

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090700** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.10.21

(51) Int. Cl. *C12N 15/00* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.16

(54) **КОМПЕТЕНТНЫЕ ПО РЕПЛИКАЦИИ АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ**

(31) 62/572,927

(32) 2017.10.16

(33) US

(86) PCT/EP2018/078206

(87) WO 2019/076877 2019.04.25

(71) Заявитель:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:

**Аммендола Вирджиния, Коллока
Стефано, Вителли Алессандра (IT)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(57) Предложены компетентные по репликации обезьяньи аденовирусные векторы для доставки экзогенных иммуногенов. Векторы по изобретению демонстрируют лучшую репликацию и экспрессию экзогенных иммуногенов. Они полезны в качестве профилактических и терапевтических вакцин, а также в генотерапии.

A1

202090700

202090700

A1

НАЗВАНИЕ

КОМПЕТЕНТНЫЕ ПО РЕПЛИКАЦИИ АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был предоставлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанный экземпляр ASCII, созданный 28 сентября 2018 г., назван VU66430_WO_SL.txt и имеет размер 100598 байт.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к области рекомбинантных аденовирусов. В изобретении предложены изолированные компетентные по репликации аденовирусные векторы, рекомбинантные полинуклеотиды, полипептиды, векторы и композиции, содержащие полинуклеотидные и полипептидные последовательности.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Аденовирусы человека широко применяют в области переноса генов благодаря их высокой трансгенной емкости и способности к достижению высокоэффективного переноса генов в различные ткани-мишени. Рекомбинантные аденовирусы полезны в генотерапии и в качестве вакцин. Для разработки вакцин на основе нуклеиновых кислот вирусные векторы на основе обезьяньих аденовирусов могут обеспечить альтернативу применению аденовирусных векторов человеческого происхождения.

В результате контактов с аденовирусами человека у большинства людей, подвергающихся контакту, развивается иммунитет. Существует требование к векторам, эффективно доставляющим молекулы к мишени, предусматривающее сведение к минимуму влияния ранее существующего иммунитета к различным серотипам аденовирусов человека. Для этой цели эффективны обезьяньи аденовирусы; они достаточно близко родственны человеческим вирусам, чтобы обеспечить эффективную индукцию иммунитета к доставляемым экзогенным антигенам, к которым у человека ранее существующий иммунитет незначителен или отсутствует.

Дефектные по репликации аденовирусы доставляют свой геном внутрь клетки, и, поскольку они не реплицируются, не амплифицируют трансгенную полезную нагрузку. Как правило, ген E1 замещен трансгенной кассетой, содержащей выбранный промотор и последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую представляющему(им)

интерес гену или генам, в результате чего рекомбинантный вирус становится дефектным по репликации.

В отличие от дефектных по репликации аденовирусов, компетентные по репликации аденовирусы реплицируют свои ДНК и транскрипты, усиливая таким образом экспрессию в значительно большей степени. Компетентные по репликации аденовирусы обладают потенциальной возможностью для большей активности, но с ними связан риск их распространения и инфицирования членов семьи или медицинских работников. Несмотря на потенциальные проблемы безопасности, компетентные по репликации аденовирусы человека успешно применяются для иммунизации против респираторных заболеваний. Сотни тысяч призывников армии США были эффективно и безопасно вакцинированы против острого респираторного заболевания живыми не аттенуированными изолятами целых вирусов человека Ad4, Ad7 и Ad21, включенными в капсулы или таблетки с энтеросолюбильным покрытием (Cancer Gene Therapy (2004) 11:819).

Описаны компетентные по репликации векторы человека и собаки (Vaccine (2002) 20:3485), тем не менее, ни для одного компетентного по репликации обезьяньего аденовирусного вектора еще не была обнаружена способность к доставке иммуногена или терапевтического агента для профилактики или лечения заболевания. Такой вектор должен сочетать в себе преимущества возможного компетентного по репликации вектора с преимуществами обезьяньего аденовируса, к которому ранее существующий иммунитет у человека отсутствует. Также, хотя обезьяньи векторы обладают способностью к репликации в клетках человека, они реплицируются не так хорошо, как в клетках обезьян, поэтому их активность ослаблена по сравнению с таковой у обезьян. Соответственно, в данной области техники существует потребность в векторах, сочетающих в себе преимущества активной репликации и отсутствия ранее существующего иммунитета у человека.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Компетентные по репликации обезьяньи аденовирусные векторы по изобретению генерируют усиленные ответы на генную вакцину по сравнению с дефектными по репликации обезьяньими аденовирусными векторами. Векторы по изобретению оптимизированы для обеспечения повышенной активности *in vivo* при сохранении приемлемого для иммунизации человека профиля безопасности. Они имеют каркасы, обладающие собственными сильными иммуномодуляторными свойствами, и промоторы,

способные стимулировать сильную и стабильную экспрессию трансгена. Компетентные по репликации векторы по изобретению полезны в качестве компонентов иммуногенных композиций для индукции иммунного ответа у субъекта, в способах их применения в лечении и в способах производства.

В настоящем изобретении предложен компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит промотор и трансген, причем экспрессионная кассета вставлена в область E3, сайт HE1 или сайт HE2 вектора.

В настоящем изобретении также предложен способ применения этого компетентного по репликации обезьяньего аденовирусного вектора для индукции иммунного ответа против заболевания, вызванного патогенным организмом, у нуждающегося в этом субъекта.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1: Конструкции компетентных по репликации обезьяньих аденовирусных векторов. Инвертированные концевые повторы (ITR) фланкируют 3' и 5' концы; E1 представляет собой ранний ген 1; CMV представляет собой промотор цитомегаловируса; CASI представляет собой промотор CASI, RG представляет собой модельный антиген, WPRE представляет собой посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков, ΔE3 означает, что ранний ген 3 делетирован; fiber означает аденовирусный ген, кодирующий белок фибера, а E4 представляет собой ранний ген 4.

Компетентные по репликации обезьяньи аденовирусные векторы конструировали путем вставки экспрессионной кассеты трансгена на место области E3 аденовирусного генома (RC1) (верхняя панель), путем вставки экспрессионной кассеты трансгена в область HE1, т. е. между стоп-кодонами гена белка фибера и областью E4 (средняя панель) или путем вставки экспрессионной кассеты трансгена в область HE2, т. е. ниже правого ITR (RC2) (нижняя панель).

ФИГ. 2: Получение компетентных по репликации векторов ChAd155 и ChAd83, экспрессирующих RC1 и RC2 в первичной линии клеток человека. Столбцы представляют количество экспрессируемых вирусных частиц на клетку.

ФИГ. 3: Суммарная копияность вирусного генома компетентных по репликации векторов ChAd155 и ChAd83, экспрессирующих RC1 и RC2 в первичной линии клеток человека. Столбцы представляют копияность вирусного генома на клетку.

ФИГ. 4: Уровни экспрессии дефектного по репликации (RD) и компетентных по репликации (RC1 и RC2) векторов ChAd155 в первичной линии клеток человека при множественности инфекции 250 и 1250. Векторы экспрессируют трансген, представляющий собой гликопротеин вируса бешенства (51 кДа), что продемонстрировано методом Вестерн-блоттинга. На левой панели показана экспрессия в день 2 после инфицирования, а на правой панели показана экспрессия в день 7 после инфицирования.

ФИГ. 5: Уровни экспрессии дефектного по репликации (RD) и компетентных по репликации (RC1 и RC2) векторов ChAd83 в первичной линии клеток человека при множественности инфекции 250 и 1250. Векторы экспрессируют трансген, представляющий собой гликопротеин вируса бешенства (51 кДа), что продемонстрировано методом Вестерн-блоттинга. На верхней панели показана экспрессия в день 2 после инфицирования, а на нижней панели показана экспрессия в день 7 после инфицирования.

ФИГ. 6: Копийность вирусного генома в компетентных по репликации векторах RC1 и RC2 ChAd155 и экспрессионных векторах RC1 и RC2 ChAd83 в линии мышинных клеток NMuLi (верхняя панель) и в линии клеток Vero отличных от человека приматов (нижняя панель). Клетки инфицировали при значениях множественности инфекции 50 и 250.

ФИГ. 7: Сравнение уровней экспрессии векторов RC1 и RC2 ChAd155, экспрессирующих модельный трансген гликопротеин вируса бешенства (RG) в линии мышинных клеток, что продемонстрировано методом Вестерн-блоттинга, через два и пять дней после инфицирования (верхняя панель). Сравнение уровней экспрессии векторов RC1 и RC2 ChAd155 с векторами RC1 и RC2 ChAd83, экспрессирующих модельный трансген гликопротеин вируса бешенства (RG) в линии мышинных клеток, что продемонстрировано методом Вестерн-блоттинга, через два и пять дней после инфицирования (нижняя панель). Клетки инфицировали при значениях множественности инфекции 50, 250 и 1250.

ФИГ. 8: Иммуногенность дефектных по репликации (RD) векторов ChAd155, векторов RC1 ChAd155 и RC1 ChAd83, экспрессирующих у мышей модельный трансгенный белок, измеряемый методом иммуноферментных пятен с ИФН-гамма и экспрессируемый в виде бляшкообразующих клеток, на 10^6 спленоцитов.

ФИГ. 9: Ответ нейтрализующих антител (верхняя панель) и ответ панели Т-клеток (нижняя панель) на пероральную и внутримышечную (в/м) доставку RD ChAd155 и RC1 ChAd155, экспрессирующих модельный трансгенный белок гликопротеин вируса бешенства у мышей. На верхней панели показана защита против инфицирования вирусом бешенства посредством нейтрализующих антител, измеренная с помощью количественного определения реакции нейтрализации вируса флюоресцентными антителами (FAVN). Пунктирной линией показан пороговый уровень защиты. На нижней панели показан специфичный Т-клеточный ответ на вирус бешенства, измеренный с помощью анализа иммуноферментных пятен с интерфероном гамма.

ОБОЗНАЧЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 – Полинуклеотидная последовательность, кодирующая ChAd155 дикого типа

SEQ ID NO: 2 – Полинуклеотидная последовательность, кодирующая ChAd83 дикого типа

SEQ ID NO: 3 – Полинуклеотидная последовательность, кодирующая промотор CASI

SEQ ID NO: 4 – Полинуклеотидная последовательность, кодирующая усиленный промотор hCMV

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аденовирусы

Аденовирусы представляют собой вирусы в форме икосаэдра без оболочки, геном которых представляет собой линейную двунитевую ДНК приблизительно 36 килобаз (кб). Аденовирусы могут трансдуцировать многочисленные типы клеток нескольких видов млекопитающих, включая как делящиеся, так и не делящиеся клетки, без интеграции в геном клетки-хозяина. Их широко применяют в области переноса генов благодаря их доказанной безопасности, способности к достижению высокоэффективного переноса генов в различные ткани-мишени и высокой трансгенной емкости. В настоящее время аденовирусные векторы применяются в генотерапии и вакцинах, но их недостаток состоит в высокой распространенности ранее существующего иммунитета во всем мире после предшествующего контакта с часто встречающимися аденовирусами человека.

Аденовирусы имеют характерную морфологию капсида в форме икосаэдра, содержащего три основных белка: белок гексона (II), белок пентонового основания (III) и белок фибера с выступом на конце (IV), наряду с множеством других минорных белков

VI, VIII, IX, IIIa и IVa2. Белок гексона формирует большинство структурных компонентов капсида, состоящего из 240 капсомеров тримерного белка гексона и 12 пентоновых оснований. Гексон имеет структуру в виде двух консервативных двойных цилиндров, а на вершине находятся три выступающие структуры, каждая из которых содержит петлю от каждой субъединицы, которые образуют большую часть капсида. Основание гексона характеризуется высокой консервативностью между серотипами аденовируса, при этом поверхностные петли характеризуются вариабельностью. Другим белком капсида аденовируса является пентон, образующий пентамерное основание, к которому присоединяется нить (фибер). Трехмерный белок фибера выступает из основания пентона в каждой из 12 вершин капсида и имеет структуру, подобную стержню с выступом. Основная роль белка фибера состоит в связывании вирусного капсида с поверхностью клетки посредством взаимодействия области выступа с клеточным рецептором. Изменения в областях гибкого ствола, а также выступа фибера характеризуют различные типы аденовируса.

Геном аденовирусов хорошо охарактеризован. Линейная двунитевая ДНК ассоциирована с высокоосновным белком VII и малым пептидом рX (также называемым «мю»). Другой белок V упакован вместе с этим ДНК-белковым комплексом и обеспечивает структурную связь с капсидом посредством белка VI. Общая организация генома аденовируса в целом консервативна в отношении конкретных открытых рамок считывания, расположенных сходным образом, например, положения генов E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 и L5 каждого вируса. Каждый концевой участок аденовирусного генома содержит последовательность, известную как инвертированный концевой повтор (ITR), которая необходима для репликации вируса. 5'-конец генома аденовируса содержит 5'-цис-элементы, необходимые для упаковки и репликации; т. е. последовательности 5' ITR (которые могут действовать как точки начала репликации) и нативные 5'-упаковочные энхансерные домены, которые содержат последовательности, необходимые для упаковки линейных геномов аденовирусов, и энхансерные элементы промотора E1. 3'-конец генома аденовируса включает 3'-цис-элементы, в том числе ITR, необходимые для упаковки и заключения в капсид. Вирус также содержит кодируемую вирусом протеазу, которая необходима для процессинга некоторых структурных белков, требующихся для образования инфекционных вирионов.

Структуру генома аденовирусов описывают в том порядке, в котором экспрессируются вирусные гены после трансдукции клетки-хозяина. Более конкретно

вирусные гены относят к ранним (E) или поздним (L) генам в зависимости от того, происходит ли их транскрипция до или после начала репликации ДНК. В ранней фазе транскрипции экспрессируются гены E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4 аденовируса для подготовки клетки-хозяина к репликации вируса. Ген E1 считают «главным выключателем», он действует как активатор транскрипции и вовлечен в транскрипцию как ранних, так и поздних генов. E2 вовлечен в репликацию ДНК; E3 вовлечен в иммуномодуляцию, а E4 регулирует метаболизм вирусной мРНК. В поздней фазе инфекции активируется экспрессия поздних генов L1–L5, которые кодируют структурные компоненты вирусных частиц. Поздние гены транскрибируются с главного позднего промотора (MLP) с альтернативным сплайсингом.

Капсидные белки аденовируса и кодирующие их полинуклеотиды

Как описано выше, капсид аденовируса содержит три основных белка — белок гексона, белок пентона и белок фибера. Белок гексона формирует большинство структурных компонентов капсида, состоящего из 240 капсомеров тримерного белка гексона и 12 пентоновых оснований. Гексон имеет два консервативных двойных цилиндра, при этом на вершине находятся три выступающие структуры, каждая из которых содержит петлю от каждой субъединицы, которые образуют большую часть капсида. Основание гексона характеризуется высокой консервативностью между серотипами аденовируса, при этом поверхностные петли характеризуются вариабельностью.

Другим капсидным белком аденовируса является пентон, образующий пентамерное основание, к которому присоединяется нить (фибер). Трехмерный белок фибера выступает из основания пентона в каждой из 12 вершин капсида и имеет структуру, подобную стержню с выступом. Значительное отличие поверхности аденовирусных капсидов по сравнению с большинством других икосаэдрических вирусов состоит в наличии длинного, тонкого белка фибера. Основная роль белка фибера состоит в связывании вирусного капсида с поверхностью клетки посредством его взаимодействия с клеточным рецептором.

Белки фибера множества серотипов аденовируса имеют общую архитектуру: N-концевой хвост, центральный ствол, состоящий из повторяющихся последовательностей, и C-концевой глобулярный домен выступа (или «головки»). Центральный ствол домен состоит из изменчивого количества бета-повторов. Бета-повторы соединяются с образованием очень прочной и стабильной продолговатой структуры из трех

переплетенных спиральных нитей. Ствол соединяет N-концевой ствол с глобулярной структурой выступа, ответственной за взаимодействие с рецептором клетки-мишени. Глобулярный характер домена выступа аденовируса обеспечивает широкие поверхности для связывания рецептора, как сбоку, так и сверху. Действие этой архитектуры состоит в том, чтобы сайт связывания с рецептором значительно выступал из вирусного капсида, тем самым освобождая вирус от стерических ограничений, создаваемых за счет относительно плоской поверхности капсида.

Хотя фиберы многих серотипов аденовируса имеют одинаковую общую архитектуру, они имеют переменные аминокислотные последовательности, которые влияют как на их структуру, так и на функцию. Например, ряд экспонированных областей на поверхности выступа фибера образует участок, легко приспособляемый к связыванию рецептора. Глобулярная форма выступа фибера позволяет рецепторам связываться с ним по сторонам выступа или сверху выступа фибера. Эти участки связывания, как правило, находятся на открытых для доступа с поверхности петлях, соединяющих бета-нити, которые характеризуются слабой консервативностью среди аденовирусов человека. Открытые для доступа боковые цепи на этих петлях придают выступу ряд поверхностных признаков, сохраняя при этом третичную и четвертичную структуру. Например, распределение электростатического потенциала и заряда по поверхностям выступа может различаться из-за широкого диапазона изоэлектрических точек в последовательностях выступа фибера, варьирующих от pI приблизительно 9 для аденовируса (Ad) 8, Ad 19 и Ad 37 до приблизительно 5 для аденовирусов подгруппы В. Поскольку белок фибера является вирусным лигандом со сложной структурой, возможна презентация различных связывающих поверхностей (выступа) в многочисленных ориентациях и расстояниях (ствол) от вирусного капсида.

Одним из наиболее очевидных различий между некоторыми серотипами является длина фибера. Исследования показали, что длина ствола фибера значительно влияет на взаимодействие выступа и вируса с его рецепторами-мишенями. Кроме того, белки фибера могут также различаться между серотипами по их способности к изгибу. Хотя бета-повторы в участке ствола образуют в высокой степени стабильную и правильную структуру, исследования с помощью электронной микроскопии (ЭМ) показали наличие отдельных шарнирных участков. В анализе последовательности белков фибера из нескольких серотипов аденовируса было точно определено прерывание повторяющихся последовательностей ствола в третьем бета-повторе от N-концевого хвоста, в

значительной степени коррелирующее с одним из шарнирных участков, наблюдаемых в электронный микроскоп (ЭМ). Шарнирные участки в фибере дают возможность выступу принимать разнообразные ориентации относительно вирусного капсида, за счет чего могут быть преодолены стерические затруднения для связывания с рецептором, требующего корректной презентации сайта связывания рецептора на выступе. Например, для жестких фиберов аденовирусов подгруппы D требуется гибкий или предрасположенный к присоединению вируса рецептор, поскольку сами они неспособны к изгибу.

Благодаря использованию технологии псевдотипирования фиберов удалось идентифицировать конкретные клеточные рецепторы для различных серотипов Ad и получить информацию о том, какой вклад они вносят в тканевую тропизм. Хотя Ad некоторых подгрупп в качестве основного рецептора используют рецептор вирусов Коксаки и аденовирусов (CAR), становится ясно, что многие Ad используют альтернативные основные рецепторы, что приводит к значительным различиям тропизма *in vitro* и *in vivo*. Фиберы этих серотипов характеризуются четкими различиями по первичной и третичной структуре, например, по жесткости ствола фибера, по длине ствола фибера и по отсутствию сайта связывания CAR и/или предполагаемого связывающего мотива HSPG, наряду с различиями по сетевому заряду внутри выступа фибера. Псевдотипирование частиц Ad 5 с альтернативными вариантами ствола и выступа фибера, таким образом, дает возможность удалить важные домены связывания с клеткой и кроме того, может дать возможность более эффективной (и потенциально более избирательной для клеток) доставки трансгена в определенные типы клеток по сравнению с достигнутой с помощью Ad 5. Нейтрализацию частиц Ad с псевдотипированным фибером можно также уменьшить, если использовать фиберы от Ad с более низкой серопревалентностью у человека или в экспериментальных моделях, что является благоприятной ситуацией для успешного введения вектора. Кроме того, полноразмерный фибер, а также изолированные участки выступа, но не гексон и не пентон по отдельности, способны индуцировать созревание дендритных клеток и связаны с индукцией активного CD8⁺ Т-клеточного ответа. С учетом этих данных в совокупности белок фибера аденовирусов играет важную роль по меньшей мере в связывании рецептора и иммуногенности аденовирусных векторов.

Репликация аденовируса

Исторически разработка аденовирусных вакцин была сосредоточена на дефектных, не реплицирующихся вирусах. Дефектность по репликации им придает делеция генов в существенном для репликации участке E1. Как правило, гены несущественного участка E3 также делетированы, чтобы обеспечить свободное место для экзогенных трансгенов. Затем вставляют экспрессионную кассету, содержащую трансген под контролем экзогенного промотора. Затем эти дефектные по репликации вирусы продуцируют в клетках, комплементирующих E1.

Термин «дефектный по репликации» или «некомпетентный по репликации» аденовирус относится к неспособному к репликации аденовирусу в связи с тем, что он сконструирован так, что содержит по меньшей мере функциональную делецию (или мутацию утраты функции), т. е. делецию или мутацию, нарушающую функцию гена без его полного удаления, например, введение искусственных стоп-кодонов, делецию или мутацию активных центров или интерактивных доменов, мутацию или делецию регуляторной последовательности гена и т. д., или полное удаление гена, кодирующего существенный для репликации вируса генный продукт, такой как один или более из аденовирусных генов, выбранных из E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4 (таких как E3 ORF1, E3 ORF2, E3 ORF3, E3 ORF4, E3 ORF5, E3 ORF6, E3 ORF7, E3 ORF8, E3 ORF9, E4 ORF7, E4 ORF6, E4 ORF4, E4 ORF3, E4 ORF2 и/или E4 ORF1). Целесообразно удалять E1 и возможно E3 и/или E4. В случае удаления упомянутого выше участка гена его целесообразно не учитывать при выравнивании последовательности для определения ее идентичности по отношению к другой последовательности.

Термин «компетентный по репликации» аденовирус относится к аденовирусу, который может реплицироваться в клетке-хозяине в отсутствие каких-либо рекомбинантных белков-помощников, содержащихся в клетке. Целесообразно, чтобы «компетентный по репликации» аденовирус содержал интактные структурные гены и следующие интактные или функционально существенные ранние гены: E1A, E1B, E2A, E2B и E4. Аденовирусы дикого типа, выделенные у конкретного животного, могут быть компетентными по репликации у этого животного.

Векторы по изобретению

Вирусные векторы на основе аденовируса обезьян, отличных от человека, представляют альтернативу применению векторов человеческого происхождения для генотерапии и генетических вакцин. Некоторые аденовирусы, выделенные у обезьян, отличных от человека, близко родственны аденовирусам, выделенным у человека, что

продемонстрировано на основании их эффективного размножения в клетках человеческого происхождения. Поскольку у человека не развивается или развивается лишь незначительный иммунитет к обезьяньим аденовирусам, их разработка перспективна для создания усовершенствованной альтернативы применению человеческих аденовирусов.

Термин «вектор» относится к по меньшей мере одному полинуклеотиду или к смеси по меньшей мере одного полинуклеотида и по меньшей мере одного полипептида, которые способны к введению полинуклеотида в клетку. «Низкая серопревалентность» может означать наличие сниженного титра ранее существующих нейтрализующих антител по сравнению с аденовирусом 5 (Ad5) человека. Аналогично или альтернативно «низкая серопревалентность» может означать серопревалентность менее чем примерно 35%, серопревалентность менее чем примерно 30%, серопревалентность менее чем примерно 20%, серопревалентность менее чем примерно 15%, серопревалентность менее чем примерно 10%, серопревалентность менее чем примерно 5%, серопревалентность менее чем около 4%, серопревалентность менее чем примерно 3%, серопревалентность менее чем около 2%, серопревалентность менее чем примерно 1% или отсутствие определяемой серопревалентности. Серопревалентность можно измерить как долю индивидов в процентах, имеющих клинически значимый титр нейтрализующих антител (определяемый как титр антител, вызывающий 50%-ю нейтрализацию, более 200), с использованием методов, описанных в работе Hum. Gene Ther. (2004) 15:293.

В одном воплощении изобретения аденовирусный вектор по настоящему изобретению получен из аденовируса обезьян, отличных от человека, также называемый «обезьяньим аденовирусом». У обезьян, отличных от человека, таких как шимпанзе, бонобо, макаки резус, орангутаны и гориллы, выделены многочисленные аденовирусы. Векторы, полученные из этих аденовирусов, могут индуцировать выраженные иммунные ответы на трансгены, кодируемые этими векторами. Некоторые преимущества векторов на основе аденовирусов обезьян, отличных от человека, включают относительное отсутствие перекрестно нейтрализующих антител к этим аденовирусам в целевой популяции людей, таким образом, их применение позволяет преодолеть ранее существующий иммунитет к аденовирусам человека. Например, некоторые обезьяньи аденовирусы не обладают перекрестной реактивностью с ранее существующими нейтрализующими антителами человека, и перекрестная реакция некоторых аденовирусов шимпанзе с ранее существующими антителами человека присутствует лишь у 2% целевой

популяции по сравнению с 35% в случае некоторых векторов-кандидатов на основе аденовируса человека (Sci. Transl. Med. (2012) 4:1).

Аденовирусные векторы по изобретению могут быть получены из аденовируса биологического вида, отличного от человека, например обезьяньего аденовируса, например от шимпанзе (*Pan troglodytes*), бонобо (*Pan paniscus*), гориллы (*Gorilla gorilla*) и орангутанов (*Pongo abelii* и *Pongo pygmaeus*). Они включают аденовирусы из группы В, группы С, группы D, группы Е и группы G. Аденовирусы шимпанзе включают без ограничений ChAd3, ChAd15, ChAd19, ChAd25.2, ChAd26, ChAd27, ChAd29, ChAd30, ChAd31, ChAd32, ChAd33, ChAd34, ChAd35, ChAd37, ChAd38, ChAd39, ChAd40, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, ChAdOx1, ChAdOx2 и SadV41. Альтернативно аденовирусные векторы могут быть получены из аденовирусов обезьян, отличных от человека, выделенных из бонобо, таких как PanAd1, PanAd2, PanAd3, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (также называемого C7) и Pan 9. Векторы могут полностью или частично включать нуклеотид, кодирующий фибер, пентон или гексон аденовируса не человеческого происхождения.

В предпочтительном воплощении изобретения обезьяна представляет собой шимпанзе. В некоторых воплощениях изобретения компетентный по репликации аденовирусный вектор шимпанзе дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фибера аденовируса шимпанзе или его функциональное производное и/или область E4 аденовируса шимпанзе.

В одном воплощении изобретения вектор представляет собой аденовирус с низкой серопревалентностью у человека, где «низкая серопревалентность» у субъекта-человека составляет менее 30%. В одном воплощении аденовирусных векторов по изобретению аденовирус имеет серопревалентность у субъекта-человека менее 30%, предпочтительно серопревалентность у субъекта-человека отсутствует, и более предпочтительно серопревалентность отсутствует у субъекта-человека, ранее не контактировавшего с аденовирусом шимпанзе.

Выбор участков дефектных по репликации векторов для вставки кассеты экспрессии гена, прежде всего, основан на замещении областей, заведомо вовлеченных в репликацию вируса. Выбор участков компетентных по репликации векторов для вставки кассеты экспрессии гена должен быть таким, чтобы сохранить механизм репликации. Вирусы максимально увеличивают свою кодирующую емкость за счет образования транскриптов высокой сложности, контролируемых множественными промоторами, и

альтернативного сплайсинга. Следовательно, у компетентных по репликации вирусов должны быть сохранены последовательности, необходимые для репликации, но при этом остается пространство для функциональных экспрессионных кассет.

Для аденовируса типа С ChAd155 (WO/2016/198621) и аденовируса типа Е ChAd83 (WO 2010/085984) количественно определяемая серопревалентность у человека не показана, т. е. эти штаммы аденовируса составляют исключение среди описанных до настоящего времени аденовирусов шимпанзе, состоящее в том, что все исследованные сыворотки человека дали полностью отрицательный результат анализа на наличие нейтрализующих антител. В предпочтительном воплощении изобретения обезьяний аденовирусный вектор по изобретению представляет собой ChAd155 или ChAd83.

В воплощениях аденовирусных векторов по изобретению аденовирусная ДНК способна проникать в клетку-мишень млекопитающих, т. е. является инфекционной. Инфекционный рекомбинантный аденовирус по изобретению можно применять в качестве профилактической или терапевтической вакцины и для генотерапии. Таким образом, в одном воплощении изобретения рекомбинантный аденовирус содержит эндогенную молекулу для доставки в клетку-мишень. Клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего, например коровью клетку, собачью клетку, козью клетку, оленью клетку, клетку шимпанзе, клетку летучей мыши, лошадиную клетку, кошачью клетку, человеческую клетку, волчью клетку, овечью клетку, свиную клетку, клетку грызуна, медвежью клетку или лисью клетку. Например, эндогенная молекула для доставки в клетку-мишень может представлять собой экспрессионную кассету.

Согласно изобретению предложен компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит промотор и трансген, причем экспрессионная кассета вставлена в область Е3, участок HE1 или участок HE2 вектора. Вектор содержит область Е1 или ее фрагменты, необходимые для репликации.

В одном воплощении изобретения промотор выбран из промотора CASI и усиленного промотора цитомегаловируса.

В дополнительном воплощении изобретения экспрессионная кассета может дополнительно содержать посттранскрипционный регуляторный элемент, и этот посттранскрипционный регуляторный элемент может представлять собой посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков.

В другом воплощении изобретения трансген представляет собой антиген. Антиген может быть выбран из антигена вируса бешенства, антигена респираторно-синцитиального вируса, антигена вируса иммунодефицита человека, антигена туберкулезной палочки, малярийного антигена, антигена вируса гепатита С, антигена лихорадки чикунгунья и антигена вируса гепатита В.

В воплощениях изобретения присутствует область E1 или ее фрагменты, необходимые для репликации, и представляющая интерес экзогенная последовательность вставлена в полностью или частично deletированную область E3. В одном воплощении изобретения вектор содержит левую ITR область, за которой следует область E1, затем область E3, которая замещена экспрессионной кассетой, содержащей промотор, представляющий интерес антиген и возможно дополнительные энхансерные элементы; за ними следует область фибера, область E4 и правый ITR; трансляция идет в правостороннем направлении. В дополнительном воплощении изобретения промотор представляет собой промотор CMV. Еще в одном дополнительном воплощении изобретения энхансерный элемент представляет собой посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE) или посттрансляционный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

В других воплощениях изобретения вектор содержит левую ITR область; за ней следует область E1; частично deletированная область E3; область фибера; область E4; экспрессионная кассета, содержащая промотор, представляющий интерес антиген и возможно один или более энхансерных элементов, вставленная в участок HE1, т. е. между стоп-кодонами гена фибера и областью E4 («сайтом HE1»); за ней следует правая ITR. Сайт вставки HE1 ChAd155 находится между п. о. 34611 и 34612 последовательности ChAd155 дикого типа. Сайт вставки HE1 ChAd83 находится между п. о. 33535 и 33536 последовательности ChAd83 дикого типа. Трансляция идет в правостороннем направлении. В дополнительном воплощении изобретения промотор представляет собой промотор CASI. Еще в одном дополнительном воплощении изобретения энхансерный элемент представляет собой HPRE или WPRE.

В дополнительных воплощениях изобретения вектор содержит левую ITR область; за ней следует область E1; частично deletированная область E3; область фибера; область E4; экспрессионная кассета, содержащая промотор, представляющий интерес антиген и возможно один или более энхансерных элементов, вставленных в сайт HE2, т. е. между концом левой ITR и сайтом кэпирования мРНК E4 («сайт HE2»); за ней следует правая

ITR. Сайт вставки HE2 ChAd155 находится между п. о. 37662 и 37663 последовательности ChAd155 дикого типа. Сайт вставки HE2 ChAd83 находится между п. о. 36387 и 36388 последовательности ChAd83 дикого типа. Трансляция идет в левостороннем направлении. В дополнительном воплощении изобретения промотор представляет собой промотор CASI. В еще одном дополнительном воплощении изобретения энхансерный элемент представляет собой HPRE или WPRE.

Сайты HE1 и HE2 были идентифицированы как участки для вставки трансгена, поскольку вставки в этих конкретных точках не прерывают кодирующие последовательности или регуляторные последовательности ChAd155 и ChAd83. Таким образом, вставка экспрессионных кассет в сайты HE1 или HE2 генома ChAd не влияет на цикл репликации вируса.

В одном воплощении изобретения вектор представляет собой функциональное или иммуногенное производное аденовирусного вектора. Под «производным аденовирусного вектора» понимают модифицированный вариант вектора, например, один или более нуклеотидов вектора deletированы, вставлены, модифицированы или заменены.

Регуляторные элементы

Регуляторные элементы, т. е. последовательности, контролирующие экспрессию, включают соответствующие последовательности инициации, терминации транскрипции, промотора и энхансера; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (поли А), включая поли А кроличьего бета-глобина; регулируемые тетрациклином системы, микроРНК, посттранскрипционные регуляторные элементы, например WPRE (посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков); последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, усиливающие эффективность трансляции (например, консенсус-последовательность Козака); последовательности, усиливающие стабильность белка; и при желании последовательности, усиливающие секрецию кодируемого продукта.

«Промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая допускает связывание РНК-полимеразы и направляет транскрипцию гена. Как правило, промотор расположен в некодирующей области гена проксимально к участку старта транскрипции. Элементы последовательности внутри промоторов, которые действуют как инициаторы транскрипции, часто характеризуются нуклеотидными консенсус-последовательностями. Примеры промоторов включают без ограничений промоторы бактерий, дрожжей, растений, вирусов и млекопитающих, включая обезьян и человека. В

данной области техники известно и может быть использовано большое число контрольных последовательностей экспрессии, которые являются внутренними, нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифическими.

Промоторы по изобретению, как правило, представляют собой гетерологичные промоторы. «Гетерологичный» означает «полученный из генотипически отличающегося объекта» от остальных объектов, с которыми его сравнивают. Промоторы по изобретению могут быть конститутивными или индуцибельными. Конститутивные промоторы инициируют синтез РНК независимо от влияния регулирующих факторов. Индуцибельные промоторы допускают регуляцию экспрессии гена и могут подлежать регуляции со стороны экзогенно предоставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия определенного физиологического состояния.

Промоторы по изобретению включают без ограничений промоторы CMV, промоторы бета-актина, например промоторы бета-актина кур (CAG), промоторы CASI, промоторы фосфоглицераткиназы-1 (PGK) человека, промоторы TBG, промоторы ретровирусных длинных концевых повторов (LTR) вируса саркомы Рауса, промоторы SV40, промоторы дигидрофолатредуктазы, промоторы фосфоглицеринкиназы (PGK), промоторы EF1a, овечьи цинк-индуцибельные промоторы металлотioneина (MT), индуцируемые дексаметазоном (Dex) опухолевые промоторы мыши (MMTV), промоторные системы полимеразы T7, промоторы экдизона насекомых, тетрациклин-репрессируемые системы, тетрациклин-индуцибельные системы, RU486-индуцибельные системы и рапамицин-индуцибельные системы.

Трансген может быть функционально связан с тканеспецифическим промотором. Например, если желательна экспрессия в скелетной мышце, следует использовать промотор, активный в мышечной ткани. Эти промоторы включают промоторы генов, кодирующих скелетно-мышечный бета-актин, легкую цепь 2A миозина, дистрофин, мышечную креатинкиназу, а также синтетические мышечные промоторы, активность которых превышает активность природных промоторов. Примеры обладающих тканеспецифичностью промоторов известны для печени, например, альбумин, коровий промотор вируса гепатита В, альфа-фетопропротеин (AFP); кости, например промоторы остеокальцина, костного сиалопротеина; лимфоцитов, например промоторы CD2, тяжелой цепи иммуноглобулина и цепи Т-клеточного рецептора; и нейронов, например нейрон-специфичной енолазы (NSE).

Возможно, несущие трансгены векторы, кодирующие терапевтически полезные или иммуногенные продукты, могут также включать в себя селективные маркеры или гены-репортеры. Ген-репортер может быть выбран из известных в данной области техники генов. Подходящие гены-репортеры включают без ограничений гены усиленного зеленого флуоресцентного белка, красного флуоресцентного белка, люциферазы и секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (seAP), которые могут включать в себя последовательности, кодирующие среди прочего устойчивость к генетицину, гигромицину и пурамицину. Такие селективные гены-репортеры или гены-маркеры (которые могут быть или могут не быть локализованы вне вирусного генома, упаковываемого в вирусную частицу), можно использовать как сигнал присутствия плазмид в бактериальных клетках, например устойчивость к ампициллину. Другие компоненты вектора могут включать точку начала репликации.

Подходящие промоторы включают промотор цитомегаловируса (CMV) и промотор CASI. Промотор CMV является сильным и обладает универсальной активностью. Он обладает способностью к стимуляции высоких уровней экспрессии трансгена во множестве типов тканей и хорошо известен в данной области техники. Промотор CMV можно использовать в векторах по изобретению либо с энхансером, либо без энхансера CMV.

Промотор CASI представляет собой синтетический промотор, описанный как комбинация энхансера CMV, промотора бета-актина кур и донорного и акцепторного сайтов сплайсинга, фланкирующих энхансер убиквитина (UBC) (US 8865881).

В некоторых воплощениях изобретения промотор CASI может включать в себя последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или более идентичности последовательности SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях изобретения промотор содержит последовательность или состоит из последовательности SEQ ID NO: 3. В некоторых воплощениях изобретения усиленный промотор hCMV может включать в себя последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или более идентичности последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых

воплощениях изобретения промотор содержит последовательность или состоит из последовательности SEQ ID NO: 4.

Подходящие промоторы также включают без ограничений промотор фактора элонгации 1 шимпанзе (chEF1), обладающий сильной активностью и универсальный промотор, обеспечивающий устойчивую экспрессию трансгенов *in vivo*. В одном воплощении изобретения промотор представляет собой промотор легкой цепи ферритина человека с энхансером CMV. В этом воплощении изобретения 5'-нетранслируемые области (UTR) тяжелой и легкой цепей ферритина замещены 5'UTR фактора элонгации 1 альфа шимпанзе, чтобы устранить регуляцию железа ферритином. В одном воплощении изобретения промотор представляет собой промотор бета-актина кур с энхансером CMV. В одном воплощении изобретения промотор представляет собой гибридный промотор. В одном воплощении изобретения гибридный промотор представляет собой промотор CMV с энхансером CMV и энхансером гена убиквитина и является более сильным промотором, чем общеизвестный промотор CMV.

«Посттранскрипционный регуляторный элемент», используемый в настоящем документе, представляет собой последовательность ДНК, которая при транскрипции усиливает экспрессию трансгена(ов) или его (их) фрагментов, доставляемых вирусными векторами по изобретению. Посттранскрипционные регуляторные элементы включают без ограничений посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE). WPRE представляет собой цис-активный элемент из трех частей, который, как было продемонстрировано, усиливает экспрессию трансгена, управляемую некоторыми, но не всеми промоторами.

В воплощениях изобретения вектор ChAd155 может содержать одно или более из промотора, энхансера и гена-репортера. Например, векторы по изобретению могут содержать ChAd155-усиленный hCMV-SeAP, ChAd155-CASI-seAP и ChAd155-hCMV-seAP, возможно с транскрипционным контролем тетрациклина или без него, и ChAd155-CMV-hFerL-chEF1-seAP с транскрипционным контролем тетрациклина или без него.

В воплощениях изобретения вектор ChAd83 может содержать одно или более из промотора, энхансера и гена-репортера. Например, векторы по изобретению могут содержать ChAd83 с усиленным hCMV-SeAP, ChAd83-CASI-seAP и ChAd83-hCMV-seAP, возможно с транскрипционным контролем тетрациклина или без него, и ChAd83-CMV-hFerL-chEF1-seAP с транскрипционным контролем тетрациклина или без него.

Векторы по изобретению получают с помощью описанных в настоящем документе методик в сочетании с методиками, известными специалистам в данной области техники. Такие методики включают традиционные методики клонирования кДНК, такие как описаны в учебных руководствах, использование перекрывающихся олигонуклеотидных последовательностей аденовирусных геномов, полимеразную цепную реакцию и любой подходящий метод, обеспечивающий желаемую нуклеотидную последовательность.

Трансгены

Аденовирусные векторы можно использовать для доставки желаемых последовательностей РНК или белка, например, гетерологичных последовательностей для экспрессии *in vivo*. Вектор по изобретению может включать в себя любой генетический элемент, включая «голую» ДНК, бактериофаг, транспозон, космиду, эписому, плазмиду или вирусный компонент. Векторы по изобретению могут содержать ДНК обезьяньего аденовируса и экспрессионную кассету. «Экспрессионная кассета» содержит трансген и регуляторные элементы, необходимые для трансляции, транскрипции и/или экспрессии трансгена в клетке-хозяине.

«Трансген» представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную по отношению к фланкирующим трансген векторным последовательностям, которая кодирует представляющий интерес полипептид. Кодированная последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, чтобы допускать транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию трансгена в клетке-хозяине. В воплощениях изобретения векторы экспрессируют трансгены терапевтического или профилактического уровня. «Функциональное производное» трансгенного полипептида представляет собой модифицированный вариант полипептида, в котором, например, одна или более аминокислот делетированы, вставлены, модифицированы или заменены.

Трансген можно применять для профилактики или лечения, например, в качестве вакцины для индукции иммунного ответа, для коррекции генетических дефектов путем коррекции или замещения дефектного или отсутствующего гена или в качестве терапевтического средства для лечения рака. При использовании в настоящем документе индукция иммунного ответа относится к способности белка индуцировать Т-клеточный ответ и/или гуморальный ответ антител на этот белок.

Вызываемый трансгеном иммунный ответ может представлять собой антиген-специфичный В-клеточный ответ, при котором вырабатываются нейтрализующие

антитела. Вызываемый иммунный ответ может представлять собой антиген-специфичный Т-клеточный ответ, который может представлять собой системный и/или местный ответ. Антиген-специфичный Т-клеточный ответ может включать в себя CD4+ Т-клеточный ответ, такой как ответ, в который вовлечены CD4+ Т-клетки, экспрессирующие цитокины, например интерферон гамма (ИФН гамма), фактор некроза опухоли альфа (ФНО альфа) и/или интерлейкин 2 (ИЛ2). Альтернативно или дополнительно антиген-специфичный Т-клеточный ответ включает в себя CD8+ Т-клеточный ответ, такой как ответ, в который вовлечены CD8+ Т-клетки, экспрессирующие цитокины, например ИФН гамма, ФНО альфа и/или ИЛ2.

Трансгены по изобретению включают без ограничений антигены вируса бешенства, например гликопротеин вируса бешенства (RG), антигены респираторно-синцитиального вируса (RSV), антигены вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), антигены туберкулеза, малярийные антигены, антигены вируса гепатита С (HCV), антигены вируса лихорадки чикунгуния и антигены вируса гепатита В (HBV).

Композиция последовательности трансгена будет зависеть от применения, предусмотренного для полученного в результате вектора. В одном воплощении изобретения трансген представляет собой последовательность, кодирующую продукт, полезный в биологии и медицине, такой как профилактический трансген, терапевтический трансген или иммуногенный трансген, например, белок или РНК. Белковые трансгены включают антигены. Антигенные трансгены по изобретению индуцируют иммуногенный ответ на организм, вызывающий заболевание. Трансгены РНК включают транспортную РНК (тРНК), двунитевую РНК (днРНК), рибосомную РНК, каталитические РНК и антисмысловые РНК. Примером полезной последовательности РНК является последовательность, которая гасит экспрессию целевой последовательности нуклеиновой кислоты у животного, получающего препарат.

Альтернативно последовательность трансгена может включать последовательность-репортер, которая при экспрессии образует обнаруживаемый сигнал. Такие последовательности-репортеры включают без ограничения последовательности ДНК, кодирующие бета-лактамазу, бета-галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидинкиназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), люциферазу, мембраносвязанные белки, включающие, например, CD2, CD4, CD8, белок гемагглютинаина вируса гриппа и другие белки, хорошо известные в данной области техники, к которым существуют или могут быть получены

традиционными методами, направленные на них высокоаффинные антитела, и слитые белки, содержащие мембраносвязанный белок, соответствующим образом слитый с доменом антигенной метки, среди прочего, гемагглютинином или Мус. Эти кодирующие последовательности при связывании с регуляторными элементами, управляющими их экспрессией, обеспечивают сигналы, которые можно обнаружить традиционными способами, включая ферментативные, радиографические, колориметрические, флуоресцентные или другие спектрографические анализы, анализы методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток и иммунологические анализы, включая твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА), радиоиммунологический анализ (РИА) и иммуногистохимический анализ.

В результате избыточности генетического кода полипептид может кодироваться разнообразием различных последовательностей нуклеиновой кислоты. Ошибки кодирования происходят в связи с использованием синонимичных кодонов, т. е. кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту чаще, чем другие. Под «оптимизацией по кодонам» понимают модификации в составе кодонов рекомбинантной нуклеиновой кислоты без изменения аминокислотной последовательности. Оптимизация по кодонам использована для улучшения экспрессии мРНК в различных организмах за счет частоты использования кодонов, специфичной для организма.

В дополнение и независимо от ошибок использования кодонов некоторые синонимичные пары кодонов используются чаще других. Эти ошибки спаривания кодонов означают, что некоторые пары кодонов представлены избыточно, а другие представлены недостаточно. Деоптимизацию кодоновых пар используют для снижения вирулентности вируса. Например, сообщали, что для полиовирусов, модифицированных так, чтобы содержать недостаточно представленные кодоновые пары, продемонстрирована пониженная эффективность трансляции, и они были аттенюированы по сравнению с полиовирусом дикого типа (*Science* (2008) 320:1784). В результате конструирования синтетического аттенюированного вируса путем деоптимизации кодоновых пар можно получить вирусы, которые кодируют такие же аминокислотные последовательности, как и вирусы дикого типа, но используют различные попарные группировки синонимичных кодонов. Вирусы, аттенюированные путем деоптимизации кодоновых пар, образовывали до 1000-кратно меньше бляшек по сравнению с вирусами дикого типа, вырабатывали меньше вирусных частиц, и им требовалось в 100 раз меньше частиц для образования бляшки.

Напротив, полиовирусы, модифицированные таким образом, чтобы содержать кодоновые пары с гиперэкспрессией в геноме человека, действовали так же, как и РНК дикого типа, и образовывали бляшки, идентичные по размеру РНК дикого типа (Coleman et al. (2008) Science 320:1784). Это происходило несмотря на тот факт, что вирус с гиперэкспрессируемыми кодоновыми парами, содержал такое же количество мутаций, как и вирус с недостаточно экспрессируемыми кодоновыми парами, и демонстрировал усиленную трансляцию по сравнению с диким типом. Это наблюдение позволяет предположить и ожидать, что конструкции с оптимизированными кодоновыми парами действуют аналогично своим двойникам с неоптимизированными кодоновыми парами, и для получения функционального преимущества.

Конструкция по изобретению может содержать оптимизированную по кодонам последовательность нуклеиновой кислоты. Альтернативно или дополнительно вектор по изобретению содержит оптимизированную по кодонам последовательность трансгена или ее иммуногенное производное или фрагмент. Конструкция по изобретению может содержать оптимизированную по кодоновым парам последовательность нуклеиновой кислоты. Альтернативно или дополнительно вектор по изобретению содержит оптимизированную по кодонам последовательность трансгена или ее иммуногенное производное или фрагмент или состоит из нее.

Доставка компетентных по репликации аденовирусных векторов

В некоторых воплощениях изобретения рекомбинантный аденовирус по изобретению вводят субъекту путем накожного введения, внутрикожного введения, внутримышечной инъекции, интраперитонеальной инъекции, внутривенной инъекции, введения в слизистую оболочку, назального введения, перорального введения, ректального введения, подкожного введения, трансдермального введения или интравагинального введения.

Если терапевтический режим включает совместное введение одного или более аденовирусных векторов и дополнительного компонента, где каждое включено в различные композиции, лучше всего вводить их в одной и той же локализации или вблизи одного и того же участка. Например, компоненты можно вводить (например, путем введения, выбранным из внутримышечного, трансдермального, внутрикожного, подкожного) с одной и той же стороны или в одну и ту же конечность («коллатеральное» введение) или с противоположной стороны или в противоположную конечность («контралатеральное» введение).

В одном воплощении изобретения векторы можно вводить внутримышечно (в/м), т. е. путем инъекции непосредственно в мышцу. Мышцы хорошо васкуляризированы, и всасывание обычно происходит быстро.

В одном воплощении изобретения векторы можно вводить перорально. Пероральная доставка вакцины обладает несколькими преимуществами по сравнению с внутримышечной доставкой, включая исключение боли в месте инъекции, простоту и удобство доставки. Она позволяет вводить вакцину менее квалифицированным медицинским работникам и позволяет обойтись без игл и шприцов, которые в зонах с высоким распространением, например, ВИЧ, гепатита В и гепатита С могут быть загрязнены.

Слизистая оболочка полости рта состоит из внешнего слоя многослойного плоского эпителия, который, в основном, не является ороговевающим, и лежащего снизу плотного слоя собственной пластинки соединительной ткани. Собственная пластинка содержит множество иммунных клеток и является местом возникновения иммунного ответа, который служит в качестве барьера для защиты внутренних тканей от патогенных организмов. Введение пероральным/желудочно-кишечным путем обеспечивает доступ антигена к обширной площади поверхности через один слой простого цилиндрического эпителия, где вакцина попадает в пейеровы бляшки и индуцирует системный ответ.

Живые, компетентные по репликации аденовирусы вводят перорально уже несколько десятилетий, но введение вирусных векторов, кодирующих антигенные трансгены, более проблематично. Со стороны просвета кишечника механизмы иммунного ответа не являются легкодоступными; это защищает организм от развития иммунных ответов на белки, потребляемые с пищей. Таким образом, при применении конструкций по изобретению возникает препятствие, связанное с выработкой иммунного ответа на белковые антигены при доставке в кишечник пероральным путем. Например, в исследовании 1-й фазы участникам исследования перорально дозировали живую вакцину компетентного по репликации Ad4 человека, содержащего в качестве трансгена гемагглютинин вируса гриппа. У них развивался клеточный иммунный ответ, но гуморальный иммунный ответ отсутствовал до тех пор, пока не проводили внутримышечную бустер-иммунизацию (*Lancet Infect Dis* (2013) 13:238). Аналогичным образом, обычным беспородным свиньям перорально или подкожно вводили компетентную по репликации живую аденовирусную вакцину, содержащую вирус лихорадки свиней в качестве трансгена. Антитела к трансгенному антигену не

вырабатывались ни у одной из свиней, дозированных перорально, но вырабатывались у 75% свиней, дозированных подкожно (Vaccine (2001) 146:1787).

В одном воплощении изобретения векторы можно вводить в слизистую оболочку. Доставка вакцины в слизистую оболочку также обеспечивает несколько преимуществ по сравнению с внутримышечной доставкой вакцин. Поскольку слизистая оболочка соприкасается с наружной стороной тела, вакцины для введения в слизистую оболочку могут быть эффективными и безопасными при несколько сниженной степени чистоты по сравнению с вакцинами для парентерального введения, поэтому их проще получить. Они, как правило, эффективны в более низких дозах, поэтому эффективны экономически.

Доставка «в слизистую оболочку» при использовании в настоящем документе охватывает все слизистые оболочки. Слизистая оболочка, как правило, выстилает полости и протоки тела, содержащие эпителий и собственную пластинку. Слизистая оболочка может быть ороговевшей или не ороговевшей. Ткани слизистой оболочки включают без ограничений альвеолярные, бронхиальные, щечные, кожные, эндометриальные, желудочные, кишечные, скуловые, выстилающие слизистые оболочки, слизистые оболочки жевательных мышц, полости носа, обонятельные, слизистые оболочки полости рта, ушные, небные, ректальные, специализированные (язык), подъязычные, трахеальные и вагинальные слизистые оболочки.

Слизистые оболочки характеризуются высокоспециализированной иммунной системой, состоящей из лимфоидных микрокамер, таких как пейеровы бляшки, мезентериальные лимфатические узлы, аппендикс, небные миндалины и аденоиды. Антигены, захватываемые абсорбирующими эпителиальными клетками, могут быть перенаправлены или непосредственно презентированы антигенпрезентирующим клеткам и презентированы Т-клеткам. Иммунные ответы тканей слизистой оболочки определяются природой антигена, типами антигенпрезентирующих клеток и локальным микроокружением. Сенсibilизированные В- и Т-клетки слизистой оболочки покидают первоначальное место проникновения антигена, проходят через лимфу и проникают в кровообращение. Доставка в слизистую оболочку может быть, например, трансбуккальной, генитальной, например вагинальной, интраназальной, глазной, например, в конъюнктиву глаза, ушной, например, во внутреннее ухо, ректальной или подъязычной.

В одном воплощении изобретения векторы можно вводить подъязычным путем. Доставка вакцины подъязычным путем может обеспечивать быстрый доступ антигена

через очень тонкий слой многослойного плоского, не ороговевшего эпителия, где он попадает в клетки Лангерганса и индуцирует системный ответ. Антиген, доставляемый подъязычным путем, становится доступным для плотной сети дендритных клеток в подъязычной слизистой оболочке. При доставке компетентных по репликации векторов подъязычным путем они обходят печень, что позволяет избежать метаболизма первого прохождения через печень, в результате чего увеличивается их сохранность и, следовательно, усиливается иммунный ответ.

В одном воплощении изобретения векторы можно вводить трансбуккальным путем. Доставка вакцины трансбуккальным путем также обеспечивает доступ антигена через слой многослойного плоского, не ороговевшего эпителия, который в данном случае толще, чем подъязычный слой. Трансбуккальная доставка также нацелена на клетки Лангерганса и индуцирует системный ответ.

Адьюванты

Подходы к установлению сильного и длительного иммунитета к специфичным патогенным организмам включают добавление к вакцинам адьювантов. Под «адьювантом» понимают агент, который усиливает, стимулирует, активирует, потенцирует или модулирует иммунный ответ на активный ингредиент композиции. Эффект адьюванта может проявляться на клеточном или гуморальном уровне, либо на обоих уровнях. Адьюванты стимулируют ответ иммунной системы на актуальный антиген, но сами по себе не обладают иммунологическим эффектом. Альтернативно или дополнительно содержащие адьювант композиции по изобретению могут содержать один или более иммуностимуляторов. Под «иммуностимулятором» понимают агент, который индуцирует общее временное повышение иммунного ответа у субъекта при введении с антигеном или отдельно.

Композицию по изобретению можно вводить с адьювантом или без адьюванта. Альтернативно или дополнительно композиция может содержать один или более адьювантов (например, вакцинных адьювантов), либо ее можно вводить в сочетании с ним(и), в частности, композиция содержит иммунологически эффективное количество кодирующего трансген вектора по изобретению.

Способы применения/виды применения

Предложены способы индукции у нуждающегося в этом субъекта иммунного ответа против заболевания, вызванного патогенным организмом, включающие стадию введения иммунологически эффективного количества раскрытой в настоящем документе

конструкции или композиции. В некоторых воплощениях изобретения предложено применение раскрытых в настоящем документе конструкций или композиций для индукции иммунного ответа на трансгенный антиген у нуждающегося в этом субъекта. Векторы по изобретению можно применять для профилактики, лечения или улучшения состояния при заболеваниях, связанных с инфекцией.

Способы по изобретению включают применение вектора по изобретению в лекарственном препарате. Эти способы включают применение вектора по изобретению для лечения заболевания, вызванного патогенным организмом. Вектор по изобретению можно применять в производстве лекарственного препарата для лечения заболевания, вызванного патогенным организмом.

Эффективная иммунизация аденовирусными векторами зависит от собственной иммуномодуляторной способности структуры аденовирусного вектора. Аденовирусы с меньшей иммунологической активностью индуцируют экспрессию антигена в меньшей степени. Эффективная иммунизация также зависит от способности промотора к управлению сильной и пролонгированной экспрессией трансгена. Например, аденовирусные векторы, управляемые вирусным промотором CMV-IE, не поддерживают длительную экспрессию трансгена, поскольку они индуцируют цитокины, ослабляющие экспрессию.

Под «субъектом» понимают позвоночное животное, такое как млекопитающее, например человек или животное, подлежащее ветеринарному обслуживанию. В некоторых воплощениях изобретения субъектом является человек.

Общие сведения

Векторы по изобретению получают с помощью описанных в настоящем документе методик и последовательностей в сочетании с методиками, известными специалистам в данной области техники. Такие методики включают традиционные методики клонирования кДНК, такие как описаны в учебных руководствах, использование перекрывающихся олигонуклеотидных последовательностей аденовирусных геномов, полимеразную цепную реакцию и любой подходящий метод, обеспечивающий желаемую нуклеотидную последовательность.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, которое принято для понимания специалистами в области техники, к которой относится данное изобретение. Термины в единственном числе включают в себя соответствующие термины во множественном

числе, если контекст явным образом не требует иного. Аналогично, слово «или» подразумевает включение «и», если контекст явным образом не требует иного. Термин «множество» включает в себя два или более элементов. Дополнительно числовые ограничения, приведенные в связи с концентрациями или содержанием вещества, такими как концентрации компонентов раствора или их соотношения, и условий реакций, таких как температура, давление и время цикла, подразумевают как приблизительные. Используемый в настоящем документе термин «около» подразумевают как означающий количество $\pm 10\%$.

Теперь настоящее изобретение будет дополнительно описано посредством приведенных ниже примеров, не имеющих ограничительного характера.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструирование компетентных по репликации аденовирусов шимпанзе

Аденовирусы шимпанзе типа 155 (ChAd155) (WO 2016 198621) и типа 83 (ChAd83) (WO 2010/086189) дикого типа были выделены у здоровых шимпанзе с помощью стандартных методик и были сконструированы в виде дефектных по репликации векторов, как описано в публикации Sci Transl Med (2012) 4:1 и WO 2010/086189.

Каждый из компетентных по репликации векторов ChAd155 и ChAd 83 конструировали путем вставки экспрессионной кассеты трансгена. В качестве компонентов экспрессионной кассеты использовали либо классический промотор CMV человека, либо промотор CASI, гликопротеин вируса бешенства в качестве модельного антигена и возможно энхансер WPRE. Сайты вставки трансгенной кассеты, замещающие область E3, находились между геном фибера и областью E4 (сайт HE1) и ниже правого ITR (сайт HE2).

На верхней панели ФИГ. 1 показан вектор RC1, в котором трансгенная кассета замещает область E3. На средней панели показана конструкция, в которой трансгенная кассета была вставлена между стоп-кодонами гена фибера и областью E4 (сайт HE1). В случае вставки трансгенной кассеты в сайт HE1, ChAd155 не способен к репликации. На нижней панели показан вектор RC2, в котором трансгенная кассета вставлена ниже правого ITR (сайт HE2). В обеих конфигурациях RC1 и RC2 область E1 остается без изменений. Вставку трансгена выполняли методами гомологической рекомбинации в следующих положениях SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2:

HE1 ChAd155: участок вставки между п. о. 34611 и 34612 SEQ ID NO: 1;

HE2 ChAd155: участок вставки между п. о. 37662 и 37663 SEQ ID NO: 1;

HE1 ChAd83: участок вставки между п. о. 33535 и 33536 SEQ ID NO: 2;

HE2 ChAd83: участок вставки между п. о. 36387 и 36388 SEQ ID NO: 2.

Пример 2. Получение вируса, титр и экспрессия вектора

Чтобы идентифицировать экспериментальную модель для оценки репликации вектора, проводили оценку векторов на основе компетентного по репликации аденовируса ChAd155 RC2 типа С и компетентного по репликации аденовируса ChAd83 RC2 типа Е на их способность к репликации, которую измеряли на основании титра вектора и числа геномных копий в клетках, имеющих происхождение от различных видов животных. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Репликация и экспрессия компетентных по репликации ChAd155 и ChAd83

<u>Линия клеток</u> <u>Биологический вид</u>	<u>Вектор</u>	<u>Титр</u> <u>вектора</u>	<u>Геномная</u> <u>копия</u>	<u>Экспрессия</u>	
				<u>День 2</u>	<u>День 7</u>
MRC5: Человек	ChAd155	+++	+++	++	++++
	ChAd83	+++++	+++++	+++	+++++
PK15: Свинья	ChAd155	+++++	+++++	НД	НД
	ChAd83	+++	++++	НД	НД
NMuLi: Мышь	ChAd155	++	+++	+++	+++
	ChAd83	НО	+	++	++
Vero: Приматы, отличные от человека	ChAd155	++	++++	+++	+++
	ChAd83	НО	+	+	+

НО = невозможно определить; НД = данные не получены

Как показано в таблице 1, клетки MRC5 человека и клетки PK15 свиньи вырабатывали высокие титры вектора и имели высокую копийность обоих компетентных по репликации векторов ChAd155 и ChAd83. Мышиные клетки NMuLi и клетки Vero приматов, отличных от человека, также продуцировали RC ChAd155, но в меньшей степени, чем клетки человека или свиньи. RC ChAd83 оказался неспособным хорошо расти в клетках NMuLi и, что неожиданно, в клетках отличных от человека приматов Vero.

Человеческие клетки MRC5, мышинные клетки NMuLi и клетки отличных от человека приматов Vero поддерживали экспрессию RC ChAd155 до 7-го дня. Человеческие клетки MRC5 поддерживали экспрессию RC ChAd83 до 7-го дня, как и

мышинные клетки NMuLi и клетки отличных от человека приматов Vero, но в меньшей степени, чем человеческие клетки.

Продуцирование вируса

На ФИГ. 2 показано количество вируса, продуцируемого первичными человеческими клетками MRC5, инфицированными компетентными по репликации ChAd155 или ChAd83, каждый из которых содержал RC1 или RC2. Клетки собирали через семь дней после инфицирования и проводили оценку титра вектора в лизатах клеток, полученных после трех циклов замораживания и оттаивания. Титры вектора определяли методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с праймерами, сконструированными для соответствующих промоторных областей. Множественность инфекции (moi) составляла 1250 вирусных частиц на клетку. Продукция вируса показана в виде количества векторных частиц (вч) на клетку над столбцами.

Человеческие клетки MRC5 поддерживали продукцию ChAd155, содержащего либо RC1 ($2,17 \times 10^3$ вч/клетка), либо RC2 ($4,40 \times 10^3$ вч/клетка), а также поддерживали продукцию ChAd83, содержащего либо RC1 ($1,18 \times 10^4$ вч/клетка), либо RC2 ($1,06 \times 10^5$ вч/клетка). Как показано на ФИГ. 2, уровень продукции ChAd83 был выше, чем ChAd155; вектор ChAd83, содержащий RC2, был наиболее устойчивым из четырех комбинаций вирусов/векторов.

Копийность векторного генома

После инфицирования вектор реплицируется в клетке, и копияность векторного генома можно определить количественно методом кПЦР. Репликация векторной ДНК может происходить даже в клетках, не полностью перmissive для репликации и размножения вируса. кПЦР векторной ДНК обеспечивает меру репликации вектора внутри инфицированной клетки независимо от способности вируса к завершению цикла репликации и высвобождения в виде зрелого потомства вируса. Репликацию вектора можно, таким образом, определить количественно у биологических видов, в типах тканей и типах клеток, которые не являются перmissive для репликации или размножения вируса ChAd.

Копийность векторного генома определяли количественно параллельно с титром вектора, и результаты показаны на ФИГ. 3. Человеческие клетки MRC5 инфицировали ChAd155 или ChAd83, каждый из которых содержал RC1 или RC2. Клетки собирали через семь дней после инфекции, экстрагировали суммарную ДНК, вирусный геном определяли количественно методом кПЦР, и результаты выражали в виде копияности векторного

генома на клетку. moi составляла 250 вирусных частиц на клетку, и количество вирусных частиц на клетку указано над столбцами, обозначающими копийность вирусного генома на клетку. Копийность прямо пропорциональна уровню экспрессии трансгена.

Как показано на ФИГ. 3, количественные показатели вирусной ДНК RC1 ($6,21 \times 10^3$ вч/клетка) и RC2 ($6,71 \times 10^3$ вч/клетка) для ChAd155 были сходными. ChAd83 продуцировал большее количество вирусной ДНК RC1 ($2,76 \times 10^4$ вч/клетка) и RC2 ($9,19 \times 10^4$ вч/клетка), чем ChAd155. Самый высокий уровень репликации вирусной ДНК наблюдали для ChAd83 RC2.

Пример 3. Экспрессия вирусного трансгена в клетках человека

Для сравнения уровня экспрессии трансгена с дефектных по репликации и компетентных по репликации вирусных векторов ChAd155 (ФИГ. 4) и ChAd83 (ФИГ. 5) проводили анализ методом Вестерн-блоттинга. Клетки MRC5 трансдуцировали вектором ChAd155 RC1 или ChAd155 RC2 при moi 250 или 1250 вирусных частиц на клетку. Клетки собирали через два и семь дней после инфекции, готовили экстракты с использованием стандартных методов и наносили эквивалентные количества экстракта на полиакриламидные гели (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН). После разделения в электрофорезе белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны, которые впоследствии подвергали гибридизации с имеющимся в продаже моноклональным антителом к трансгенному гликопротеину вируса бешенства.

На ФИГ. 4 и ФИГ. 5 продемонстрировано, что и через два, и через семь дней после инфицирования компетентные по репликации векторы ChAd155 RC (ФИГ. 4) и ChAd83 RC (ФИГ. 5) экспрессировали трансген на более высоком уровне, чем дефектные по репликации векторы ChAd155 RD и ChAd83 RD соответственно. После гибридизации с антителом к гликопротеину вируса бешенства наблюдали полосу около 51 кДа, соответствующую ожидаемой молекулярной массе гликопротеина вируса бешенства, указанной в столбце слева от блотов.

Для всех исследованных векторов увеличение moi приводило к повышенной экспрессии трансгена как на 2-й, так и на 7-й день после инфицирования. Что касается ChAd155, вектор RC2 обеспечивал самый высокий уровень экспрессии трансгена, следующим был вектор ChAd155 RC1, затем ChAd155 RD. Что касается ChAd83, вектор RC2 обеспечивал самый высокий уровень экспрессии трансгена, следующим был вектор ChAd155 RD, затем ChAd155 RC1.

На 2-й день после инфицирования по данным Вестерн-блоттинга наблюдали низкие уровни экспрессии ChAd155, управляемой промотором либо hCMV (RC1), либо CASI (RC2). Максимальный уровень экспрессии трансгена вектором ChAd83 наблюдали через два дня после инфицирования, вероятнее всего, происходящей в этот ранний момент времени в связи с тем, что вектор ChAd83 является цитопатическим для клеток MRC5. Кроме того, экспрессия ChAd83, управляемая промотором CMV в клетках MRC5, не сохранялась дольше двух дней в связи с тем, что структура аденовируса типа E усиливает выключение промотора/транскрипционный сайленсинг.

К 7-му дню экспрессия, управляемая промотором hCMV, увеличивалась в незначительной степени, а экспрессия, управляемая промотором CASI, значительно увеличивалась и была более устойчивой по сравнению с экспрессией, управляемой промотором hCMV. Напротив, на 2-й день после инфицирования экспрессия ChAd 83, управляемая обоими промоторами hCMV и CASI, была значительно выше, чем наблюдаемая для ChAd155. Тем не менее к 7-му дню экспрессия, управляемая промотором hCMV, снижалась до почти не определяемых уровней, в то время как экспрессия, управляемая промотором CASI, оставалась постоянной. Без ограничений, налагаемых какой-либо теорией, это позволяет предположить, что, хотя структура аденовируса ChAd83 (аденовирус типа E) усиливает выключение промотора, промотор CASI позволяет преодолеть транскрипционный сайленсинг.

В этих исследованиях продемонстрировано, что векторы RC2, содержащие промотор CASI в левосторонней ориентации, расположенный в локусе HE2, более устойчиво экспрессируют трансген, чем векторы RC1, в которых промотор CMV расположен в правосторонней ориентации в делетированной области E3 (ФИГ. 1).

Пример 4. Копийность компетентного по репликации аденовирусного вектора

Оценку эффективности компетентных по репликации аденовирусных векторов по изобретению, выраженной в виде копииности вектора на клетку, проводили на культурах клеток, полученных как от мышей, так и от приматов, отличных от человека. На ФИГ. 6 (верхняя панель) показана геномная копииность компетентных по репликации векторов, выращенных в клетках печени мыши NMuLi, которые выращивали в виде монослоев и инфицировали ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 или ChAd83 RC2 при moi 250 вирусных частиц на клетку. Через пять дней после инфицирования выделяли суммарную ДНК и количественно определяли репликацию вектора методом кПЦР с использованием праймеров с отжигом в области промотора вектора.

Результаты, выраженные в виде копийности вектора на клетку, показаны на ФИГ. 6 (верхняя панель). Как RC1-, так и RC2-векторы ChAd155 реплицировались с высокой эффективностью в клетках NMuLi. Векторы ChAd155 RC1 ($1,73 \times 10^4$) и RC2 ($1,92 \times 10^4$) реплицировались приблизительно в одинаковой степени. Репликация RC1- и RC2-векторов ChAd83 была менее эффективной по сравнению с ChAd155. Векторная ДНК ChAd83 реплицировалась в мышинных клетках лишь в небольших количествах. Вектор RC1 реплицировался на уровне $5,47 \times 10^2$ копий на клетку, а вектор RC2 — на уровне $6,74 \times 10^2$ копий на клетку.

Клетки Vero приматов, отличных от человека, также выращивали до состояния монослоя и инфицировали ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 или ChAd83 RC2 (ФИГ. 6, нижняя панель). Использовали два различных значения множественности инфекции: 50 и 250 вирусных частиц на клетку. Через пять дней после инфицирования выделяли суммарную ДНК и количественно определяли репликацию вектора методом кПЦР с использованием праймеров с отжигом в области промотора вектора.

Результаты, выраженные в виде копийности вектора на клетку, показаны на ФИГ. 6 (нижняя панель). Линия клеток приматов Vero была перmissive для ChAd155 RC1 ($3,71 \times 10^3$ копий на клетку при moi 50 и $4,93 \times 10^4$ копий на клетку при moi 250) и ChAd155 RC2 ($8,15 \times 10^3$ копий на клетку при moi 50 и $7,05 \times 10^4$ копий на клетку при moi 250). Линия клеток приматов Vero была слабо, если вообще была перmissive для ChAd83 RC1 или ChAd83 RC2. При moi 50 экспрессии векторов ChAd83 RC1 или ChAd83 RC2 в клетках Vero не обнаружили. При moi 250 вектор RC1 реплицировался на уровне $1,13 \times 10^2$ копий на клетку, а вектор RC2 — на уровне $1,29 \times 10^3$ копий на клетку.

Пример 5. Экспрессия трансгена в клетках мышей и приматов, отличных от человека

Для сравнения уровня экспрессии трансгена в ChAd155 RC1 и ChAd155 RC2 в мышинных клетках NMuLi был проведен анализ методом Вестерн-блоттинга (ФИГ. 7, верхняя панель). Клетки инфицировали вектором ChAd155 RC1 или ChAd155 RC2 при moi 50, 250 или 1250 вирусных частиц на клетку. Клетки собирали через два и пять дней после инфекции, готовили экстракты с использованием стандартных методов и наносили эквивалентные количества экстракта на полиакриламидные гели (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН). После разделения в электрофорезе белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны, которые впоследствии подвергали гибридизации с

имеющимся в продаже моноклональным антителом к трансгенному гликопротеину вируса бешенства.

На ФИГ. 7 (верхняя панель) продемонстрировано, что оба вектора ChAd155 RC1 и ChAd155 RC2 экспрессируют трансген в мышинных клетках NMuLi. Экспрессию, на которую указывает полоса около 51 кДа, соответствующая ожидаемой молекулярной массе кроличьего гликопротеина (RG), наблюдали и через два, и через пять дней после инфицирования. Как через два, так и через пять дней после инфицирования вектор ChAd155 RC2 обеспечивал более высокий уровень экспрессии трансгена, чем вектор ChAd155 RC1.

Впоследствии для сравнения уровня экспрессии трансгена в ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 и ChAd83 RC2 в мышинных клетках NMuLi был проведен анализ методом Вестерн-блоттинга (ФИГ. 7, нижняя панель). Клетки инфицировали ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 или ChAd83 RC2 при moi of 50, 250 или 1250 вирусных частиц на клетку (250 и 1250 для ChAd83 RC1). Клетки обрабатывали для Вестерн-блоттинга, как описано на ФИГ. 4.

На ФИГ. 7 (нижняя панель) продемонстрировано, что векторы ChAd155 RC1, ChAd155 RC2, ChAd83 RC1 и ChAd83 RC2 экспрессируют трансген в мышинных клетках NMuLi. Экспрессию, на которую указывает полоса около 51 кДа, соответствующая ожидаемой молекулярной массе кроличьего гликопротеина (RG), наблюдали и через два, и через пять дней после инфицирования. Для ChAd155 продемонстрирована более эффективная экспрессия трансгена, чем для ChAd83. Через два дня после инфицирования наблюдали устойчивую экспрессию трансгена вектором ChAd155 RC2 даже при низкой moi 50 вч/клетка, при этом устойчивую экспрессию с вектора ChAd155 RC1 впервые наблюдали при более высоких значениях moi . В обоих серотипах вируса ChAd155 и ChAd83 для RC2 также продемонстрирована более высокая экспрессия трансгена, чем для RC1. В каждом из прямых сравнений RC2 экспрессировался более устойчиво, чем RC1.

Пример 6. Иммуногенность векторов RD и RC1 у мышей

Иммунологическую активность вектора ChAd155 RD, индуцирующую Т-клеточный ответ, сравнивали с векторами ChAd155 RC1 и ChAd83 RC1 у мышей линии Balb/c, шесть мышей на группу. Векторы вводили путем внутримышечной инъекции в дозах 10^5 и 10^6 вирусных частиц. Через три недели после иммунизации животных умерщвляли, выделяли спленциты иммунизированных мышей и проводили анализ методом иммуноферментных пятен с ИФН-гамма, используя Т-клеточный эпитоп

гликопротеина вируса бешенства. Результаты представлены на ФИГ. 8, выраженные в виде количества клеток, образующих пятна (SFC) с ИФН-гамма, на миллион спленоцитов. Каждое пятно представляет собой ответ у одной мыши, и горизонтальные линии соответствуют геометрическому среднему для каждой дозовой группы.

При дозе 10^6 вч у всех мышей наблюдали положительный ответ, вызывающий иммунный ответ на антиген трансгена (ФИГ. 8). Как и ожидалось, для всех трех векторов при более высокой дозе иммунный ответ был более устойчивым. Активность ChAd155 RC1 при индукции иммунного ответа была сильнее по сравнению с вектором ChAd155 RD или ChAd83 RC1 в эквивалентной дозе. Эти результаты согласовывались с данными, показанными в примере 4 и на ФИГ. 6, и, таким образом было продемонстрировано, что репликация ChAd83 в клетках мышей NMuLi незначительна или отсутствует, а уровень экспрессии антигена ниже по сравнению с вектором ChAd155 RC1.

Пример 7. Иммуногенность векторов RD и RC1 при пероральном введении мышам

На мышах проводили оценку иммунологической активности векторов ChAd155-RD и ChAd155 RC1; дефектные по репликации векторы ChAd155 сравнивали с компетентными по репликации, и результаты приведены на ФИГ. 9. Животных (шесть на группу) иммунизировали либо пероральным, либо внутримышечным путем, затем проводили оценку ответа нейтрализующих антител (верхняя панель) и Т-клеточный ответ (нижняя панель) на трансгенный антиген.

На ФИГ. 9 (верхняя панель) представлен гуморальный ответ нейтрализующих антител у мышей после перорального дозирования 5×10^8 вирусных частиц или внутримышечного дозирования 1×10^7 вирусных частиц. Через восемь недель после иммунизации титр нейтрализующих антител определяли количественно в анализе реакции нейтрализации вируса флюоресцентными антителами (FAVN), используя имеющееся в продаже моноклональное антитело к G-белку вируса бешенства.

Титры нейтрализующих антител к вирусу, представляющие собой меру В-клеточного ответа (антитела), представлены на ФИГ. 9 (верхняя панель). Каждая точка представляет собой ответ у одной мыши. На верхней панели ФИГ. 9 продемонстрировано обнаружение функциональных нейтрализующих антител в сыворотке крови через восемь недель после однократного введения ChAd155 RD или ChAd155 RC1. При пероральном введении ChAd155 RC1 у всех шести мышей титр нейтрализующих антител превышал порог защиты (пунктирная линия). В результате перорального введения ChAd155 RD

нейтрализующие антитела, титр которых превышал порог защиты, вырабатывались у четырех из шести мышей.

При внутримышечном введении ChAd155 RC1 у всех шести мышей титр нейтрализующих антител превышал порог защиты. В результате перорального введения ChAd155 RD нейтрализующие антитела, титр которых превышал порог защиты, вырабатывались у пяти из шести мышей.

Титры нейтрализующих антител у мышей, иммунизированных вектором ChAd155 RC1, были выше, чем у иммунизированных вектором ChAd155 RD, независимо от того, вводили вектор перорально или в/м. Таким образом, продемонстрировано, что компетентные по репликации векторы ChAd155 по изобретению более эффективно индуцируют ответ антител на трансгенный антиген по сравнению с дефектными по репликации векторами ChAd155 как при пероральном, так и при внутримышечном введении.

Т-клеточный ответ определяли на основании секреции ИФН-гамма методом иммуноферментных пятен в спленоцитах животных, вакцинированных трансгенным антигеном, и результаты представлены на ФИГ. 9 (нижняя панель). Мышам дозировали перорально 5×10^8 вирусных частиц или внутримышечно 1×10^7 вирусных частиц. Через три недели после иммунизации Т-клеточный ответ определяли количественно методом иммуноферментных пятен, как описано в примере 6. Каждая точка представляет собой ответ у одной мыши.

Секреция ИФН-гамма, являющаяся мерой Т-клеточного ответа (клеточный иммунитет), показана на ФИГ. 9 (нижняя панель). Каждая точка представляет собой ответ у одной мыши. На ФИГ. 9 продемонстрировано, что в пределах трех недель после иммунизации однократным введением ChAd155 RD или ChAd155 RC1 был выявлен Т-клеточный иммунный ответ. При пероральном введении ChAd155 RC1 Т-клеточный ответ установился у всех шести мышей. В результате перорального введения ChAd155 RD Т-клеточный ответ установился у четырех из шести мышей.

Т-клеточные ответы у мышей, иммунизированных вектором ChAd155 RC1, были выше, чем у иммунизированных вектором ChAd155 RD, независимо от того, вводили вектор перорально или в/м. Таким образом, продемонстрировано, что компетентные по репликации векторы ChAd155 по изобретению более эффективно индуцируют клеточный иммунный ответ на трансгенный антиген по сравнению с дефектными по репликации векторами ChAd155 как при пероральном, так и при внутримышечном введении.

Пример 8. Иммуногенность компетентных по репликации векторов у свиней

Животные рода *Sus*, общеизвестные как свиньи, представляют релевантную модель на основании данных *in vitro* на клетках свиньи PK1, которые, вероятно, являются перmissive для репликации ChAd. Для демонстрации иммуногенности свиней, например *Sus scrofa domesticus*, можно иммунизировать компетентными по репликации векторами ChAd155 или ChAd83, доставляемыми внутримышечно или интраназально в дозе приблизительно 1×10^{10} – 1×10^{12} вирусных частиц. Собранные сыворотки крови можно анализировать на нейтрализующие антитела, Т-клеточный ответ и В-клеточный ответ. За выделением вируса после вакцинации можно следить, собирая секрет из носа, слюну или фекалии. Место, из которого выделяется вирус, может свидетельствовать о его биораспределении, например, если выделение вируса преимущественно происходит с секретом из носа, можно предполагать, что вирус имеет преимущество для репликации в верхних дыхательных путях. Показатели безопасности могут включать измерение массы тела, температуры, потребления корма, гематологических показателей и показателей биохимического анализа сыворотки крови.

После демонстрации иммуногенности векторов по изобретению посредством внутримышечного и интраназального введения на свиной модели можно исследовать иммуногенность посредством других путей введения, включая подъязычное введение. Дизайны эксперимента могут включать в себя сравнения компетентных и дефектных по репликации векторов ChAd155 и ChAd 83, сравнения промоторов, включая CASI и CMV в различных положениях внутри конструкции, сравнения эффектов различных энхансерных элементов, например WPRE, и сравнения подъязычного пути с другими путями введения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит промотор и трансген, где экспрессионная кассета вставлена в область E3, сайт HE1 или сайт HE2 вектора.
2. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где обезьяна представляет собой шимпанзе.
3. Компетентный по репликации аденовирусный вектор шимпанзе по п. 1, дополнительно содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фибера аденовируса шимпанзе или его функциональное производное и/или область E4 аденовируса шимпанзе.
4. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, представляющий собой аденовирус с низкой серопревалентностью у людей.
5. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 4, представляющий собой ChAd155.
6. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 4, представляющий собой ChAd83.
7. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где промотор выбран из промотора CASI и усиленного промотора цитомегаловируса.
8. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 7, где промотор представляет собой промотор CASI.
9. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 7, где промотор представляет собой усиленный промотор цитомегаловируса.
10. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где экспрессионная кассета дополнительно содержит посттранскрипционный регуляторный элемент.
11. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 10, где посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков.

12. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где трансген представляет собой антиген.
13. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 12, где антиген выбран из антигена вируса бешенства, антигена респираторно-синцитиального вируса, антигена вируса иммунодефицита человека, антигена туберкулезной палочки, малярийного антигена, антигена вируса гепатита С, антигена лихорадки чикунгунья и антигена вируса гепатита В.
14. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где экспрессионная кассета вставлена в область E3.
15. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где экспрессионная кассета вставлена в область HE1.
16. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по п. 1, где экспрессионная кассета вставлена в область HE2.
17. Способ применения компетентного по репликации обезьяньего аденовирусного вектора по п. 1 для индукции у нуждающегося в этом субъекта иммунного ответа против заболевания, вызванного патогенным организмом.
18. Применение компетентного по репликации обезьяньего аденовирусного вектора по любому одному из п.п. 1–16 для профилактики или лечения заболевания.
19. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по любому одному из п.п. 1–16, где вектор вводят путем внутримышечной инъекции.
20. Компетентный по репликации обезьяний аденовирусный вектор по любому одному из п.п. 1–16, где вектор вводят перорально.
21. Способ применения компетентного по репликации обезьяньего аденовирусного вектора по любому одному из п.п. 1–16, где вектор вводят путем внутримышечной инъекции.
22. Способ применения компетентного по репликации обезьяньего аденовирусного вектора по любому одному из п.п. 1–16, где вектор вводят перорально.

Вставка в область E3

Правосторонняя ориентация



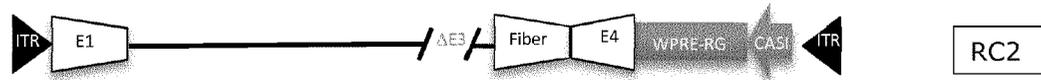
HE1: Вставка между стоп-кодонами гена фибера и областью E4

Правосторонняя ориентация

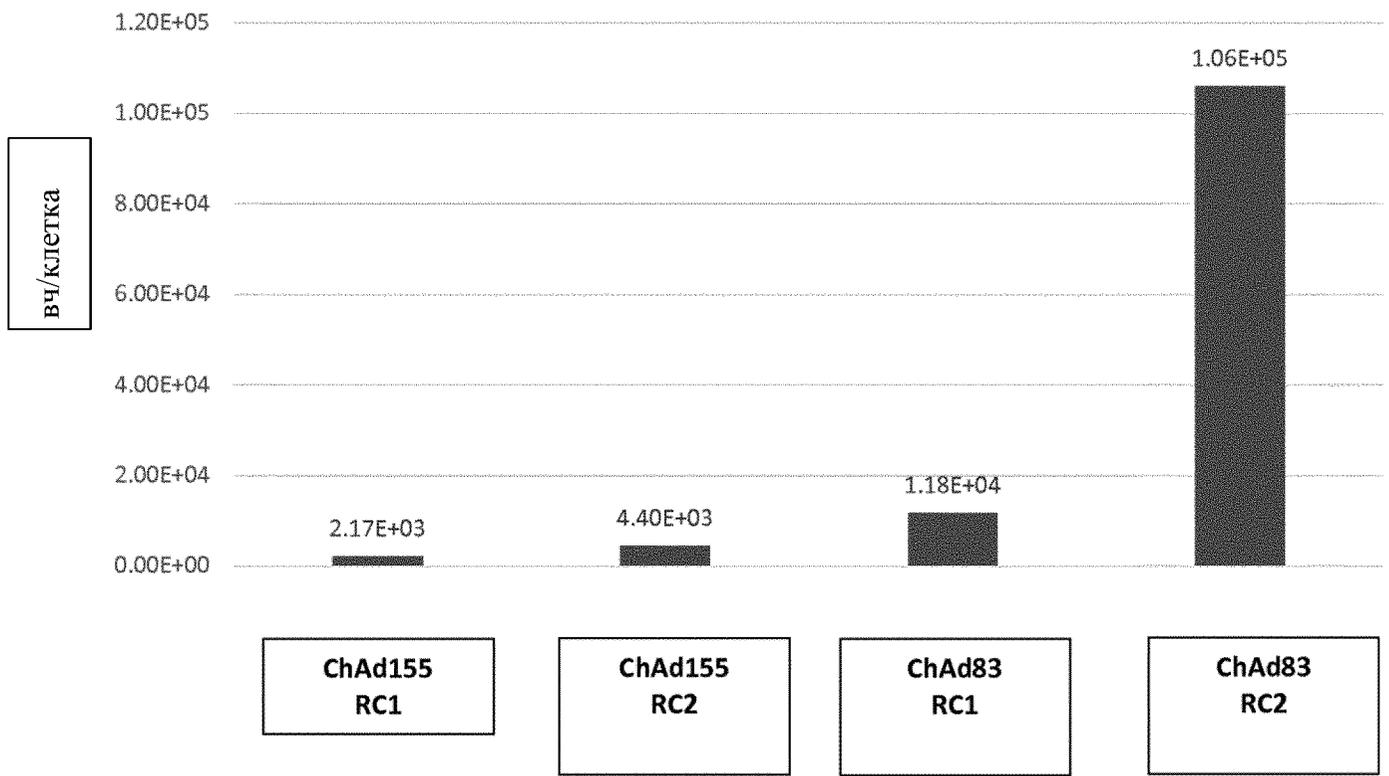


HE2: Вставка между концом левого ITR-R и участком копирования мРНК E4

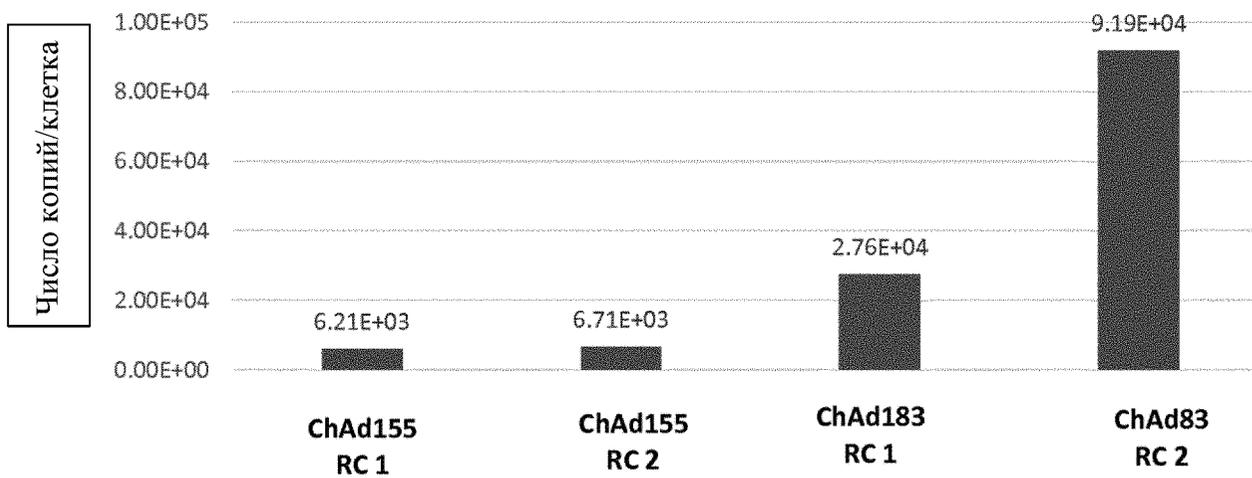
Левосторонняя ориентация



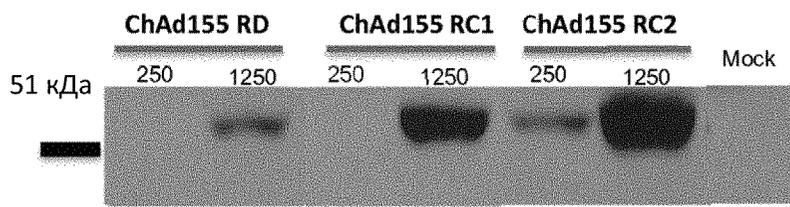
ФИГ. 1



ФИГ. 2

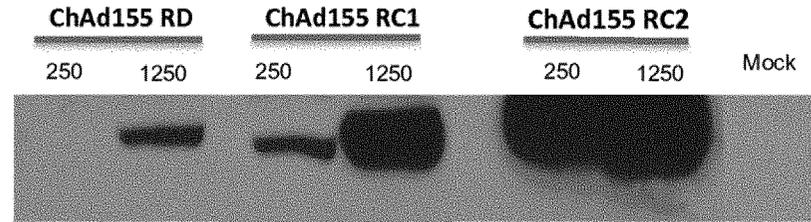


ФИГ. 3



2 дня

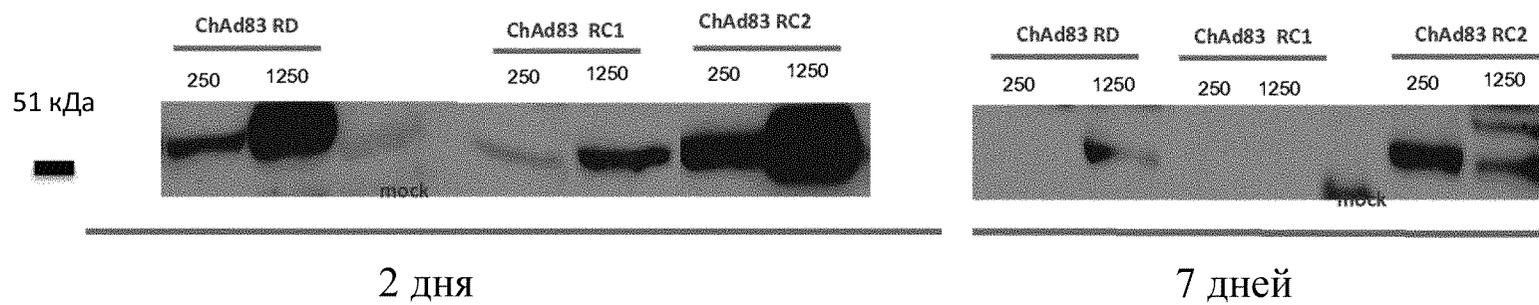
Mock - ложно-трансфицированная
клетка



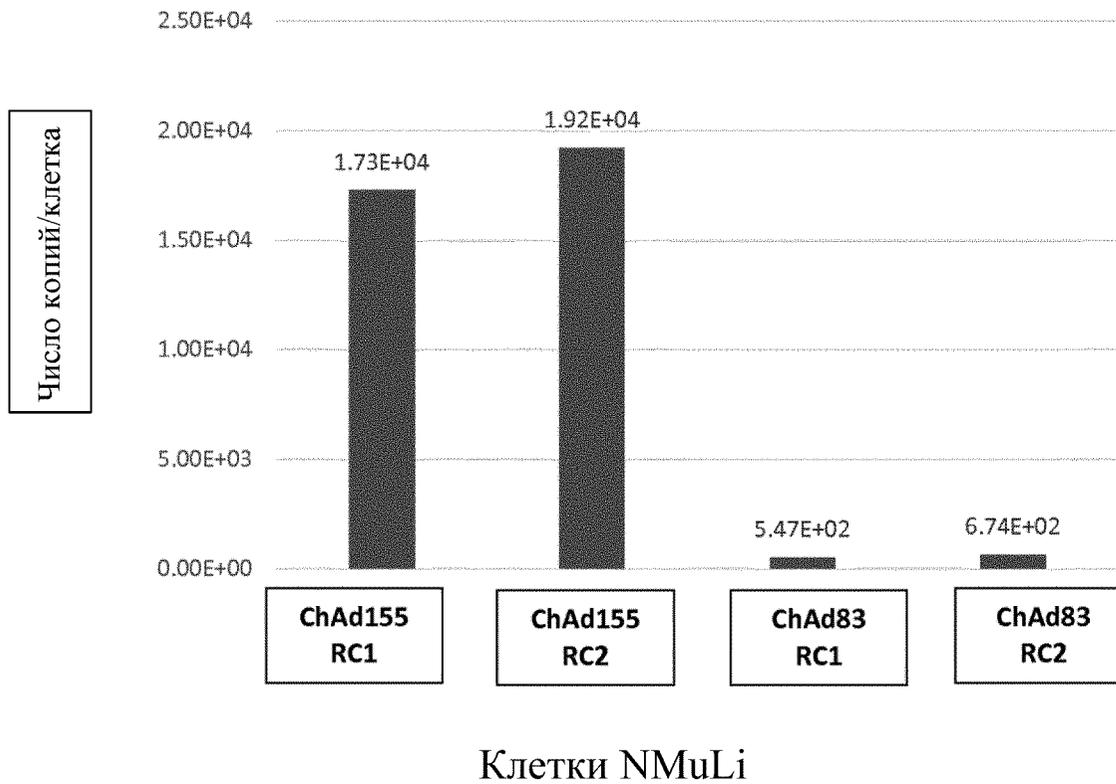
7 дней

Mock - ложно-трансфицированная
клетка

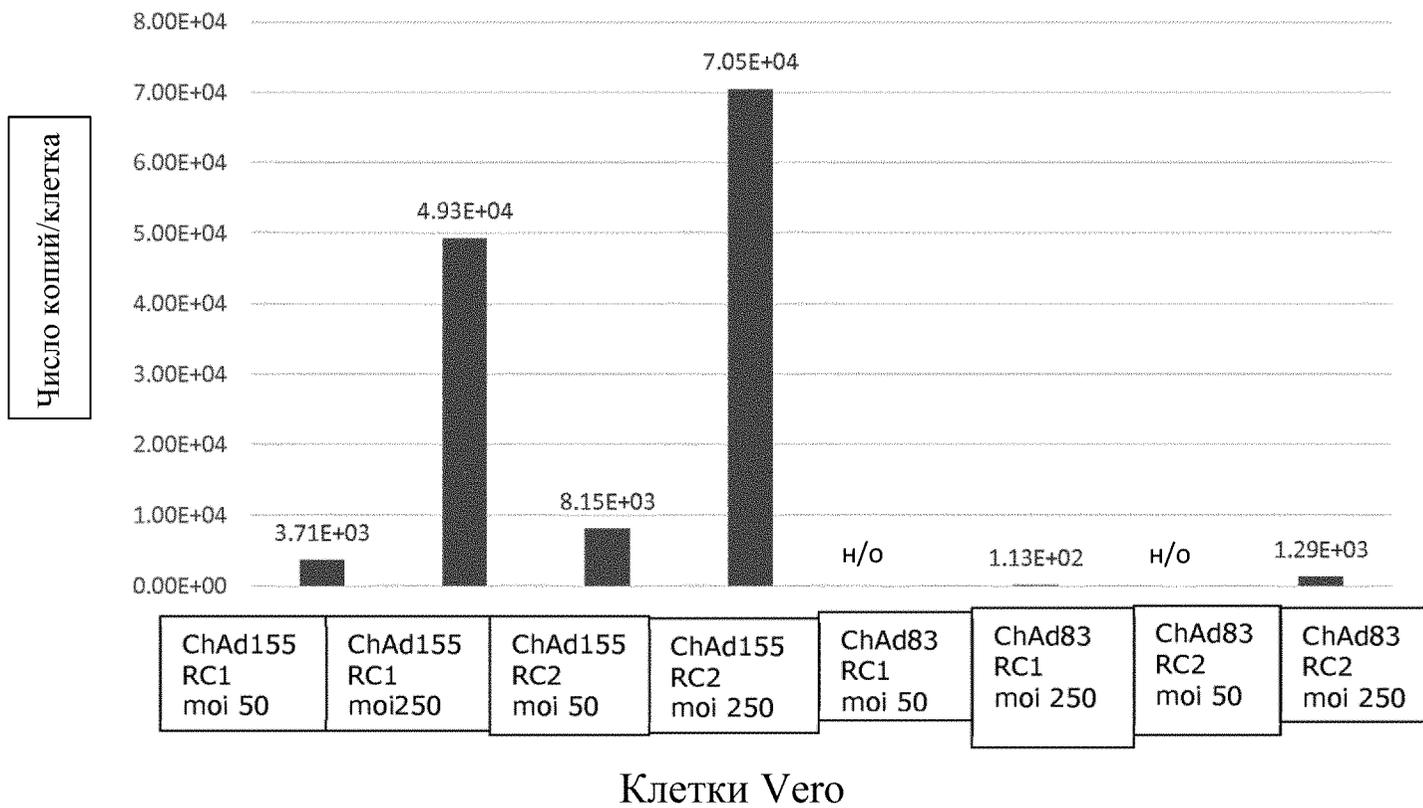
ФИГ. 4



ФИГ. 5

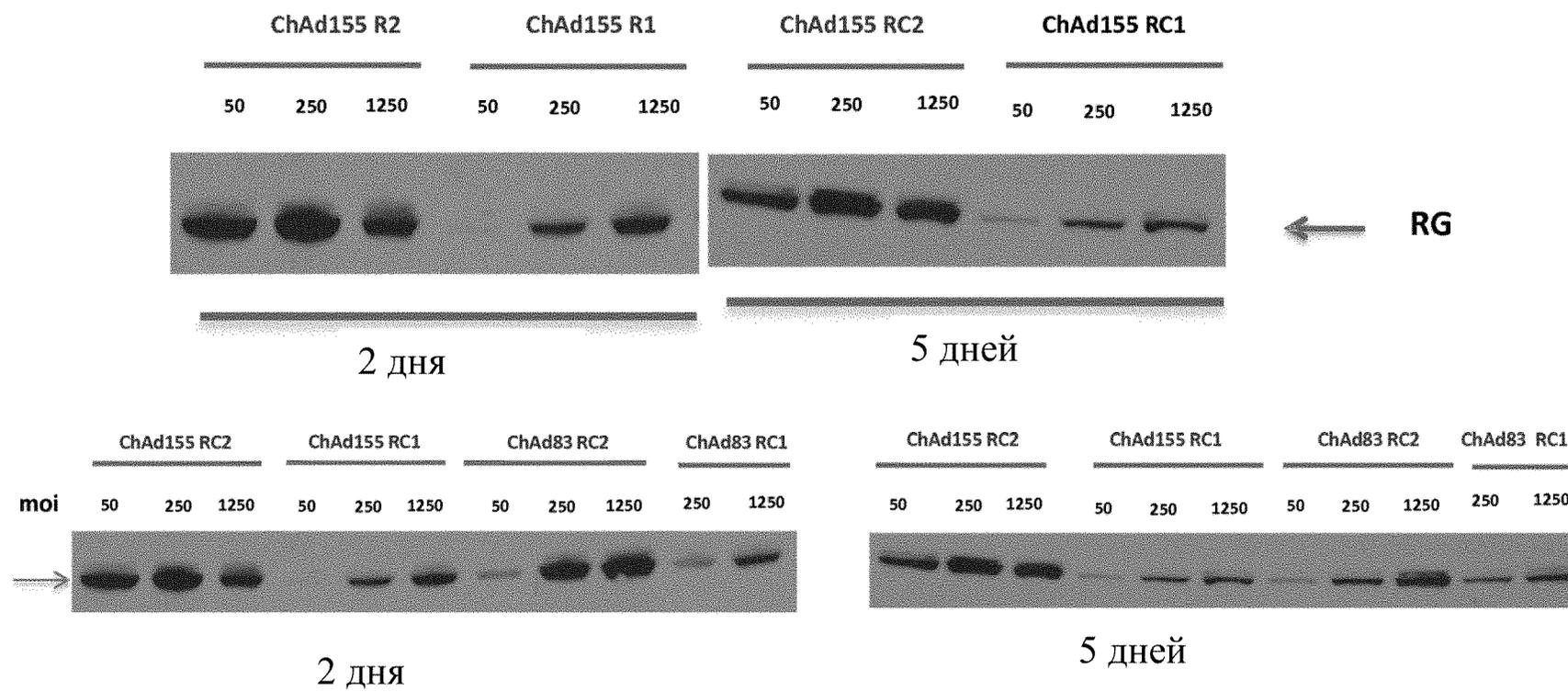


ФИГ. 6 (верхняя панель)

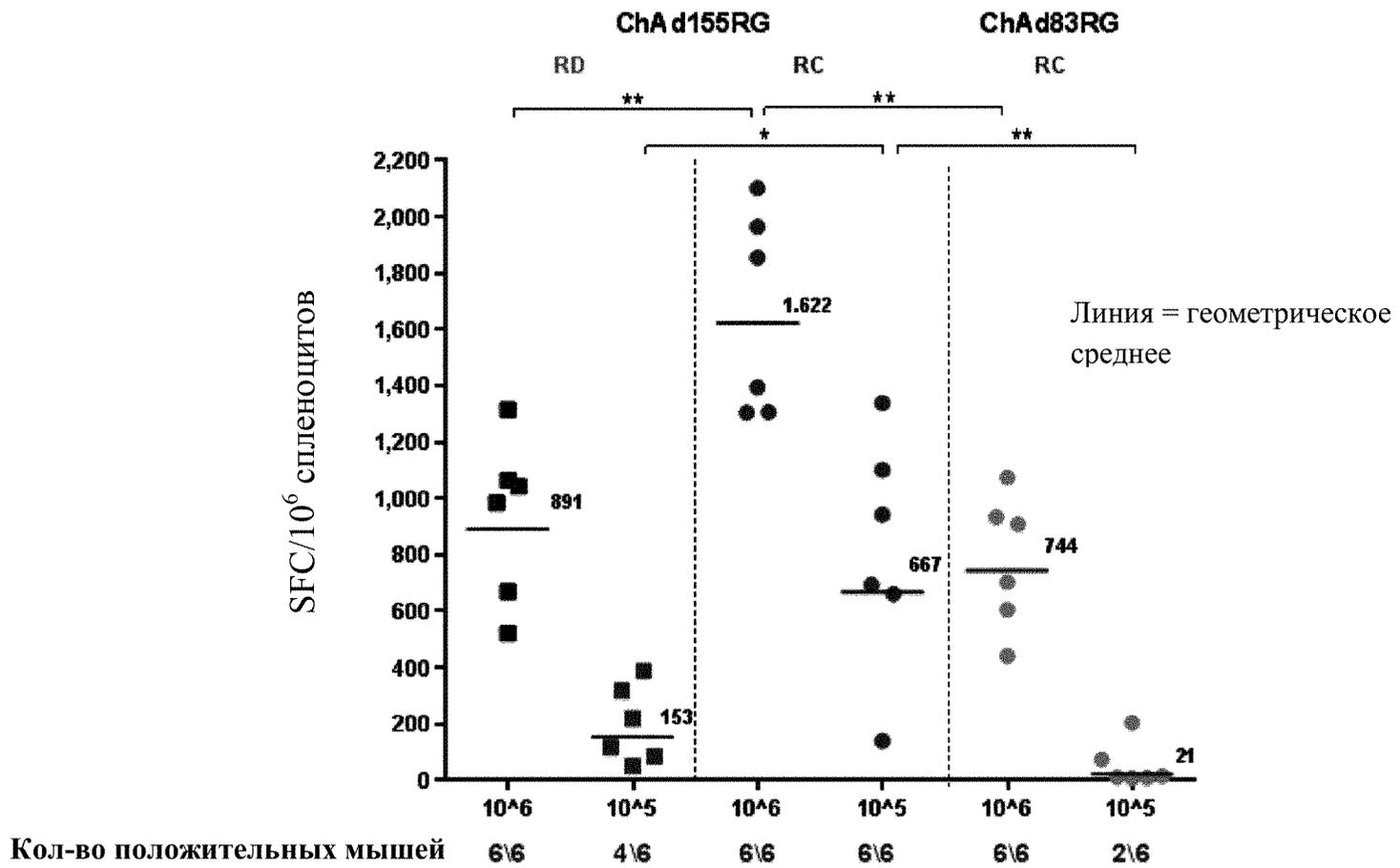


Клетки Vero

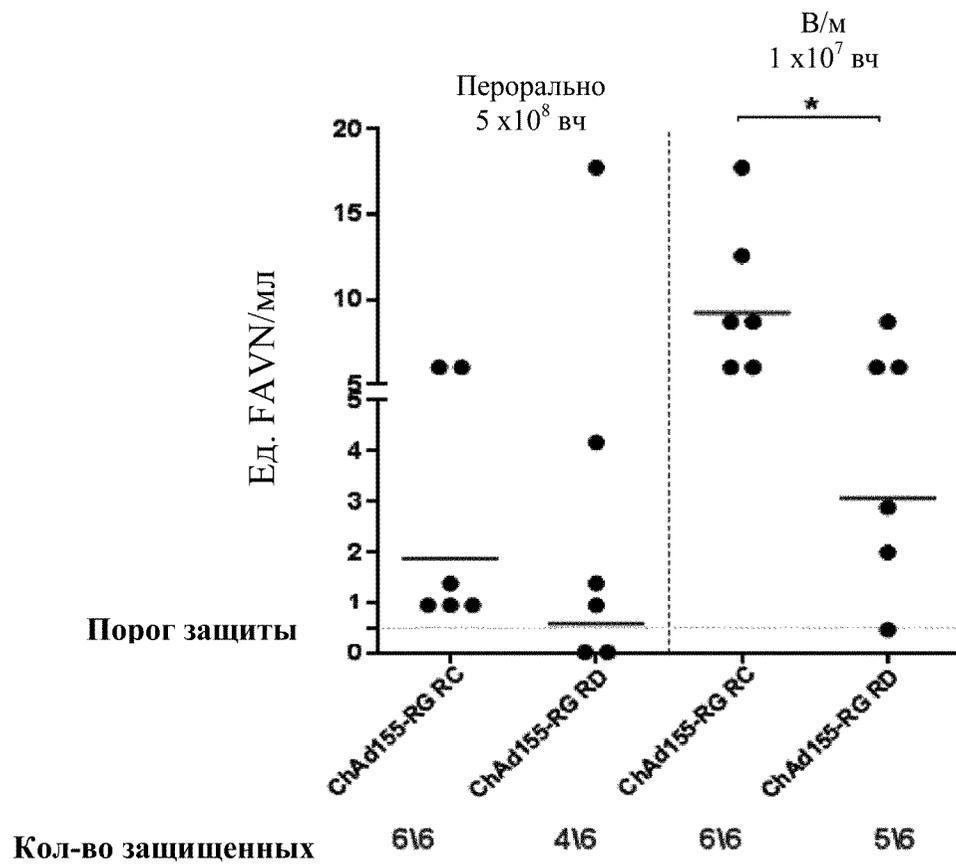
ФИГ. 6 (нижняя панель)



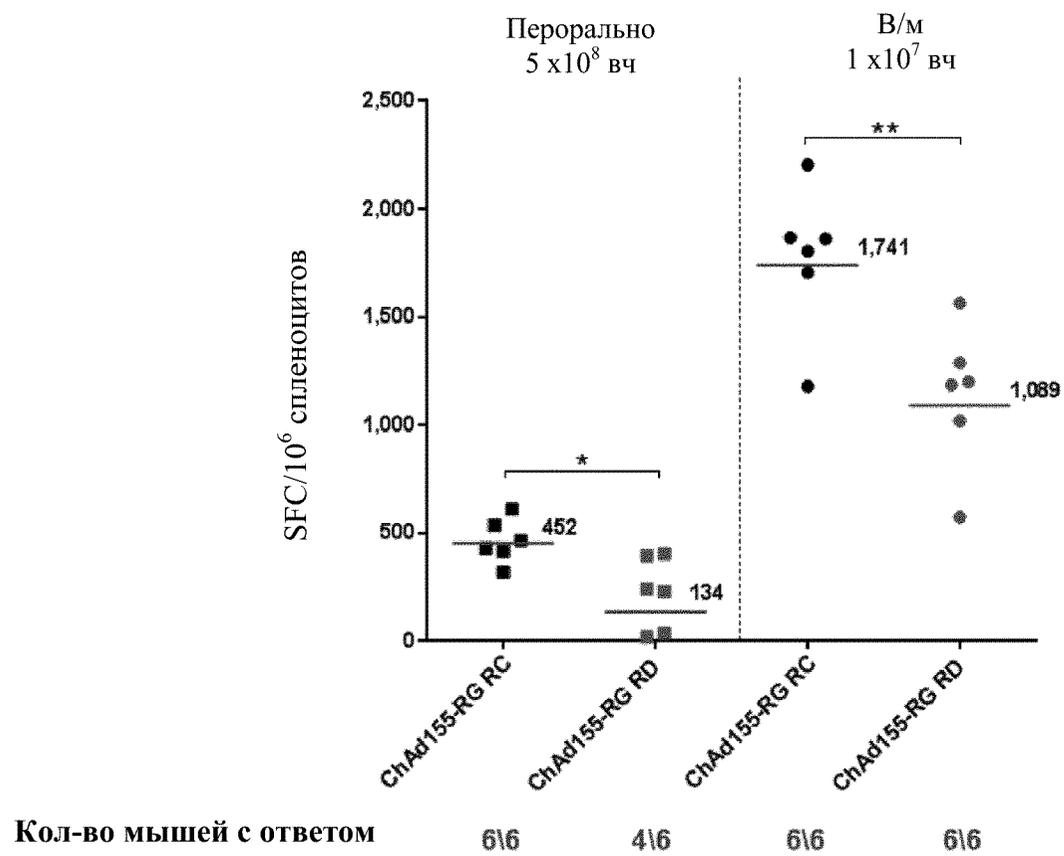
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9 (верхняя панель)



ФИГ. 9 (нижняя панель)