатии, отторжения трансплантата, гломерулопатии и цирроза.

74. Способ по п.72, где гиперпролиферативное заболевание выбрано из атеросклероза, ревматоидного артрита, псориаза, волчанки, идиопатического легочного фиброза, склеродермии и цирроза.

75. Способ по любому из п.п. 65–74, где эффективное количество рекомбинантного вируса составляет  $10^2$ – $10^{15}$  бляшкообразующих единиц (БОЕ).

76. Способ по любому из п.п. 67–75, где субъект является человеком.

77. Способ конструирования онколитического вируса, где способ включает в себя модификацию вирусного промотора на основе ТАТА-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует

функциональный ТАТА-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке.

78. Способ конструирования онколитического вируса, где способ включает в себя модификацию вирусного промотора на основе СААТ-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке.

79. Способ конструирования онколитического вируса, где способ включает в себя модификацию вирусного промотора на основе ТАТА-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного ТАТА-бокса отсутствует функциональный ТАТА-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке, и/или модификацию вирусного промотора на основе СААТ-бокса, функционально связанного с геном, таким образом, что у промотора на основе модифицированного СААТ-бокса отсутствует функциональный СААТ-бокс, чем обеспечивается избирательная экспрессия гена в гиперпролиферативной клетке.

80. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23.

81. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

82. Выделенная нуклеиновая кислота по п.81, где выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4.

83. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из п.п. 80–82.

84. Способ получения рекомбинантного вируса, включающий в себя:

(a) выращивание клетки-хозяина по п.83 в условиях, при которых клетка-хозяин продуцирует рекомбинантный вирус; и

(b) очистку рекомбинантного вируса.

85. Способ по любому из п.п. 65–76, где способ дополнительно включает в себя измерение иммунного ответа на антиген у субъекта.

86. Способ по любому из п.п. 65–76 или 85, где эффективное количество рекомбинантного вируса идентифицируют путем измерения

иммунного ответа на антиген у субъекта.

87. Способ п.п. 85 или 86, где иммунный ответ на антиген измеряют путем инъекции субъекту антигена в место инъекции на коже субъекта и измерения величины индукции в месте инъекции.

По доверенности

**ФИГ.1А**

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTT  
GTGACGTGGCGCGGGGCGTGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG  
TTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAGTGACGTTTTTGGTGTGC  
GCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTG  
GGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAAATCT  
GAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGG-ACTGAAAATG (SEQ ID NO:  
3)

**ФИГ.1В**

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTT  
GTGACGTGGCGCGGGGCGTGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG  
TTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAGTGACGTTTTTGGTGTGC  
GCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTG  
GGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAAATCT  
GAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGT  
TTACGTGGAGACTCGCCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCGGGTCAAAGTTGG  
CGTTTTTATTATTATAGTCAGCTGACGTGTAGTG-CCCGGTGAGTTCCTCAAGAGGCCACTCT  
TGAGTGCCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACACCGGGACTGAAAATG  
(SEQ ID NO: 15)

**ФИГ.1С**

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTT  
GTGACGTGGCGCGGGGCGTGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG  
TTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAGTGACGTTTTTGGTGTGC  
GCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTG  
GGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAAATCT  
GAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGT  
TTACGTGGAGACTCGCCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCG-TGGCGTTTTA  
TTATTATAGTCAGCTGACGTGTAGTGATTTATACCCGGTGAGTTCCTCAAGAGGCCACTCT  
TGAGTGCCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACACCGGGACTGAAAATG  
(SEQ ID NO: 16)

**ФИГ.1D**

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTT  
GTGACGTGGCGCGGGGCGTGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG  
TTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAGTGACGTTTTTGGTGTGC  
GCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTG  
GGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAAATCT  
GAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGT  
TTACGTGGAGACTCGCCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCG-TGGCGTTTTA  
TTATTATAGTCAGCTGACGTGTAGTG-CCCGGTGAGTTCCTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGC  
CAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACACCGGGACTGAAAATG (SEQ ID NO:  
17)

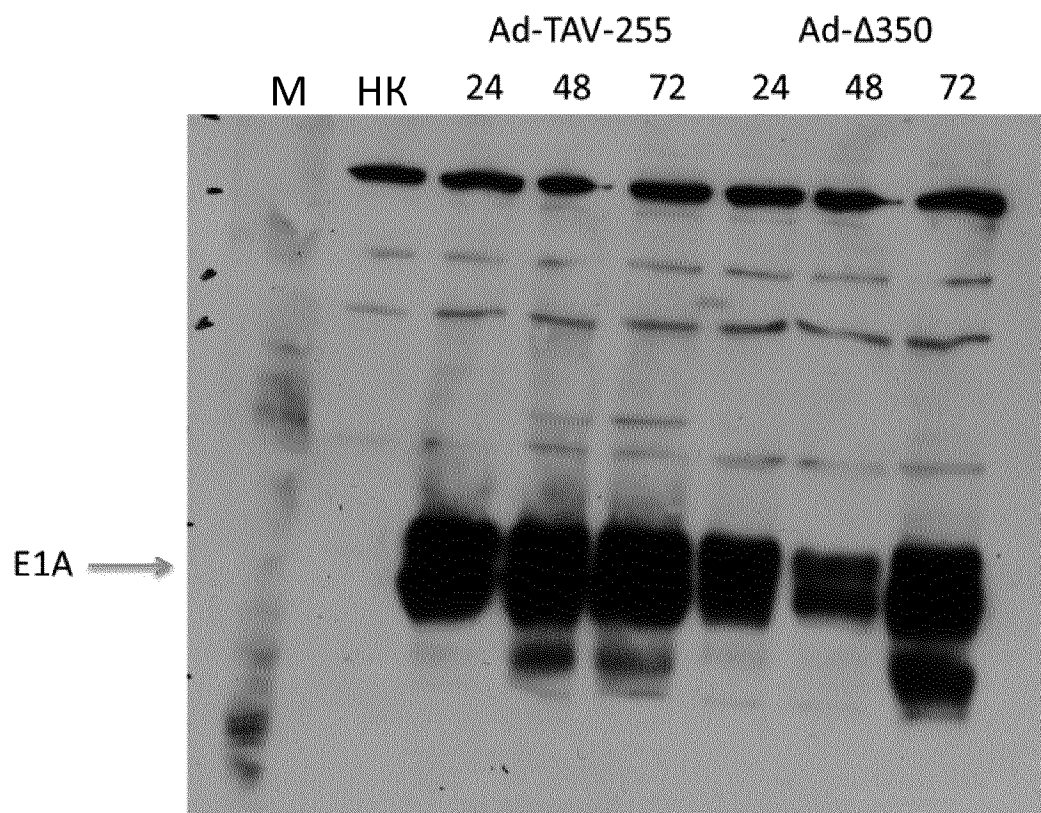
## ФИГ.1Е

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTT  
GTGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG  
TTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTTGGTGTGC  
GCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTG  
GGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGGAAACTGAATAAGAGGAAGTGAAATCT  
GAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGT  
TTACGTGGAGACTCGCCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCG-TGGCGTTTTA  
TTATTATAGTCAGCTGACGTGTAGTGTATT-CCCGGTGAGTTCCTCAAGAGGCCACTCTTGA  
GTGCCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACACCGGGACTGAAAATG (SEQ ID  
NO: 26)

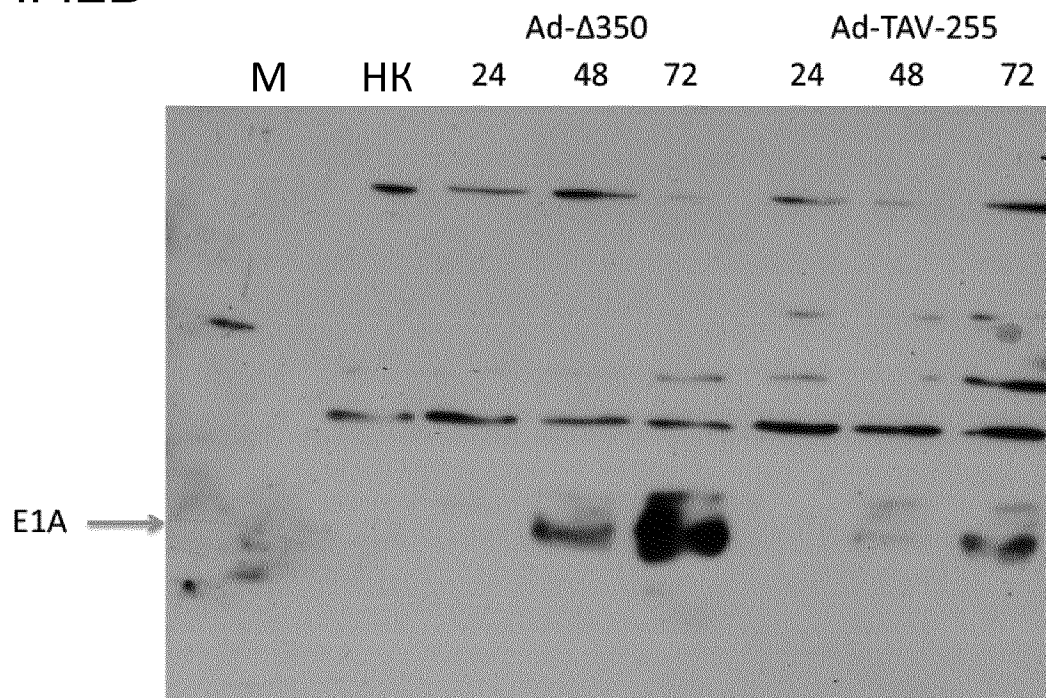
## ФИГ.F

CATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTT  
GTGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATG  
TTGCAAGTGTGGCGGAACACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTGACGTTTTTGGTGTGC  
GCCGGTGTACACAGGAAGTGACAATTTTCGCGCGGGTTTTAGGCGGATGTTGTAGTAAATTTG  
GGCGTAACCGAGTAAGATTTGGCCATTTTCGCGGGGAAACTGAATAAGAGGAAGTGAAATCT  
GAATAATTTTGTGTTACTCATAGCGCGTAATATTTGTCTAGGGCCGCGGGGACTTTGACCGT  
TTACGTGGAGACTCGCCCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTTCCGGGTCAAAGTTGG  
CGTTTTTATTATTATAGTCAGCTGACGTGTAGTGTTATTTATATCCCGGTGAGTTCCTCAAGAGG  
CCACTCTTGAGTGCCAGCGAGTAGAGTTTTCTCCTCCGAGCCGCTCCGACACCGGGACTGAA  
AATG (SEQ ID NO: 27)

ФИГ.2А

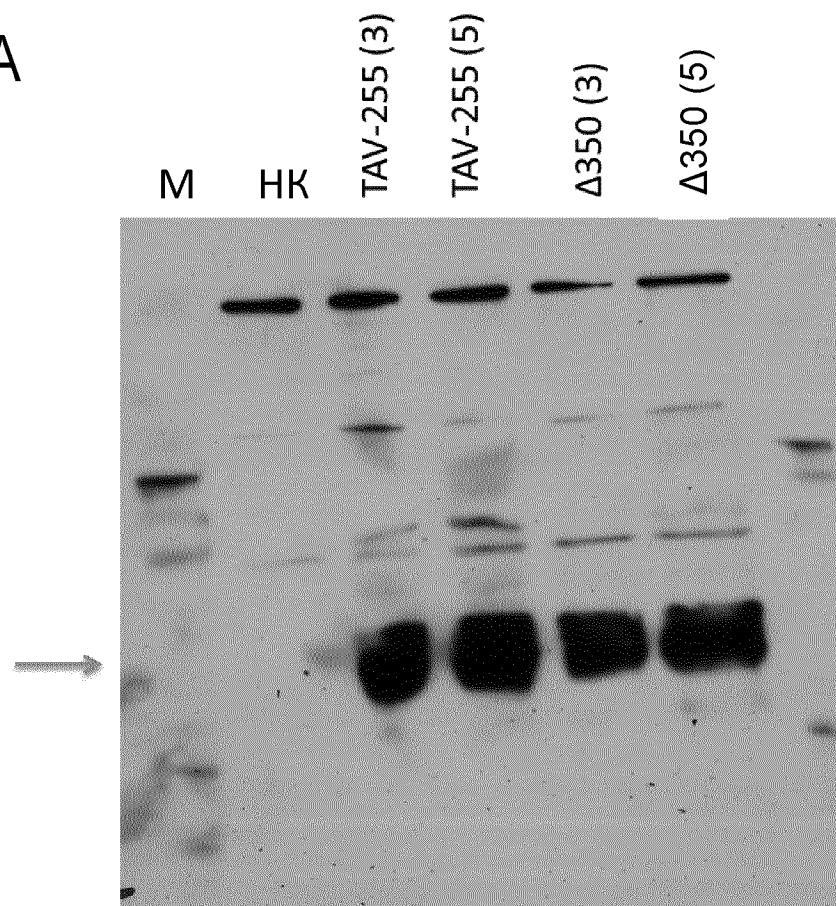


ФИГ.2В

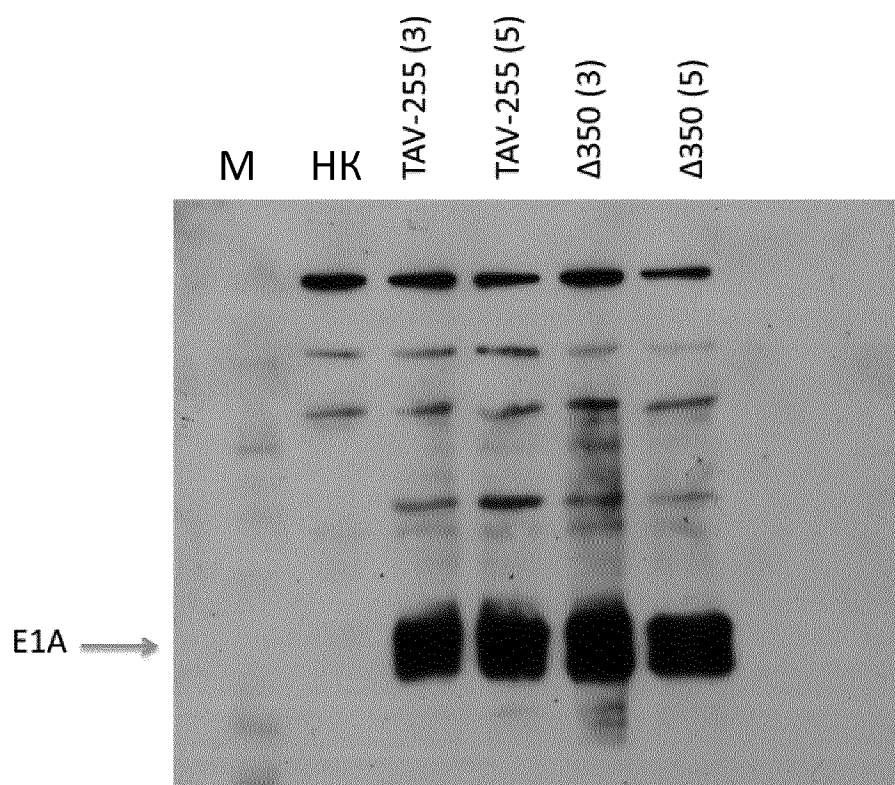


4/26

ФИГ.3А

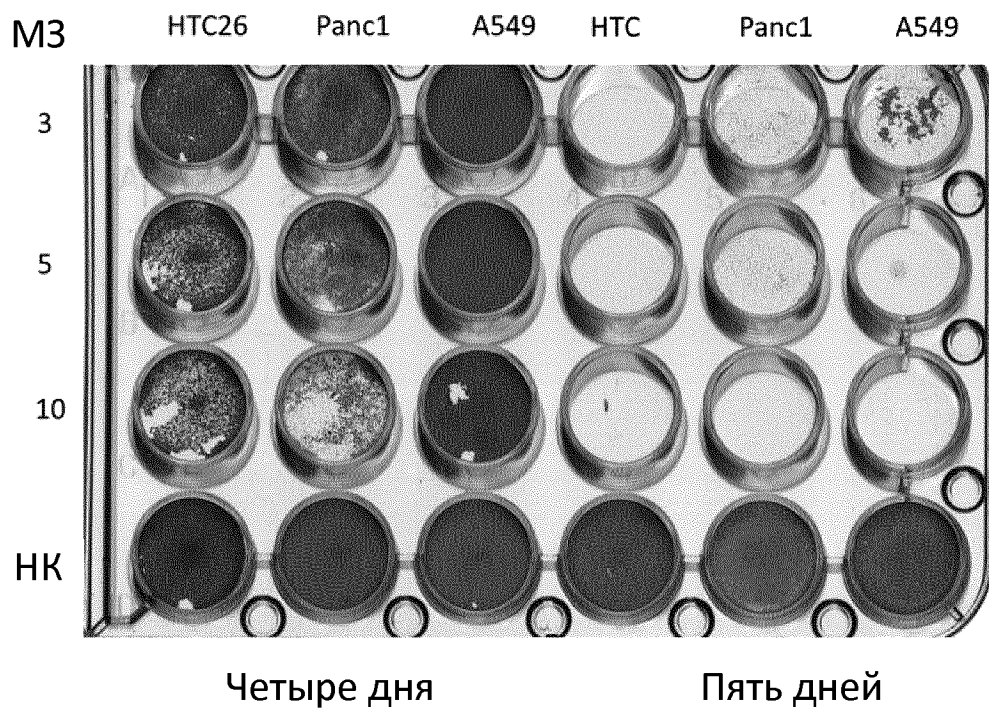


ФИГ.3В

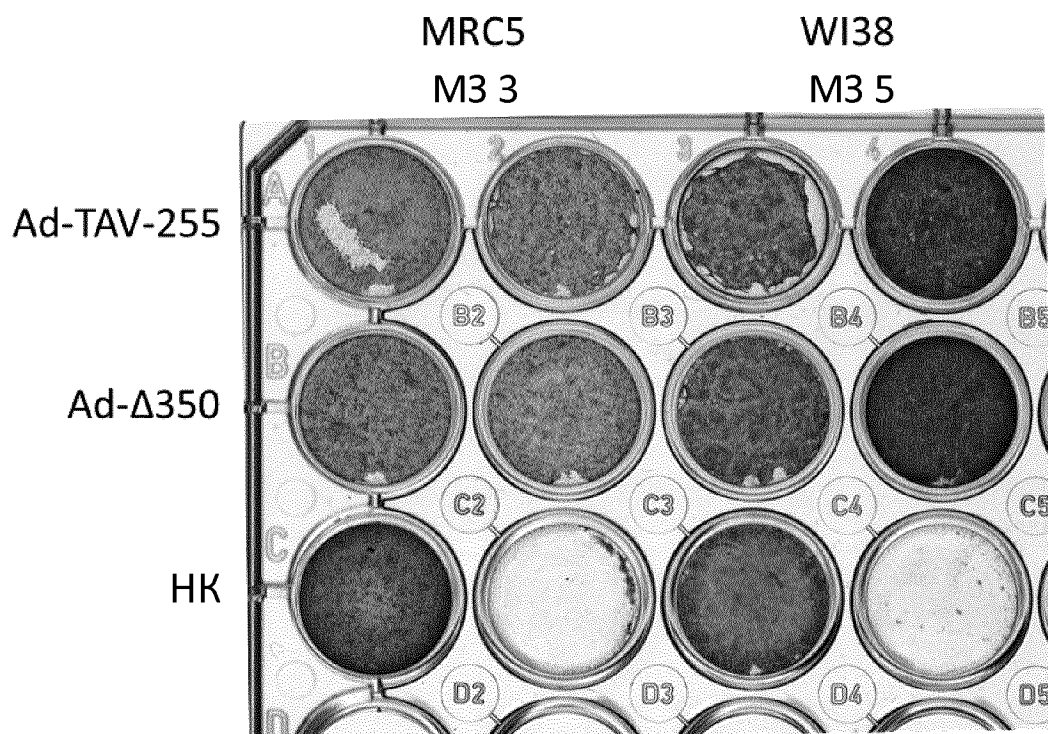




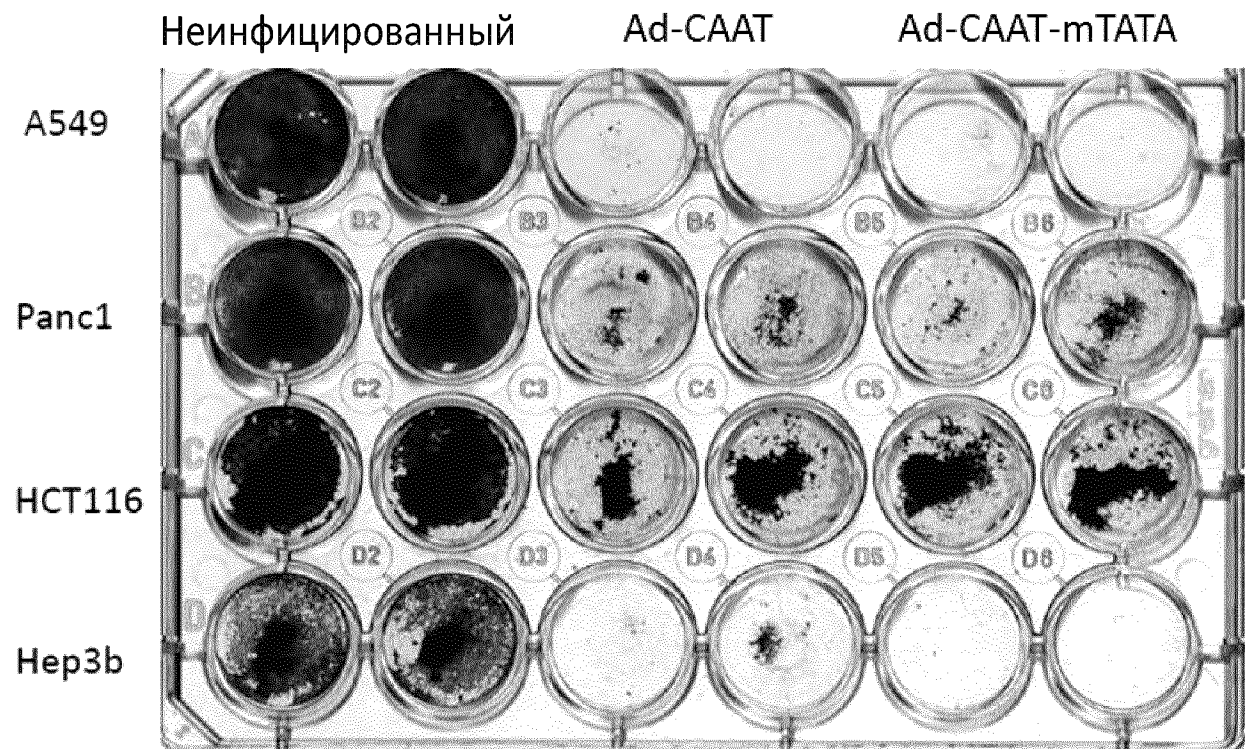
ФИГ.4А



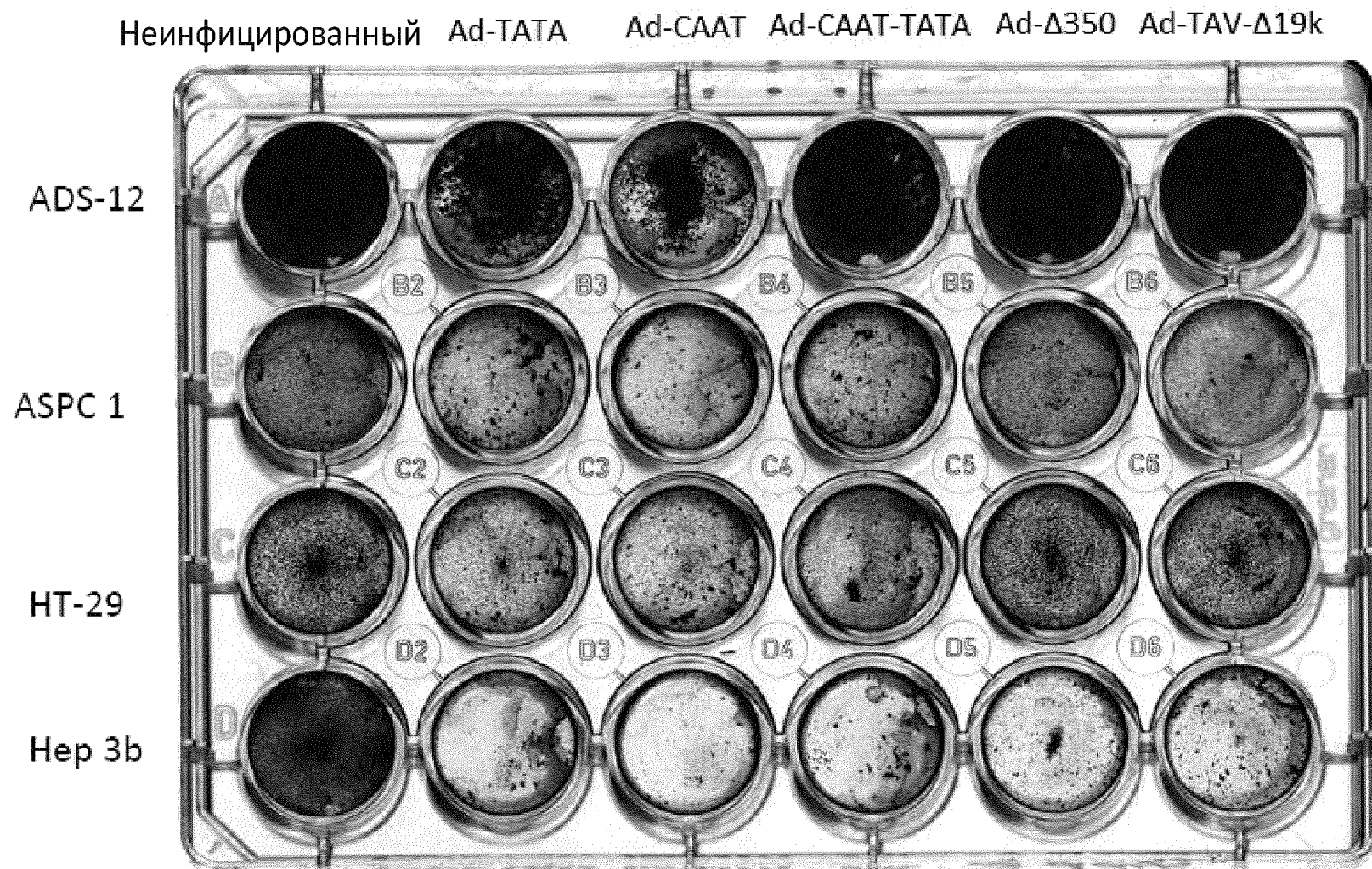
ФИГ.4В



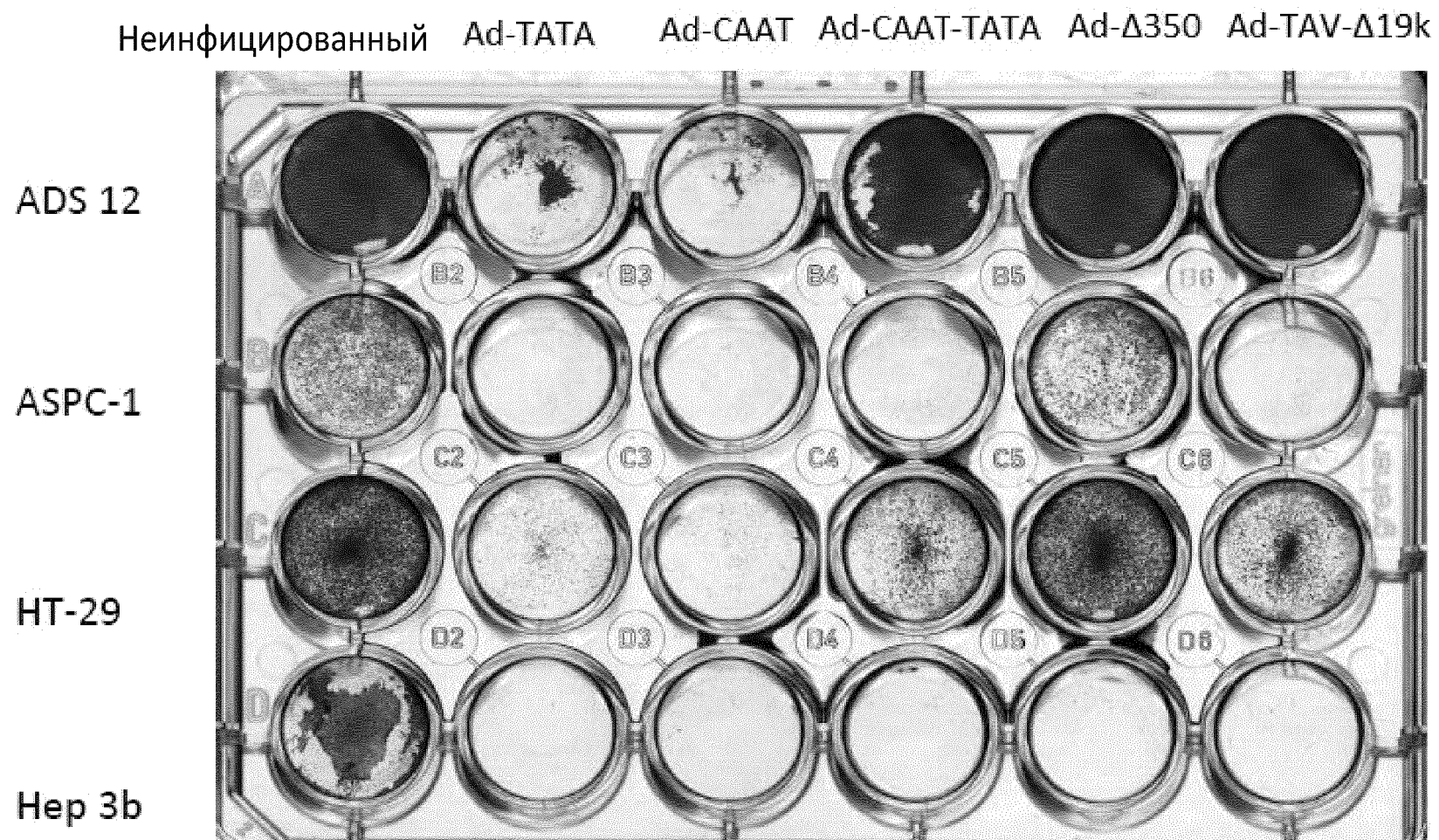
ФИГ.5



ФИГ.6

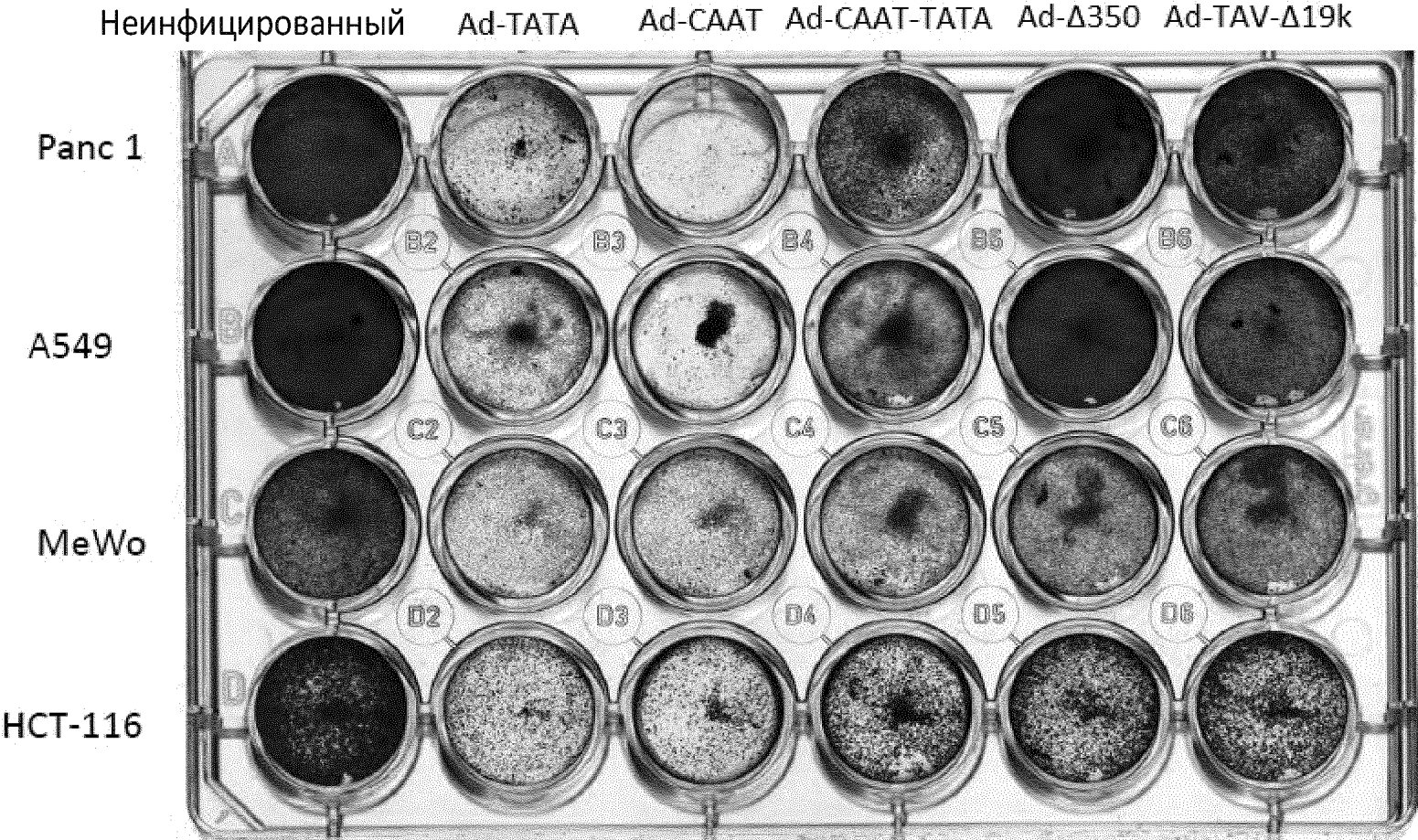


ФИГ.7

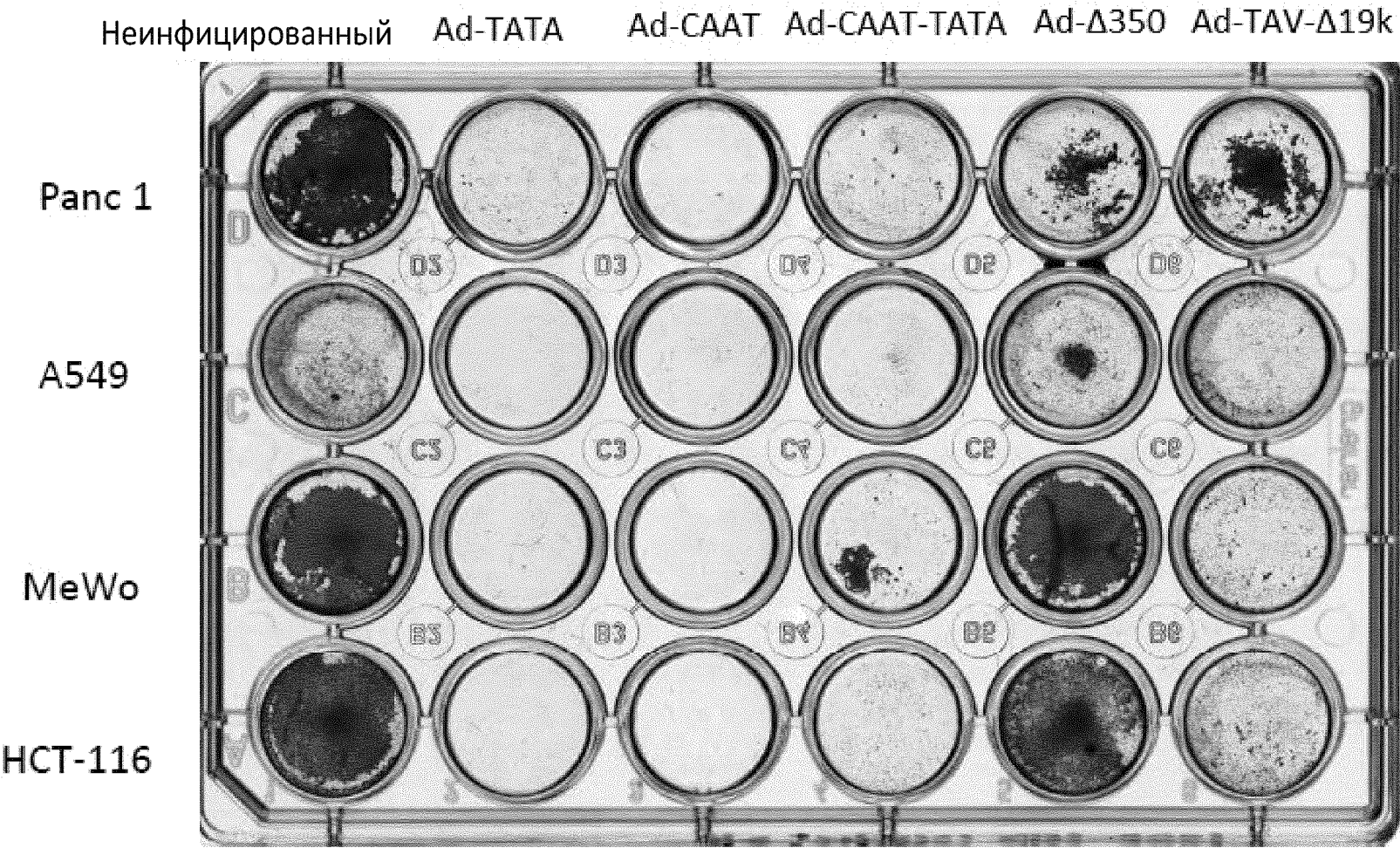




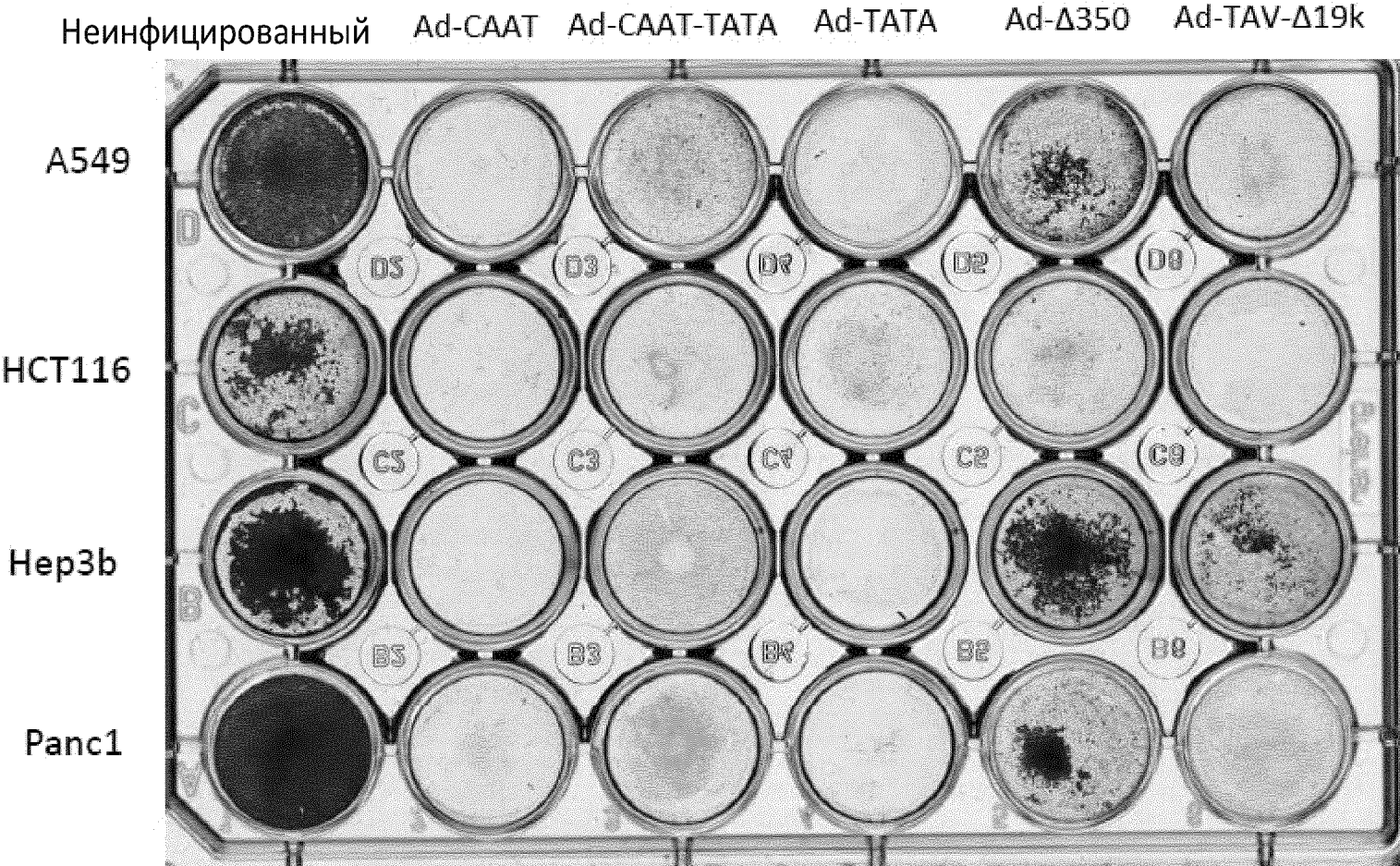
ФИГ.8



ФИГ. 9

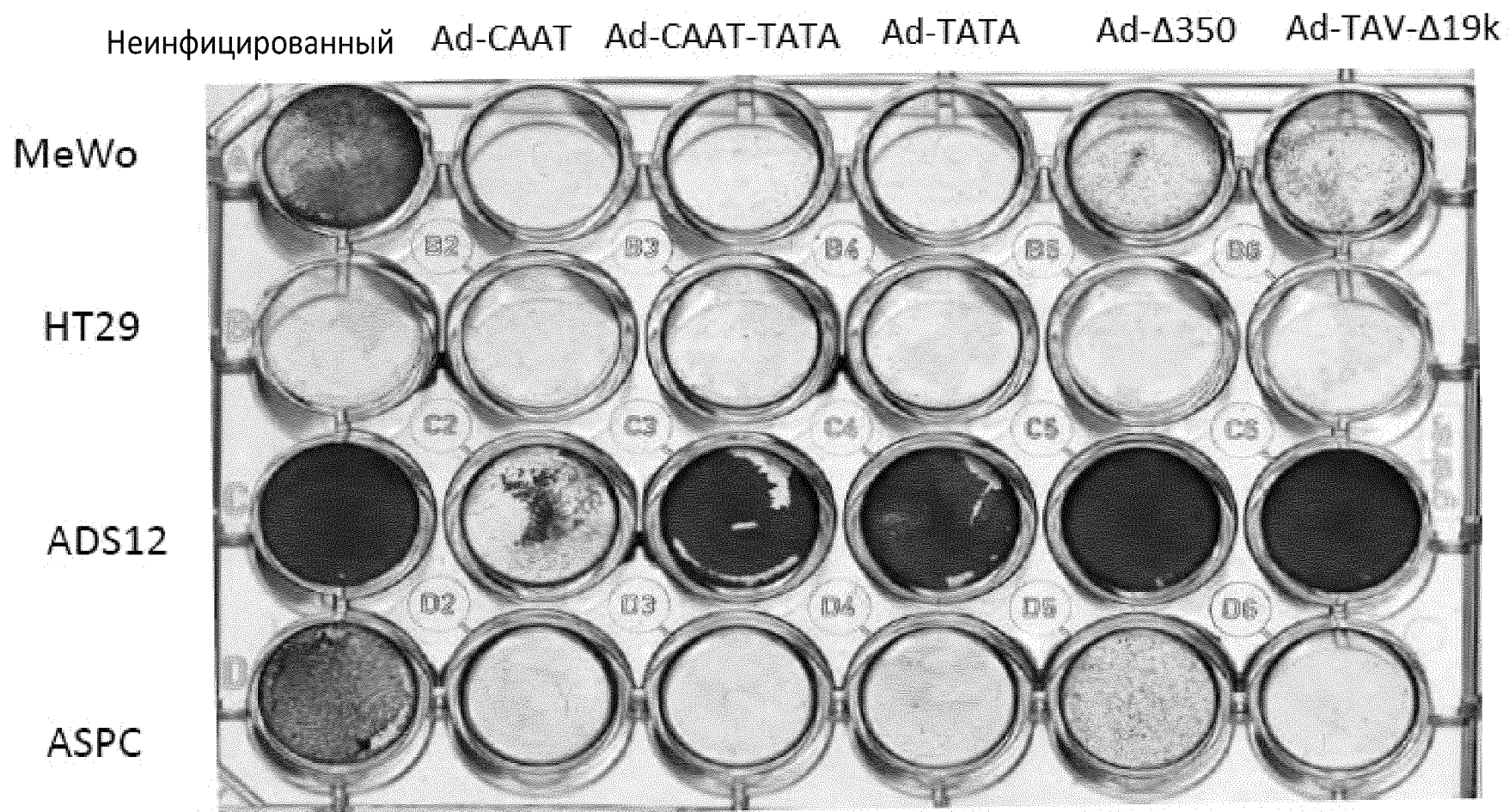


ФИГ.10



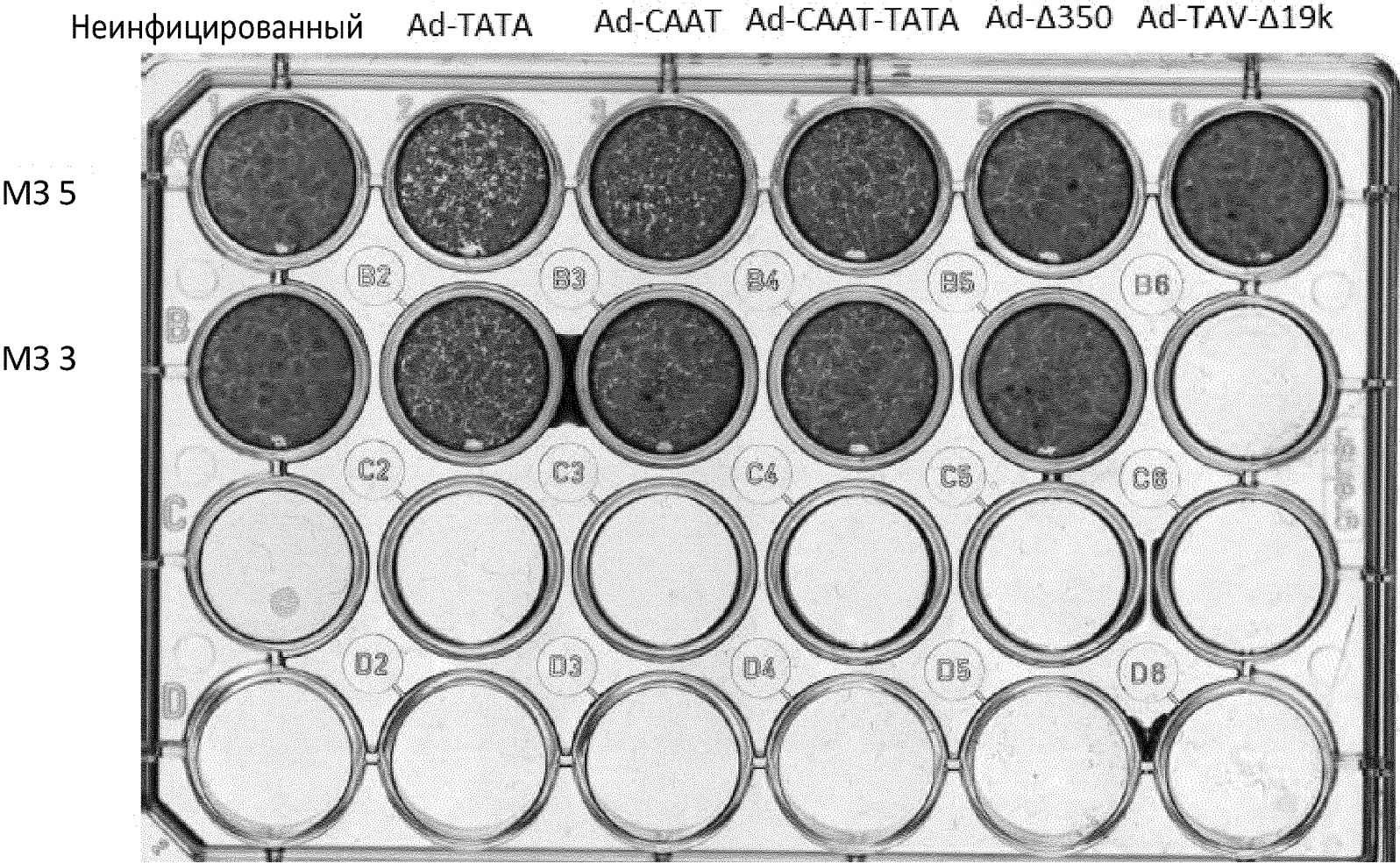


ФИГ.11

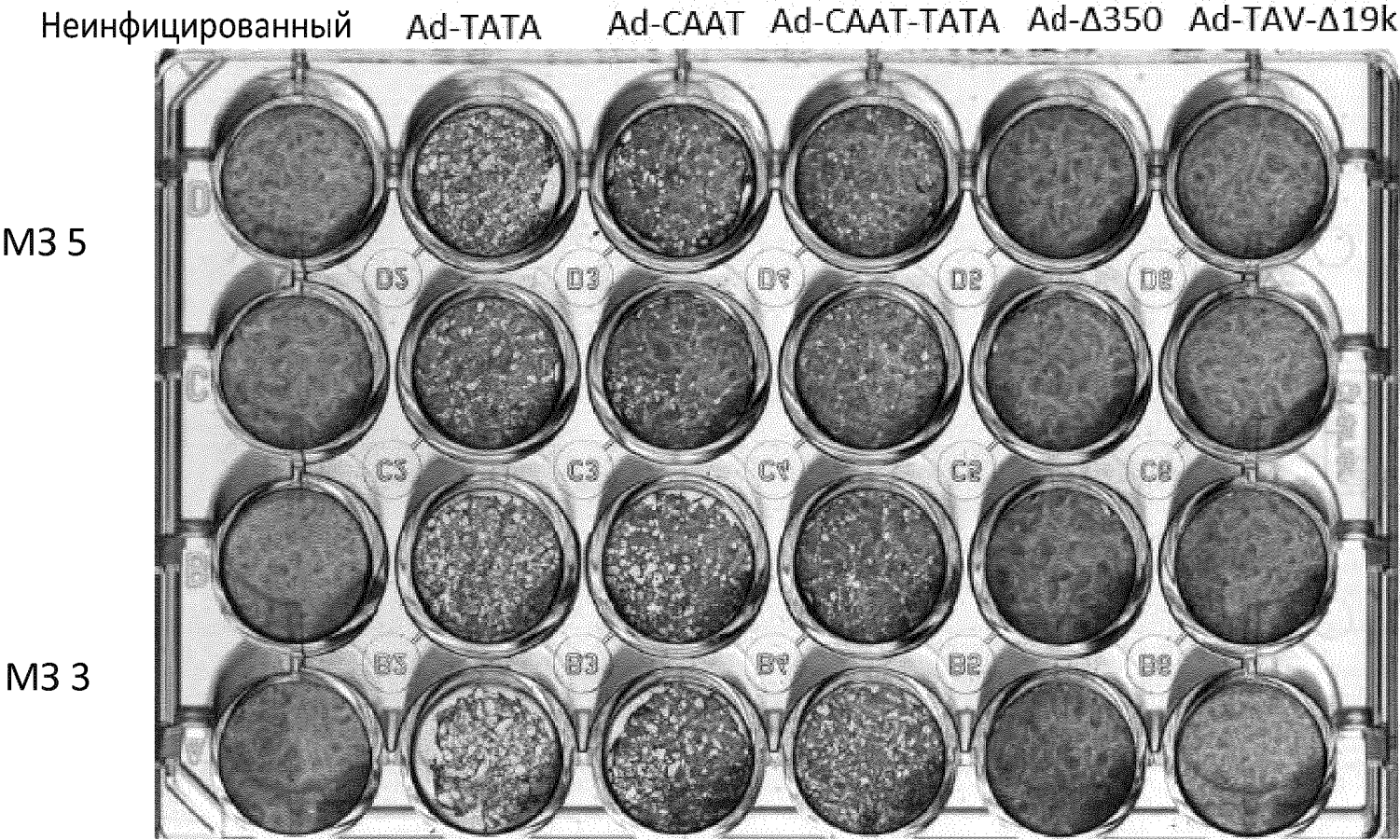




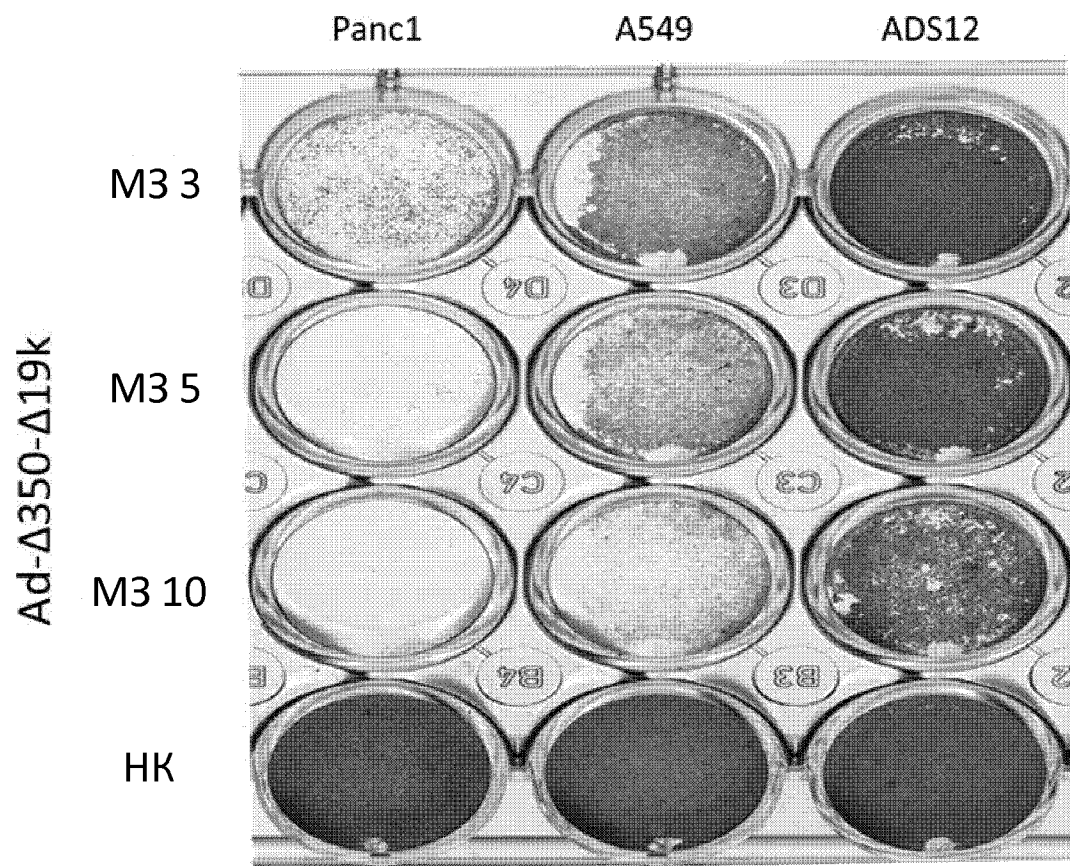
ФИГ.12



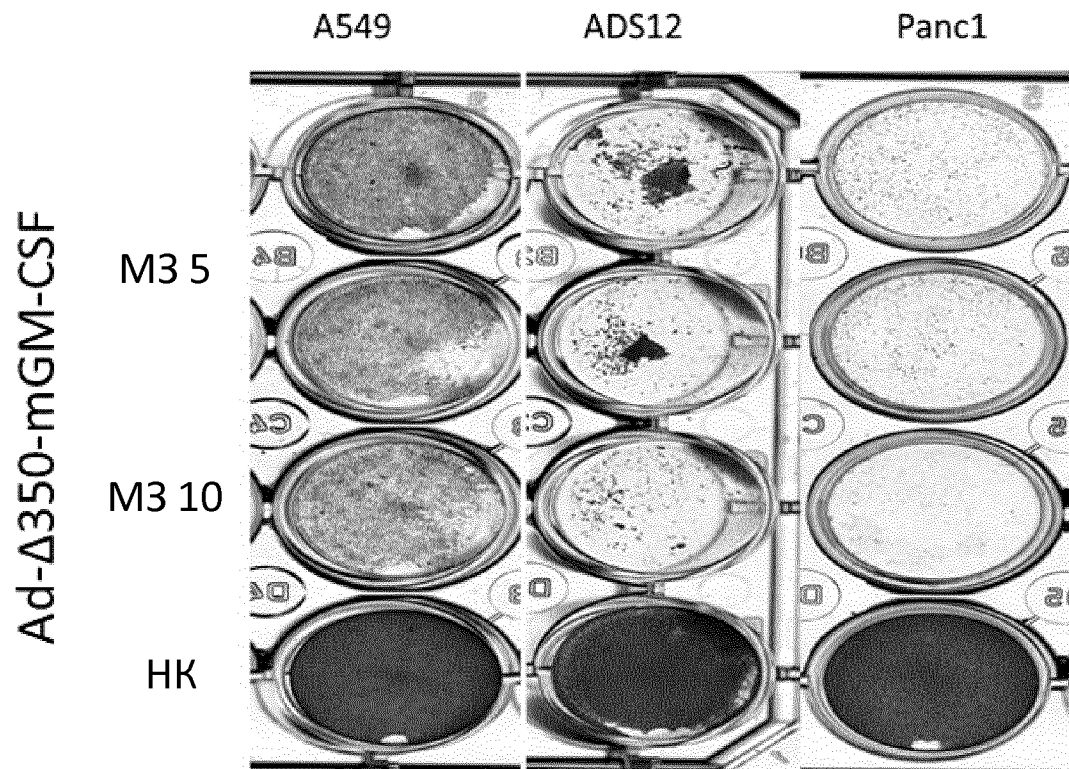
ФИГ.13



## ФИГ.14

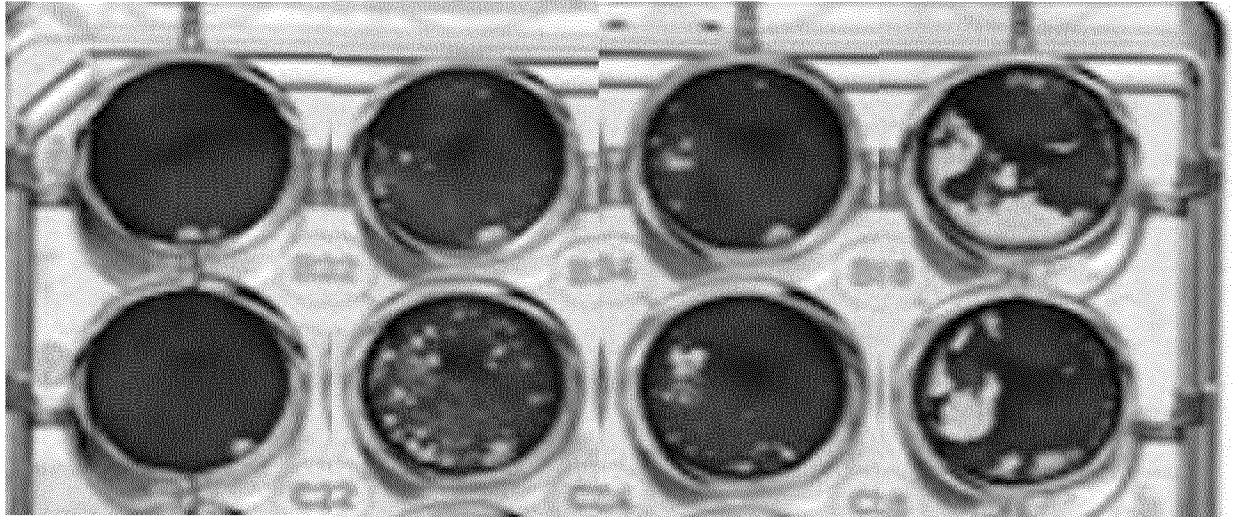


## ФИГ.15



## ФИГ.16

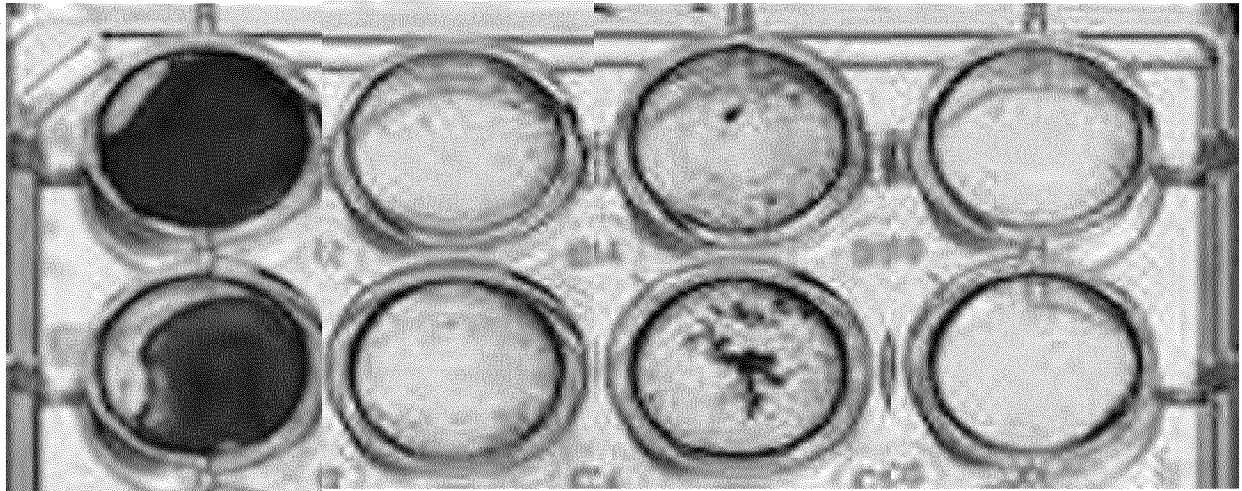
HK      Ad-Δ350-Δ19K   Ad-Δ350-mGMCSF   Ad-TAV-Δ19K





# ФИГ.17

HK      Ad-Δ350-Δ19K    Ad-Δ350-mGMCSF    Ad-TAV-Δ19K



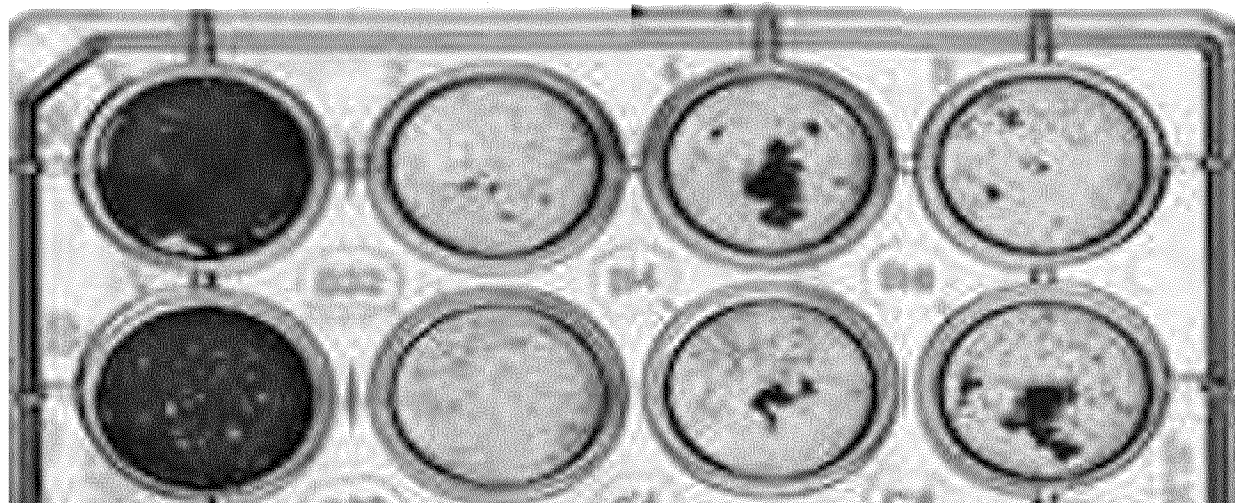
## ФИГ.18

HK      Ad-Δ350-Δ19K    Ad-Δ350-mGMCSF    Ad-TAV-Δ19K



## ФИГ.19

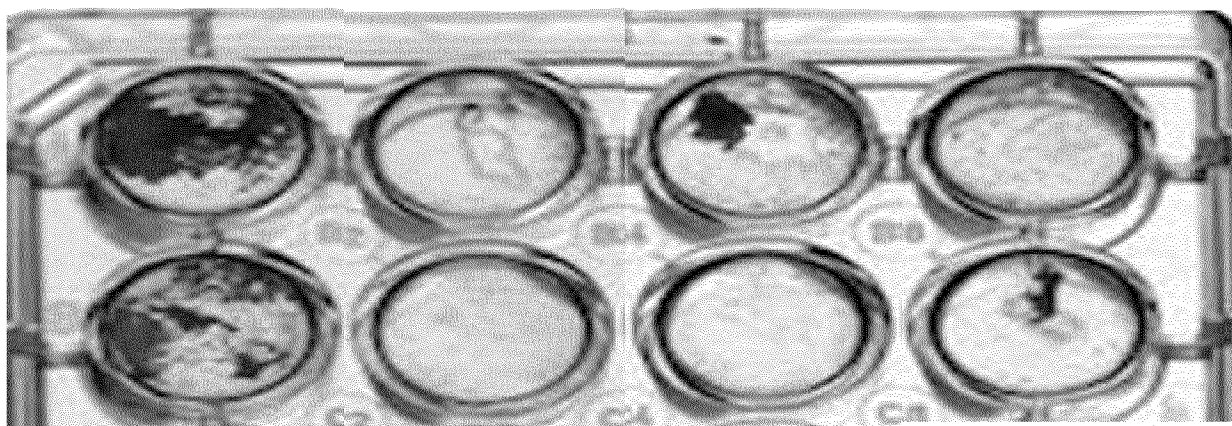
HK      Ad- $\Delta$ 350- $\Delta$ 19K    Ad- $\Delta$ 350-mGMCSF    Ad-TAV- $\Delta$ 19K





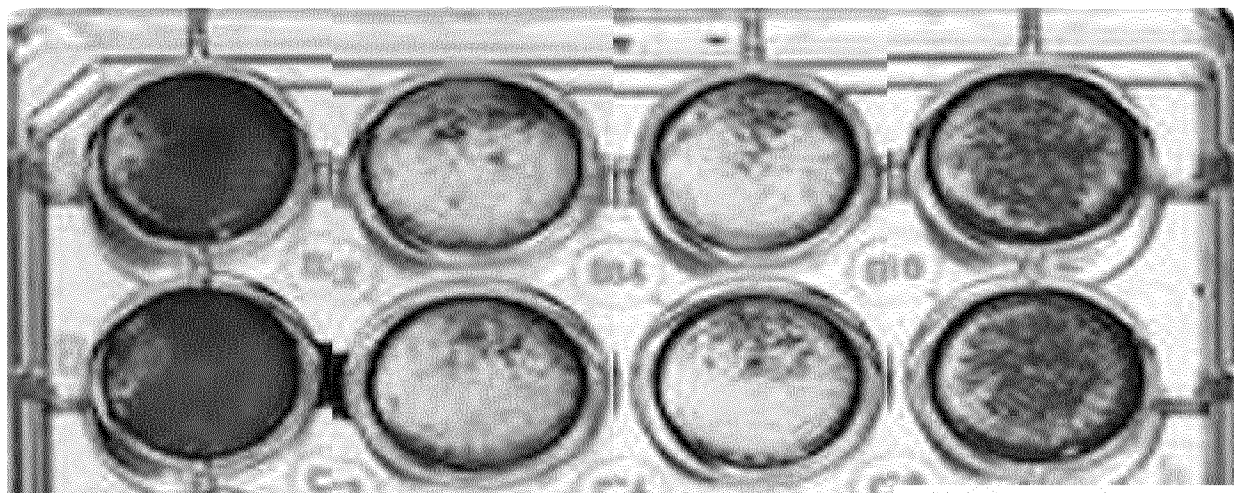
## ФИГ.20

HK      Ad- $\Delta$ 350- $\Delta$ 19K    Ad- $\Delta$ 350-mGMCSF    Ad-TAV- $\Delta$ 19K

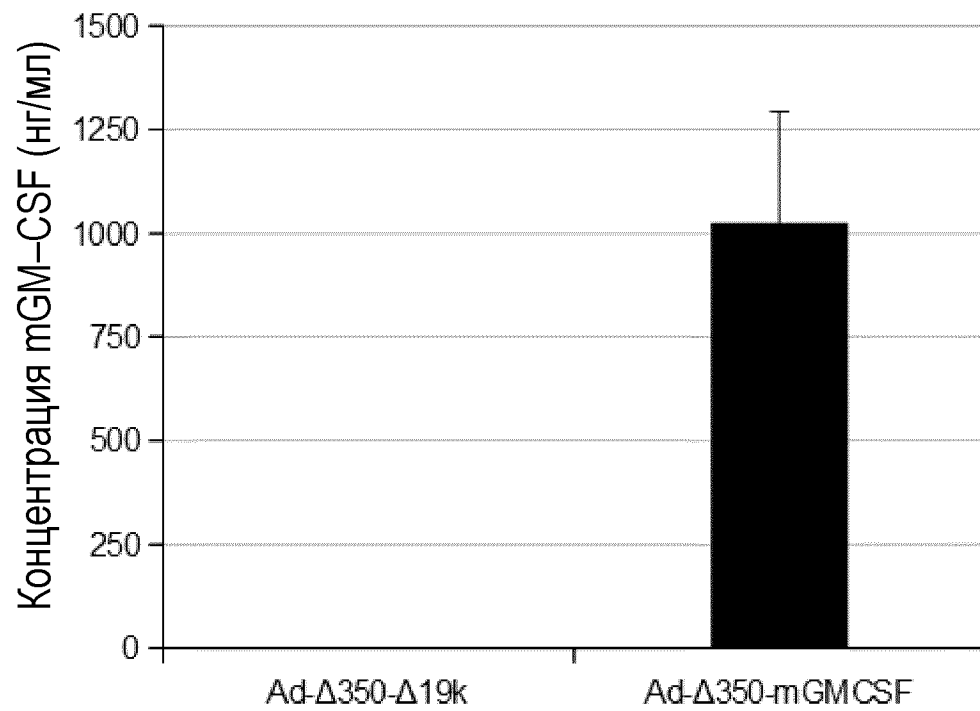


## ФИГ.21

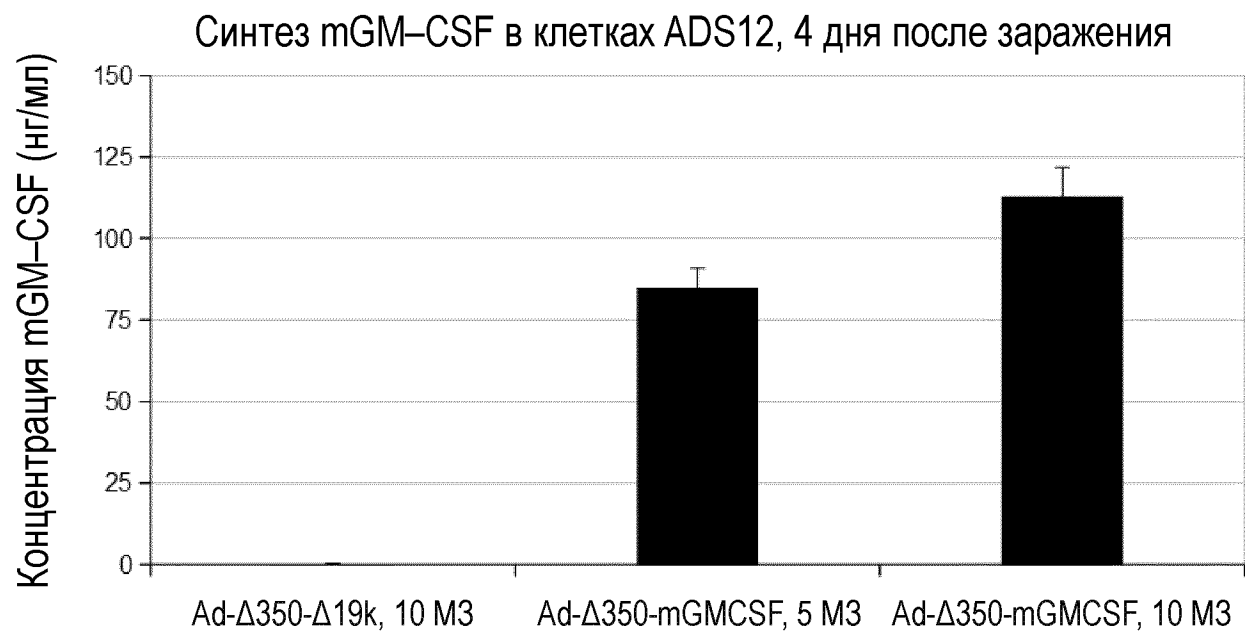
HK      Ad-Δ350-Δ19K    Ad-Δ350-mGMCSF    Ad-TAV-Δ19K



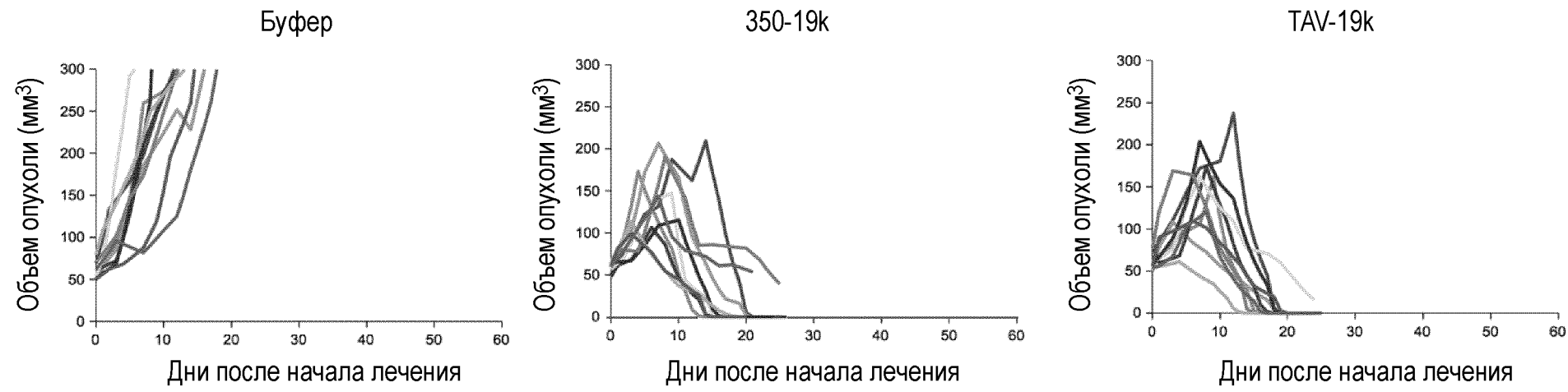
## ФИГ.22



## ФИГ.23



ФИГ.24



ФИГ.25

