

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091004** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.08.10

(51) Int. Cl. *C07K 14/075* (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.30

(54) **АДЕНОВИРУС И ПУТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **17199348.8**

(32) **2017.10.31**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2018/079713**

(87) **WO 2019/086456 2019.05.09**

(71) Заявитель:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Эйл Тако Жилль, Рой Соумитра, Кан
Селина, Кюстерс Жером Х.Х.В. (NL)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к последовательностям аденовирусной нуклеиновой кислоты и аденовирусным векторам, содержащим указанные последовательности нуклеиновой кислоты. Аденовирусные векторы по изобретению можно использовать для индукции защитного иммунного ответа у субъекта.

202091004
A1

202091004

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562380EA/060

АДЕНОВИРУС И ПУТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к области биотехнологии. Более конкретно, к области и применению, связанным с аденовирусными векторами, такими как дефектные по репликации аденовирусные векторы для доставки антигенов и индуцирования иммунного ответа у хозяев.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Векторы на основе рекомбинантных аденовирусов широко используются в связанных с генной терапией областях применения и для вакцин. Было показано, что вакцины на основе вектора AdV-5 вызывают эффективные и защитные иммунные ответы в ряде различных животных моделей (см., например, WO2001/02607; WO2002/22080; Shiver et al., Nature 415:331 (2002); Letvin et al., Ann. Rev. Immunol. 20:73 (2002); Shiver and Emini, Ann. Rev. Med. 55:355 (2004)). Тем не менее, применимость вакцин на основе рекомбинантного вектора AdV-5, вероятно, будет ограничена высокой серопревалентностью AdV-5-специфических нейтрализующих антител (NAb) в популяциях людей. В исследованиях на мышах, макаках-резусах и людях было показано, что существование иммунитета против AdV-5 существенно подавляет иммуногенность вакцин на основе AdV-5.

[0003] Одна перспективная стратегия, позволяющая обойти наличие предсуществующего иммунитета у индивидуумов, ранее инфицированных или получавших лечение наиболее распространенным аденовирусом человека, например AdV-5, предусматривает разработку рекомбинантных векторов на основе серотипов аденовирусов, которые не подвергаются воздействию таких предсуществующих механизмов иммунной защиты. Одна из таких стратегий основана на применении аденовирусов отличных от человека обезьянообразных, поскольку они, как правило, не инфицируют людей и характеризуются низкой серопревалентностью в образцах от человека. Аденовирусы отличных от человека обезьянообразных пригодны для применения в отношении людей, поскольку было показано, что эти вирусы могут инфицировать клетки человека *in vitro* (WO2003/000283; WO2004/037189).

[0004] Таким образом, в данной области техники существует потребность в альтернативных аденовирусных векторах, которые можно получать в больших количествах, которые не сталкиваются с предсуществующими механизмами иммунной защиты у хозяина, но которые тем не менее характеризуются иммуногенностью и способностью индуцировать сильный иммунный ответ на антигены, кодируемые гетерологичными нуклеиновыми кислотами, вставленными в вектор.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящим изобретением предусмотрены последовательности выделенных нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды гексона. В определенных вариантах

осуществления полипептид гексона или его функциональное производное предусматривает полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1 или аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1.

[0006] В определенных вариантах осуществления полипептид гексона предусматривает полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона и характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:2.

[0007] Настоящим изобретением также предусмотрены последовательности выделенных нуклеиновых кислот, кодирующие полипептид фибры или его функциональное производное. В определенных вариантах осуществления полипептид фибры содержит по меньшей мере одну из полипептидной последовательности головки фибры, предусматривающей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10; полипептидной последовательности ножки фибры, предусматривающей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11; и полипептидной последовательности хвостовой части фибры, предусматривающей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12. В определенных вариантах осуществления полипептид фибры или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BLY6 (SEQ ID NO:3) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:3.

[0008] Варианты осуществления настоящего изобретения также предусмотрены выделенные полипептиды фибры и гексона, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты фибры и гексона по настоящему изобретению.

[0009] Дополнительно настоящим изобретением предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты гексона, кодирующую по меньшей мере один из раскрытых в данном документе полипептидов гексона, и последовательность нуклеиновой кислоты фибры, кодирующую по меньшей мере один из раскрытых в данном документе полипептидов фибры. В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрены векторы, содержащие описанные в данном документе выделенные нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В другом варианте осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии. В одном предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой аденовирусный вектор. Более предпочтительно, вектор дополнительно содержит трансген.

[0010] Настоящим изобретением также предусмотрены рекомбинантные клетки, содержащие описанные в данном документе векторы. Такие клетки можно применять для получения рекомбинантного белка, экспрессии рекомбинантного белка или получения векторов или вирусных частиц. Настоящим изобретением также предусмотрены способы получения вектора. Способы включают (а) выращивание раскрытой в данном документе рекомбинантной клетки в условиях, обеспечивающих продуцирование вектора; и (b) выделение вектора из рекомбинантной клетки.

[0011] В определенных вариантах осуществления предусмотрены иммуногенные композиции, содержащие раскрытые в данном документе векторы. Также предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение субъекту раскрытых в данном документе иммуногенных композиций.

[0012] В определенных вариантах осуществления предусмотрены аденовирусные векторы, содержащие (а) по меньшей мере один трансген и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. Полипептид гексона может, например, предусматривать полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1 или аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1. Полипептид гексона может, например, содержать аминокислотную последовательность, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:2.

[0013] В определенных вариантах осуществления предусмотрены аденовирусные векторы, содержащие (а) по меньшей мере один трансген и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления полипептид фибры может содержать по меньшей мере одну из полипептидной последовательности головки фибры, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10; полипептидной последовательности ножки фибры, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11; и полипептидной последовательности хвостовой части фибры, содержащей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12. В определенных вариантах осуществления полипептид фибры или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BLY6 (SEQ ID NO:3) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:3. Вариантами осуществления

настоящего изобретения также предусмотрены аденовирусные векторы, содержащие (а) по меньшей мере один трансген; (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения; и (с) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0014] В определенных вариантах осуществления аденовирусные векторы, представленные в данном документе, представляют собой дефектные по репликации аденовирусные векторы (rAd). В одном варианте осуществления аденовирусные векторы могут предусматривать делецию E1. В определенных вариантах осуществления представленные в данном документе аденовирусные векторы могут дополнительно предусматривать делецию E3. Аденовирусные векторы могут являться векторами на основе аденовирусов обезьян, содержащими последовательности аденовирусной нуклеиновой кислоты от одного или нескольких аденовирусов обезьян (SAdV), таких как аденовирусы шимпанзе (например, ChAd3); аденовирусы гориллы или аденовирусы макака-резуса (например, rhAd51, rhAd52 или rhAd53). Аденовирусные векторы могут представлять собой векторы на основе аденовируса человека, содержащие аденовирусные последовательности от одного или нескольких аденовирусов человека (например, hAdV-4, hAdV-5, hAdV-26, hAdV-35). Предпочтительно аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты аденовируса человека. Последовательности нуклеиновой кислоты аденовируса человека могут, например, происходить от аденовируса-4 человека (hAdV-4), аденовируса-5 человека (hAdV-5), аденовируса-26 человека (hAdV-26) или аденовируса-35 человека (hAdV-35). Аденовирусные векторы могут, например, содержать *orf6* и *orf 6/7 E4* аденовируса-5 человека (hAdV-5).

[0015] В определенных вариантах осуществления трансген прилегает к инвертированному концевому повтору (ITR). В определенных вариантах осуществления трансген расположен в области делеции E1 или прилегает к ней, в области делеции E3 или прилегает к ней и/или в области ITR или прилегает к нему, например, между областью E4 и правым ITR (RITR).

[0016] В определенных вариантах осуществления аденовирусные векторы, представленные в данном документе, содержат последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

[0017] Также предусмотрены иммуногенные композиции или вакцины, содержащие описанные в данном документе аденовирусные векторы и фармацевтически приемлемый носитель. Дополнительно настоящим изобретением предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Способы предусматривают введение субъекту раскрытых в данном документе вакцин. Дополнительно настоящим изобретением предусмотрены способы получения вакцины. Способы предусматривают объединение раскрытого в данном документе аденовирусного вектора с фармацевтически приемлемым носителем.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0018] Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, однако, что настоящая заявка не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

[0019] На фигуре 1 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BLY6.FLuc и Ad49.FLuc. На фигуре 1A показана схема эксперимента. На фигуре 1B показан клеточный иммунный ответ, индуцированный Ad26.FLuc, BLY6.FLuc и Ad49.FLuc, развившийся против кодируемого вектором антигена (т. е. Fluc, люциферазы светлячка), как определено с помощью анализа ELISPOT с применением интерферона гамма (IFN- γ). По оси у показано количество пятнообразующих единиц (SFU) на 10^6 спленцитов, а пунктирной линией обозначено значение 95% процентиля для средовых стимуляторов.

[0020] На фигуре 2 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BLY6.RSVF-2A-GLuc. На фигуре 2A показана схема эксперимента. На фигуре 2B показан график результатов анализа нейтрализации вируса (VNA), проведенного через восемь недель после иммунизации Ad26.RSVF-2A-GLuc или BLY6.RSVF-2A-GLuc в трех различных концентрациях (10^8 , 10^9 и 10^{10} в. ч.) или Ad26.FLuc или BLY6.FLuc в количестве 10^{10} в. ч. На фигуре 2C показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad26.RSVF-2A-GLuc и BLY6.RSVF-2A-GLuc после иммунизации, как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ . На фигуре 2D показан график RSVF-специфических связывающих антител IgG, индуцированных Ad26.RSVF-2A-GLuc или BLY6.RSVF-2A-GLuc, в сыворотке крови иммунизированных мышей через 8 недель после иммунизации.

[0021] На фигуре 3 показаны титры нейтрализации гомологичных и гетерологичных аденовирусов, индуцированные у мышей, иммунизированных аденовирусными векторами Ad35, Ad26, Ad49, Ad5, Ad4 и BLY6.

[0022] На фигуре 4 показана серопревалентность для Ad35, Ad26, Ad5 и BLY6 в образцах сыворотки крови, полученных от группы из 200 взрослых человек в возрасте от 18 до 55 лет, проживающих в Соединенных Штатах (США) и Европейском союзе (ЕС). Титры нейтрализации, измеренные в данных образцах сыворотки крови для каждого вектора, были разделены на четыре категории (<16 (отрицательные), от 16 до 300, от 300 до 1000, от 1000 до 4000 и >4000), представленные в указанных диаграммах.

[0023] На фигуре 5 показана схема плазмиды pBLY6.dE1.dE3 (SEQ ID NO:8).

[0024] На фигуре 6 показана схема плазмиды pBLY6.dE1.dE3.5IXp (SEQ ID NO:9).

[0025] На фигуре 7 показаны результаты выравнивания последовательностей полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2) и полипептида гексона SAdV-30-1 (SEQ ID NO:4).

[0026] На фигуре 8 показана продуктивность в отношении нового вектора

ВLY6.Fluc в линии клеток-продуцентов sPER.C6.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0027] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере отчасти, на выделении и идентификации нового изолята аденовируса гориллы, отнесенного к аденовирусам вида E, а также на создании и оценке вакцинных векторов, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области полипептидов гексона и фибры указанного аденовируса гориллы. Аденовирусные векторы способны вызывать иммунный ответ и, кроме того, имеют низкую серопревалентность у людей. Аденовирусные векторы можно составлять для получения вакцин и применять для индуцирования защитного иммунитета против конкретных представляющих интерес антигенов.

[0028] Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе "Предпосылки изобретения" и на протяжении всего описания; при этом каждый из этих литературных источников включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которое было включено в настоящее описание, предназначено для обеспечения контекста настоящего изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любые или все из этих материалов являются частью предшествующего уровня техники относительно любых раскрытых или заявленных изобретений.

[0029] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В иных случаях определенные термины, используемые в данном документе, имеют значения, изложенные в описании.

[0030] Следует отметить, что используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[0031] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в данном документе, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает в себя все значения в диапазоне от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Таким же образом диапазон концентраций от 1% до 10% (вес/об.) включает в себя диапазон от 0,9% (вес/об.) до 11% (вес/об.). В данном контексте использование числового диапазона однозначно включает в себя все возможные поддиапазоны, все отдельные численные значения в этом диапазоне, включая целые числа в таких диапазонах и дробные значения, если контекст явно не указано иное.

[0032] Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалистам в данной области будет известно, или же они смогут установить с помощью постановки стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных

вариантов осуществления описанного в данном документе настоящего изобретения. Такие эквиваленты подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением.

[0033] В данном контексте подразумевается, что термины "предусматривает", "предусматривающий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "содержит", "содержащий" или любые другие их вариации означают, что они охватывают указанное целое число или группу целых чисел, но не исключают любые другие целые числа или группу целых чисел, и подразумевается, что они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, содержащие перечень элементов не обязательно ограничиваются только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не указанные или являющиеся неотъемлемой частью такой композиции, смеси, процесса, способа, изделия или устройства. Кроме того, если явно не указано иное, "или" относится к включающему или, а не исключающему или. Например, условию А или В отвечает любое из следующего: А истинно (или в наличии) и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или в наличии), и оба А и В истинны (или в наличии).

[0034] Используемый в данном документе связующий термин "и/или" между несколькими перечисленными элементами понимают как охватывающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как подпадающий под данное значение и, следовательно, удовлетворяющий требованию применяемого в данном документе термина "и/или". Понятно, что одновременную применимость более чем одного из вариантов понимают как подпадающую под данное значение и, следовательно, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

[0035] Применяемый в данном контексте термин "состоит из" или варианты, такие как "состоят из" или "состоящий(ие) из", используемые во всем описании или формуле изобретения, указывают на включение любого из приведенных целых чисел или группы целых чисел, но при этом дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

[0036] Применяемый в данном контексте термин "по сути состоит из" или варианты, такие как "по сути состоят из" или "по сути состоящий(ие) из", используемые во всем описании или формуле изобретения, указывают на включение любого из приведенных целых чисел или группы целых чисел и необязательное включение любых приведенных целого числа или группы целых чисел, которые существенным образом не меняют основные или новые признаки указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

[0037] В данном контексте "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которого будут вакцинировать или

которое было вакцинировано согласно способу в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В данном контексте термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограничения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. д., более предпочтительно человека.

[0038] Слова "правый", "левый", "нижний" и "верхний" обозначают направления на графических материалах, на которые делается ссылка.

[0039] Термины "приблизительно", "примерно", "как правило", "по сути" и подобные им, используемые в данном контексте в отношении размера или свойства компонента предпочтительного изобретения, следует рассматривать как указывающие на то, что описываемый размер/свойство не представляет собой строго установленное ограничение или параметр и не исключает небольшие отклонения от него, которые функционально являются идентичными или сходными, как это будет понятно специалисту в данной области техники. Как минимум, ссылки на такие числовые параметры будут включать вариации, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в области техники (например, округление, ошибки измерения или другие систематические ошибки, допуски при производстве и т. п.), не будут изменять последнюю значащую цифру.

[0040] Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептида (например, полипептидов гексона и фибры и полинуклеотидов, которые их кодируют) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, что измеряют с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального изучения.

[0041] При сравнении последовательностей обычно одна последовательность выступает в роли эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты подпоследовательностей, и задают программные параметры алгоритма сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательностей для тестируемой(тестируемых) последовательности(последовательностей) относительно эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

[0042] Оптимальное выравнивание последовательностей для их сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологического выравнивания Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства по Пирсону-Липману, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с

помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном комплексе Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Сайенс-Драйв 575, Мэдисон, Висконсин) или с помощью визуального изучения (см., в целом, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

[0043] Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным посредством Национального центра биотехнологической информации. Данный алгоритм предусматривает первоначальную идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) путем идентификации коротких слов с длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторой положительной пороговой оценке T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называют порогом показателя сходства соседних слов (Altschul et al выше). Данные начальные совпадения соседних слов выполняют роль затравок для начала поисков с целью выявления более длинных HSP, которые их содержат. Совпадения слов затем продлевают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько можно увеличить совокупный показатель выравнивания.

[0044] В случае нуклеотидных последовательностей совокупные оценки рассчитывают с помощью параметров M ("вознаграждение" за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N ("штраф" за несовпадающие остатки; всегда <0). В случае аминокислотных последовательностей для расчета совокупной оценки применяют матрицу замен. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливают, когда совокупная оценка выравнивания уменьшается на величину X от ее максимального достигнутого значения; совокупная оценка падает до нуля или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используют длину слова (W), равную 11, ожидаемое значение (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP применяют в качестве значений по умолчанию длину слова (W), равную 3, ожидаемое значение (E), равное 10, и матрицу сравнения BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

[0045] Помимо расчета процента идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA

90:5873-5787 (1993)). Одним из показателей сходства, который выдается алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота считается схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

[0046] Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептидные последовательности являются по сути идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по сути идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются практически идентичными, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже.

[0047] В данном контексте термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект в состоянии контролировать инфекцию, вызываемую патогенным возбудителем, в отношении которого была проведена вакцинация. Патогенный агент может, например, представлять собой антигенный продукт гена или антигенный белок или их фрагмент. Обычно у субъекта, у которого выработался "защитный иммунный ответ", развиваются клинические симптомы только от легкой до умеренной степени тяжести или симптомы вовсе не развиваются. Обычно субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" на определенного возбудителя или "защитный иммунитет" к нему, не погибает в результате инфицирования указанным возбудителем.

[0048] Термин "адъювант" определяется как одно или несколько веществ, которые обуславливают стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на аденовирусные векторы по настоящему изобретению.

[0049] В данном контексте термин "антигенный продукт гена или его фрагмент" или "антигенный белок" может включать бактериальный, вирусный, паразитарный или грибковый белок или его фрагмент. Антигенный белок или антигенный продукт гена предпочтительно способен обуславливать в организме хозяина защитный иммунный ответ, например, индуцировать иммунный ответ на заболевание или инфекцию (например, бактериальное, вирусное, паразитическое или грибковое заболевание или инфекцию) и/или обеспечивать выработку у субъекта иммунитета к заболеванию или инфекции (т. е. вакцинации), который защищает субъекта от заболевания или инфекции.

Аденовирусные векторы

[0050] Воздействие определенных аденовирусов приводит к выработке иммунных ответов на определенные аденовирусные серотипы, что может влиять на эффективность аденовирусных векторов. Поскольку инфекции, вызванные аденовирусами человека, распространены у людей, распространенность нейтрализующих антител к аденовирусам человека в популяциях людей является высокой. Можно ожидать, что наличие таких нейтрализующих антител у индивидуумов снизит эффективность переносимого ген вектора, в основе которого лежит осто́в аденовируса человека. Одним из способов преодоления снижения эффективности является замена эпитопов на аденовирусных капсидных белках, которые являются мишенями для нейтрализующих антител. Целевые последовательности на капсидных белках можно заменить белковыми последовательностями из других аденовирусов, которые имеют низкую распространенность и, следовательно, против которых нейтрализующие антитела редко встречаются в популяциях людей.

[0051] "Капсидный белок" относится к белку на капсиде аденовируса (например, BLY6, HAdV-4) или его функциональному фрагменту или производному, который задействуют при определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. К капсидным белкам, как правило, относятся белки фибры, пентона и/или гексона. В определенных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой весь или полноразмерный капсидный белок аденовируса. В других вариантах осуществления капсидный белок представляет собой фрагмент или производное полноразмерного капсидного белка аденовируса. В определенных вариантах осуществления гексон, пентон и фибра, кодируемые аденовирусным вектором по настоящему изобретению, происходят от одного и того же или различных аденовирусов (т. е. гексон BLY6 и фибра BLY6, гексон BLY6 и фибра аденовируса человека, гексон аденовируса человека и фибра BLY6 и т. д.).

[0052] "Полипептид гексона" относится к гексоновым белкам оболочки аденовируса, их функциональным фрагментам и производным.

[0053] "Полипептид фибры" относится к белкам фибры аденовируса, их функциональным фрагментам и производным.

[0054] Одной из мишеней нейтрализующих антител к аденовирусам является основной белок оболочки, белок гексона. Замена белка гексона или переменных последовательностей в белке гексона, которые определяют серотип и связываются с нейтрализующими антителами, белком гексона или переменными последовательностями в белке гексона из аденовирусов, которые являются редкими в популяции людей, такими как описанные в данном документе последовательности аденовирусов горилл, может позволить сконструировать аденовирусные векторы, которые были бы менее восприимчивы к нейтрализации антителами, обычно встречающимися у людей.

[0055] Второй мишенью нейтрализующих антител к аденовирусам является белок фибры. Замена белка фибры или переменных последовательностей в белке фибры белком фибры или переменными последовательностями в белке фибры из аденовирусов,

которые являются редкими в популяции людей, такими как описанные в данном документе последовательности аденовирусов горилл, также может позволить сконструировать аденовирусные векторы, которые были бы менее восприимчивы к нейтрализации антителами, обычно встречающимися у людей. Сочетание описанных выше замен фибр с заменами гексонов может придать дополнительную устойчивость к нейтрализации антителами, обычно присутствующими в популяциях людей.

[0056] Настоящим изобретением предусмотрены последовательности выделенных нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды гексона и/или полипептиды фибры, полученные из выделенного серотипа аденовируса обезьян, и аденовирусные векторы, содержащие по меньшей мере одну из последовательностей выделенных нуклеиновых кислот.

[0057] "Функциональное производное" полипептида предпочтительно относится к модифицированной версии полипептида, например, где одна или несколько аминокислот полипептида могут быть делетированы, вставлены, модифицированы и/или заменены. Производное немодифицированного аденовирусного капсидного белка считают функциональным, если, например:

(а) аденовирус, содержащий производный капсидный белок в своем капсиде, сохраняет

по сути такую же или более низкую серопревалентность по сравнению с аденовирусом,

содержащим немодифицированный капсидный белок; и/или

(b) аденовирус, содержащий производный капсидный белок в своем капсиде, сохраняет

по сути такую же или более высокую инфицирующую способность в отношении клетки-хозяина по сравнению с аденовирусом,

содержащим немодифицированный капсидный белок; и/или

(c) аденовирус, содержащий производный капсидный белок в своем капсиде, сохраняет

по сути такую же или более высокую иммуногенность по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный капсидный белок; и или

(d) аденовирус, содержащий производный капсидный белок в своем капсиде, сохраняет по сути такой же или более высокий уровень обеспечения продуцирования трансгена по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный капсидный белок.

[0058] "Аденовирусный вектор" относится к рекомбинантному вектору, полученному по меньшей мере из части аденовирусного генома или содержащему такую часть аденовирусного генома.

[0059] В предпочтительных вариантах осуществления последовательности выделенных нуклеиновых кислот кодируют полипептиды гексона или их функциональные производные, предусматривающие полипептид, охватывающий

гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1 или аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления полипептиды гексона предусматривают полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид гексона или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:2. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:2.

[0060] В предпочтительных вариантах осуществления последовательности выделенных нуклеиновых кислот кодируют полипептиды фибры или их функциональные производные. Полипептид фибры может, например, предусматривать по меньшей мере одно из полипептида головки фибры, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10; полипептида ножки фибры, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11; и полипептида хвостовой части фибры, содержащего аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид фибры или его функциональное производное содержат аминокислотную последовательность полипептида фибры BLY6 (SEQ ID NO:3) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:3.

[0061] В предпочтительных вариантах осуществления предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, предусматривающая последовательность нуклеиновой кислоты гексона, кодирующую по меньшей мере один из раскрытых в данном документе полипептидов гексона, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один из раскрытых в данном документе полипептидов фибры.

[0062] В предпочтительных вариантах осуществления предусмотрены векторы, предпочтительно аденовирусные векторы, содержащие по меньшей мере одну из последовательности выделенной нуклеиновой кислоты гексона и/или последовательности выделенной нуклеиновой кислоты фибры в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. Аденовирусные векторы могут, например, содержать по меньшей мере один трансген и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона и/или полипептид фибры, при этом полипептид гексона предусматривает полипептид, предусматривающий раскрытый в данном документе

полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, а полипептид фибры предусматривает описанный в данном документе полипептид фибры.

[0063] Как правило, аденовирусный вектор по настоящему изобретению содержит весь геном рекомбинантного аденовируса, например, в плазмидном, космидном или бакуловирусном векторе. Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть представлены в виде РНК или в виде ДНК, полученных путем клонирования или изготовленных синтетическим путем. ДНК может быть двухнитевой или однонитевой.

[0064] Специалист в данной области техники поймет, что элементы, полученные из нескольких серотипов, можно объединить в одном аденовирусном векторе, например, на основе аденовируса человека или обезьян. Таким образом можно получить химерный аденовирусный вектор, в котором сочетаются требуемые свойства от различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный аденовирусный вектор по настоящему изобретению может сочетать отсутствие предсуществующего иммунитета к полипептидным последовательностям гексона и/или фибры аденовируса обезьян с высоким уровнем доставки антигена и презентирующей способности существующих аденовирусных векторов, таких как rAd4, rAd5, rAd26 или rAd35.

[0065] Преимущества аденовирусных векторов при применении в качестве вакцин включают легкость использования, хорошую технологичность производства в широком масштабе и превосходные показатели безопасности, основанные на многолетнем опыте исследований, разработки, производства и клинических испытаний с многочисленными аденовирусными векторами, о которых сообщалось. Аденовирусные векторы, которые применяют в качестве вакцин, как правило, обеспечивают хороший иммунный ответ на белок, кодируемый трансгеном, в том числе клеточный иммунный ответ. Аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением может быть основан на любом типе аденовируса и в некоторых вариантах осуществления основан на аденовирусе человека, который может принадлежать к любой группе или любому серотипу. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе человека из группы А, В, С, D, Е, F или G. В других предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе человека серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49 или 50. В других вариантах осуществления он представляет собой аденовирус обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы, который может принадлежать любому серотипу. В определенных вариантах осуществления данный рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе шимпанзе типа 1, 3, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 67 или SA7P.

[0066] В более предпочтительном варианте осуществления вектор на основе аденовируса шимпанзе из второй композиции представляет собой ChAdV3. Рекомбинантный аденовирус шимпанзе серотипа 3 (ChAd3 или cAd3) представляет собой

аденовирус подгруппы С со свойствами, сходными со свойствами аденовируса человека серотипа 5 (Ad5). В исследованиях на людях, в которых оценивали кандидатные вакцины к вирусу гепатита С (HCV), было показано, что ChAd3 является безопасным и иммуногенным (Barnes E, et al. 2012 *Science translational medicine* 4: 115ra1). Сообщалось, что вакцины на основе ChAd3 были способны индуцировать иммунный ответ, сравнимый с вакциной, предусматривающей вектор на основе Ad5 человека. См., например, Peruzzi D, et al. 2009 *Vaccine* 27: 1293-300 и Quinn KM, et al. 2013 *J Immunol* 190: 2720-35; WO 2005/071093; WO2011/0130627 и т. д.

[0067] Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913 и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", главы 67 и 68 соответственно в *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), а также других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов предусматривает использование стандартных молекулярно-биологических методик, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также других источниках, упомянутых в данном документе.

[0068] В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор предусматривает делецию E1 и/или делецию E3. Делеция E1 или E3 может, например, предусматривать полную делецию гена или частичную делецию, что делает продукт гена E1 или E3 функционально дефектным. Таким образом, в определенных вариантах осуществления аденовирус является дефектным по репликации, например, потому что он предусматривает делецию в участке E1 генома. Как известно специалисту, в случае делеций существенно важных участков в геноме аденовируса функциональные элементы, кодируемые этими участками, должны быть обеспечены в транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, т. е. если части или целые участки E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, например, быть встроенными в ее геном или находиться в виде так называемого вспомогательного аденовируса или вспомогательных плазмид. Аденовирус также может предусматривать делецию в участке E3, который не является существенным для репликации, и, следовательно, такую делецию не следует компенсировать. Одну или несколько областей E1, E2, E3 и E4 также можно инактивировать другими способами, такими как вставка представляющего интерес трансгена (обычно связанного с промотором) в подлежащие инактивации области.

[0069] Клетка-продуцент (также иногда называемая в уровне техники и в данном документе как 'пакующая клетка' или 'дополняющая клетка'), которую можно

использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может быть размножен. Например, размножение векторов на основе рекомбинантного аденовируса проводят в клетках-продуцентах, которые компенсируют дефекты в аденовирусе. Предпочтительно такие клетки-продуценты содержат в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса, и таким образом они способны к компенсации дефектов рекомбинантных аденовирусов с делецией в участке E1. Можно использовать любую E1-дополняющую клетку-продуцент, такую как клетки сетчатки глаза человека, иммортализованные с использованием E1, например клетки 911 или PER.C6 (см. патент США № 5994128), E1-трансформированные амнициты (см. патент EP № 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (см., например, WO 98/39411, патент США № 5891690), GH329:HeLa (Gao et al., 2000, Hum Gene Ther 11: 213-19), 293 и т. п. В определенных вариантах осуществления клетками-продуцентами являются, например, клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и т. п. Производство аденовирусных векторов в клетках-продуцентах описано в (Kovesdi et al., 2010, Viruses 2: 1681-703).

[0070] В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты аденовируса человека. Нуклеиновые кислоты аденовируса человека могут, например, быть выбраны из аденовируса-4 человека (Ad-4), аденовируса-5 человека (Ad-5), аденовируса-26 человека (Ad-26) или аденовируса-35 человека (Ad-35). В определенных вариантах осуществления дефектный по E1 аденовирусный вектор содержит кодирующую последовательность E4-orf6 из аденовируса Ad5 человека. Это обеспечивает возможность размножения таких аденовирусов в хорошо известных дополняющих линиях клеток, которые экспрессируют гены E1 из Ad5, таких как, например, клетки 293 или клетки PER.C6 (см., например, Fallaux et al., 1998, Hum Gene Ther 9: 1909-17, Havenga et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43; WO 03/104467, включенные в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки).

[0071] В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит трансген. "Трансген" относится к гетерологичной нуклеиновой кислоте, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, которая в норме отсутствует в векторе, и согласно настоящему изобретению трансген может кодировать антигенный продукт гена или антигенный белок, который вызывает иммунный ответ у субъекта. Например, трансген можно вводить в вектор посредством стандартных методик молекулярной биологии. Трансген можно, например, клонировать в делетированные области E1 или E3 аденовирусного вектора или в область между областью E4 и rITR. Трансген обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. В предпочтительных вариантах осуществления трансген вставлен в сайт вставки трансгена.

[0072] При необходимости последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды гексона и/или фибры в соответствии с вариантами

осуществления настоящего изобретения, и/или трансген, можно подвергать оптимизации в отношении кодонов для обеспечения надлежащей экспрессии у подвергаемого обработке хозяина (например, у человека). Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники.

[0073] Трансген может находиться под контролем происходящего из аденовируса промотора (т. е. быть функционально связан с ним) (например, главного позднего промотора) или может находиться под контролем гетерологичного промотора. Примеры подходящих гетерологичных промоторов включают промотор CMV и промотор RSV. Промотор предпочтительно расположен выше представляющего интерес гена в cassette экспрессии.

[0074] В предпочтительных вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

Иммуногенные композиции

[0075] Иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие иммунологически эффективное количество очищенных или частично очищенных векторов на основе аденовируса человека или обезьяны (например, гориллы) для применения в настоящем изобретении. Указанные композиции можно составлять в виде вакцины (также называемой в данном документе "иммуногенной композицией") согласно способам, хорошо известным из уровня техники. Такие композиции могут включать адъюванты для усиления иммунных реакций. Оптимальные доли каждого компонента в составе можно определить с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия.

[0076] Иммуногенные композиции в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно получать с помощью известных специалистам в данной области техники способов, принимая во внимание настоящее раскрытие. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, вазелин, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

[0077] Иммуногенные композиции, применяемые в настоящем изобретении, могут содержать адъюванты. Адъюванты, подходящие для совместного введения в соответствии с настоящим изобретением, должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для людей, включая QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, AS01, AS03, AS04, AS15, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, квасцы и MF59.

[0078] К другим адъювантам, которые можно вводить, относятся лектины, факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон,

тромбоцитарный фактор роста (PDGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (gCSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (gMCSF), фактор некроза опухоли (TNF), эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 или кодирующие их нуклеиновые кислоты.

[0079] Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны препятствовать эффективности активного ингредиента. Конкретная природа носителя или другого материала может зависеть от пути введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, внутрислизистого (например, в кишечнике), интраназального или внутрибрюшинного путей.

Способ индуцирования защитного иммунитета

[0080] Другой общий аспект настоящего изобретения относится к способу индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Способы могут, например, предусматривать введение субъекту вакцины, содержащей описанный в данном документе аденовирусный вектор и фармацевтически приемлемый носитель. Настоящим изобретением также предусмотрены способы получения вакцины. Способы предусматривают объединение описанного в данном документе аденовирусного вектора с фармацевтически приемлемым носителем.

[0081] В способах по настоящему изобретению в качестве вакцины можно применять любую из иммуногенных композиций в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, включая без ограничения описанные в данном документе.

[0082] Введение иммуногенных композиций/вакцин, содержащих векторы, обычно осуществляют внутримышечно или подкожно. Тем не менее, также могут быть предусмотрены другие способы введения, такие как внутривенный, кожный, внутрикожный или назальный и т. д. Внутримышечное введение иммуногенных композиций можно осуществлять с помощью иглы для инъекции суспензии аденовирусного вектора. Альтернативой является применение безыгольного инъекционного устройства для введения композиции (с использованием, например, BiojectorTM) или лиофилизованного порошка, содержащего вакцину.

[0083] В случае внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в участок поражения вектор будет представлен в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апиногенным и характеризуется подходящим значением pH, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники вполне способны получить подходящие растворы с применением, например, изотонических сред-носителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор Рингера с лактатом для инъекций. При необходимости можно включать консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие

добавки. Также можно использовать состав с замедленным высвобождением.

[0084] Как правило, введение будет предназначено для профилактики с целью выработки иммунного ответа к представляющему интерес антигену (например, бактериального, вирусного, паразитарного и/или грибкового патогена) до инфицирования или развития симптомов. К заболеваниям и нарушениям, которые можно лечить или предупреждать в соответствии с настоящим изобретением, относятся таковые, при которых иммунный ответ может играть защитную или терапевтическую роль. В других вариантах осуществления аденовирусные векторы можно вводить для постконтактной профилактики.

[0085] Иммуногенные композиции, содержащие векторы на основе аденовируса человека или обезьяны (например, гориллы), вводят субъекту, вызывая иммунный ответ на представляющий интерес антиген у субъекта. Количество композиции, достаточное для индуцирования выявляемого иммунного ответа, определяют как "иммунологически эффективную дозу" или "эффективное количество" композиции. Иммуногенные композиции по настоящему изобретению могут индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. В типичном варианте осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

[0086] Фактическое вводимое количество, а также частота и продолжительность введения будут зависеть от природы и тяжести подлежащего лечению явления. Назначение лечения, например, принятие решений относительно дозировки и т. д., находится в пределах сферы ответственности врачей общей практики и других врачей или ветеринара в случае ветеринарной практики, и при этом, как правило, учитываются подлежащее лечению нарушение, состояние отдельного пациента, участок доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методик и протоколов, упоминаемых выше, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980.

[0087] После получения аденовирусных векторов и необязательного составления таких частиц в виде композиций векторы можно вводить индивидууму, в частности человеку или другому примату. Введение можно осуществлять людям или другому млекопитающему, например, мыши, крысе, хомяку, морской свинке, кролику, овце, козе, свинье, лошади, корове, ослу, мартышке, собаке или кошке. Доставка отличному от человека млекопитающему не обязательно может предназначаться для терапевтической цели, а может предназначаться для применения в рамках эксперимента, например, при изучении механизмов иммунных ответов на аденовирусные векторы.

[0088] В одном иллюстративном режиме аденовирусный вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме от приблизительно 100 мкл до приблизительно 10 мл, содержащем концентрации от приблизительно 10^4 до 10^{12} вирусных частиц/мл. Предпочтительно аденовирусный вектор вводят в объеме от 0,1 до 2,0 мл. Например, аденовирусный вектор можно вводить в объеме 100 мкл, 500 мкл, 1 мл, 2 мл. Более предпочтительно, аденовирусный вектор вводят в объеме 0,5 мл. Необязательно,

аденовирусный вектор можно вводить в концентрации приблизительно 10^7 в. ч./мл, 10^8 в. ч./мл, 10^9 в. ч./мл, 10^{10} в. ч./мл, 5×10^{10} в. ч./мл, 10^{11} в. ч./мл или 10^{12} в. ч./мл. Как правило, аденовирусный вектор вводят в количестве от приблизительно 10^9 до приблизительно 10^{12} вирусных частиц (в. ч.) субъекту-человеку за одно введение, более типично в количестве от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{12} в. ч.

[0089] После начальной вакцинации может идти бустерная или вторичная инъекция вакцины/композиции, содержащей тот же аденовирусный вектор, кодирующий представляющий интерес антиген, или вакцины/композиции, содержащей другой аденовирусный вектор, кодирующий тот же представляющий интерес антиген.

[0090] Композиция может, при необходимости, быть представлена в наборе, упаковке или дозаторе, который может содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может предусматривать металлическую фольгу или полимерную пленку, как например блистерная упаковка. Набор, упаковка или дозатор могут сопровождаться инструкциями по введению.

[0091] Композиции по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими средствами лечения либо одновременно, либо последовательно в зависимости от подлежащего лечению состояния.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0092] Настоящим изобретением также предусмотрены следующие неограничивающие варианты осуществления.

[0093] Вариант осуществления 1 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона или его функциональное производное, предусматривающие полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1 или аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:1.

[0094] Вариант осуществления 2 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1.

[0095] Вариант осуществления 3 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 1-2, причем полипептид гексона или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:2.

[0096] Вариант осуществления 4 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, содержащую любую из последовательностей

нуклеиновой кислоты по вариантам осуществления 1-3 и дополнительно содержащую последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры или его функциональное производное.

[0097] Вариант осуществления 5 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4, при этом полипептид фибры содержит полипептидную последовательность головки фибры, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10.

[0098] Вариант осуществления 6 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4, при этом полипептид фибры содержит полипептидную последовательность ножки фибры, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11.

[0099] Вариант осуществления 7 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 4, при этом полипептид фибры содержит полипептидную последовательность хвостовой части фибры, предусматривающую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12.

[00100] Вариант осуществления 8 представляет собой выделенную последовательность по любому из вариантов осуществления 4-7, при этом полипептид фибры или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BLY6 (SEQ ID NO:3) или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:3.

[00101] Вариант осуществления 9 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, содержащий полипептидную последовательность головки фибры, при этом полипептидная последовательность головки фибры предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:10.

[00102] Вариант осуществления 10 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, содержащий полипептидную последовательность ножки фибры, при этом полипептидная последовательность ножки фибры предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:11.

[00103] Вариант осуществления 11 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, содержащий полипептидную последовательность хвостовой части фибры, при этом полипептидная последовательность хвостовой части фибры предусматривает аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12.

[00104] Вариант осуществления 12 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из вариантов осуществления 9-11, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BLY6 (SEQ ID NO:3).

[00105] Вариант осуществления 13 представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-12.

[00106] Вариант осуществления 14 представляет собой вектор по варианту осуществления 13, который представляет собой аденовирусный вектор и дополнительно содержит трансген.

[00107] Вариант осуществления 15 представляет собой рекомбинантную клетку, содержащую вектор по варианту осуществления 13 или 14.

[00108] Вариант осуществления 16 представляет собой способ получения вектора, включающий (а) выращивание рекомбинантной клетки по варианту осуществления 15 в условиях, обеспечивающих продуцирование вектора; и (б) выделение вектора из рекомбинантной клетки.

[00109] Вариант осуществления 17 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую вектор по варианту осуществления 14.

[00110] Вариант осуществления 18 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по варианту осуществления 17.

[00111] Вариант осуществления 19 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (а) по меньшей мере один трансген и (б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO:1.

[00112] Вариант осуществления 20 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (а) по меньшей мере один трансген и (б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, содержащий аминокислотную последовательность полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2).

[00113] Вариант осуществления 21 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (а) по меньшей мере один трансген; (б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, содержащий аминокислотную последовательность полипептида гексона BLY6 (SEQ ID NO:2); и (с) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, содержащий аминокислотную последовательность полипептида фибры BLY6 (SEQ ID NO:3).

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание предусматривающих делеции E1 и E3 векторов на основе нового изолята аденовируса BLY6

[00114] Идентифицировали и секвенировали новый изолят аденовируса гориллы BLY6 (также обозначаемый JAd1-WT). Обнаружили, что данный изолят аденовируса гориллы филогенетически принадлежит к аденовирусам человека вида E (HAdV-E). Нуклеотидная последовательность полного генома BLY6 определена под SEQ ID NO:5.

Описание системы на основе единичной плазмиды, применяемой для создания Ad-векторов на основе BLY6

[00115] pBLY6.dE1.dE3 (SEQ ID NO:8; фигура 5) и pBLY6.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:9; фигура 6) представляют собой плазмиды, несущие полноразмерные геномы предусматривающих делеции E1 и E3 аденовирусных векторов на основе на изолята BLY6. Геномные последовательности вектора Ad, содержащиеся в этих плаزمиде, приведены под SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14 соответственно. В пределах каждой из этих плазмид геном аденовирусного вектора фланкирован двумя сайтами рестрикционных ферментов SwaI (т. е. на каждом конце генома вектора расположено по одному сайту SwaI). Такие сайты SwaI предназначены для способствования вырезанию генома Ad-вектора из плазмидного остова перед "спасением" вируса путем трансфекции подходящих E1-дополняющих клеток (таких как клетки HEK293, 911 и PER.C6). Геномы Ad-вектора, содержащиеся в этих плазмиде, дополнительно несут определенные сайты рестрикционных ферментов, введенные в местоположении делеции E1, в области делеции E3 и участок, прилегающий к правому инвертированному концевому повтору (RITR). Эти сайты рестрикционных ферментов выбирали с обеспечением их уникальности в контексте плазмид с полным геномом Ad. Они представляют собой "сайты вставки трансгена", которые обеспечивают легкое конструирование с помощью стандартных методик молекулярного клонирования Ad-векторов, несущих одну или несколько содержащих трансген кассет экспрессии, вставленных в любое из указанных соответствующих местоположений или в любые их комбинации. Схемы Ad-вектора и конструкции плазмид более подробно описаны в разделах ниже.

Схема генома Ad-вектора на основе BLY6

[00116] Каждый из геномов Ad-вектора на основе BLY6 разрабатывали таким образом, чтобы они предусматривали делецию E1, делецию E3, разные сайты вставки трансгена и замену нативной открытой рамки считывания E4 (orf) 6 и orf6/7 на таковую аденовируса-5 человека (HAdV-5). Область E1 каждого аденовируса удаляли и заменяли сайтом вставки трансгена, содержащим последовательность сайта рестрикционного фермента AsiSI. Область E3 каждого аденовируса удаляли и заменяли сайтом вставки трансгена, содержащим последовательность сайта рестрикционного фермента FseI. Другой сайт вставки трансгена создавали путем вставки последовательности сайта рестрикционного фермента PacI в участок, прилегающий к правому инвертированному концевому повтору (ITR) каждого аденовируса. Последовательности BLY6, предусматривающие кодирующие последовательности orf6 и orf6/7 E4, заменяли на SEQ ID NO:6. Эта заменяющая последовательность предусматривала кодирующие последовательности orf6 и orf6/7 E4 аденовируса-5 человека (HAdV-5) (пары оснований 32914-34077 последовательности GenBank № AC_000008).

[00117] Разрабатывали и конструировали два типа делеций области E1. Геном Ad-вектора на основе BLY6, содержащийся в pBLY6.dE1.dE3, несет делецию области E1, соответствующую удалению нуклеотидов 453-3016 из SEQ ID NO:5. В то же время геном Ad-вектора на основе BLY6, содержащийся в pBLY6.dE1.dE3.5IXP, несет большую делецию последовательности, охватывающей область E1, которая предусматривает

удаление всех кодирующих последовательностей E1 BLY6 (т. е. нуклеотидов 453-3366 из SEQ ID NO:5). Кроме того, данный последний геном Ad-вектора дополнительно разрабатывали с обеспечением того, чтобы он нес замену некодирующего участка последовательности между последовательностями, кодирующими 55K и pIX E1B, на последовательность HAdV-5 (т. е. последовательности, соответствующие нуклеотидам 3367-3454 из SEQ ID NO:5, заменяли на нуклеотиды 3510-3608 из GenBank AC_000008 (т. е. SEQ ID NO:7)).

Конструирование единичных плазмид, содержащих геномы Ad-вектора на основе BLY6

[00118] pBLY6.dE1.dE3 (SEQ ID NO:8) конструировали за несколько стадий генного синтеза (который был осуществлен компанией GenScript) и стандартных процедур молекулярного клонирования. Во-первых, синтезировали фрагмент ДНК размером 3586 п. о. (SEQ ID NO:15), содержащий левый конец требуемого генома Ad-вектора (т. е. несущий вышеупомянутую делецию E1), и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента MfeI-NdeI в расщепленную посредством EcoRI и NdeI pBR322 (регистрационный номер GenBank - J01749.1), что приводило к получению промежуточной плазмиды 1 BLY6. Во-вторых, синтезировали фрагмент длиной 4138 п. о. (SEQ ID NO:16), содержащий правый конец требуемого генома Ad-вектора (т. е. несущий вышеупомянутую делецию E3, частичную замену последовательности E4 и сайт вставки трансгена, расположенный в участке, прилегающем к tITR), и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента BamHI-NdeI в промежуточную расщепленную посредством BamHI и NdeI плазмиду 1 BLY6, что приводило к получению промежуточной плазмиды 2 BLY6. В-третьих, синтезировали фрагмент длиной 4563 п. о. (SEQ ID NO:17), содержащий средний фрагмент генома Ad-вектора, и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента BamHI-MfeI в расщепленную посредством BamHI и MfeI промежуточную плазмиду 2 BLY6, что приводило к получению промежуточной плазмиды 3 BLY6 (SEQ ID NO:18). В-четвертых, рестрикционный фрагмент BsrGI-BsrGI длиной 18987 п. о. из вирусного генома BLY6 (SEQ ID NO:5) лигировали в расщепленную посредством BsrGI промежуточную плазмиду 3 BLY6, что приводило к получению конечной плазмиды pBLY6.dE1.dE3 (SEQ ID NO:8).

[00119] pBLY6.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:9) конструировали таким же образом, что и pBLY6.dE1.dE3, за исключением того, что вышеупомянутую промежуточную плазмиду 3 BLY6 (SEQ ID NO:18) сначала модифицировали так, чтобы она предусматривала требуемую делецию E1 и вставку промотора pIX Ad5. Это осуществляли путем синтеза фрагмента длиной 638 п. о. (SEQ ID NO:19), который впоследствии лигировали в виде рестрикционного фрагмента AsiSI-AgeI в расщепленную посредством AsiSI и AgeI промежуточную плазмиду 3 BLY6.

[00120] pBLY6.FLuc (SEQ ID NO:20) и pBLY6.RSVF-2A-GLuc (SEQ ID NO:21) представляли собой плазмиды, полученные из pBLY6.dE1.dE3, каждая из которых несет геном Ad-вектора на основе BLY6, снабженный трансгенной кассетой экспрессии,

вставленной в местоположение делеции E1. Последовательности генома Ad-вектора, переносимые в данных плазмидах, представлены под SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23 соответственно. pBLY6.FLuc несет трансгенную кассету экспрессии люциферазы светлячка (FLuc). Управление данной кассетой осуществляется главным немедленно-ранним промотором цитомегаловируса (т. е. "промотором CMV") и она содержит происходящий от SV40 сигнал полиаденилирования. pBLY6.RSVF-2A-GLuc несет трансгенную кассету экспрессии для "RSV-F_{A2}-2A-GLuc" (RSVF-2A-GLuc), который представлял собой химерный белок, состоящий из фузогенного гликопротеина респираторно-синцитиального вируса штамма A2, пептида вируса ящура 2A и люциферазы Gaussia (GLuc). Как и кассета Fluc, управление данной кассетой обеспечивается промотором CMV и она несет сигнал полиаденилирования SV40. Кроме того, данная кассета содержит в своей 5'-нетранслируемой области последовательность, предусматривающую интрон 2 гена аполипопротеина A1 человека. Каждую из кассет экспрессии Fluc и RSVF-2A-GLuc конструировали за несколько стандартных стадий синтеза генов и молекулярного клонирования, после чего их лигировали в уникальный сайт рестрикционного фермента AsiSI в pBLY6.dE1.dE3 с получением pBLY6.FLuc и pBLY6.RSVF- 2A-GLuc соответственно.

Создание и получение аденовирусных векторов на основе BLY6

[00121] Аденовирусные векторы BLY6.FLuc (также обозначаемый JAd1NVT003) и BLY6.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемый JAd1NVT001), которые содержали последовательности генома аденовирусного вектора SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23 соответственно, получали путем трансфекции соответствующими плазмидами с геномом Ad-вектора (т. е. pBLY6.FLuc и pBLY6.RSVF-2A-GLuc) E1-комплементарных клеток PER.C6. Перед трансфекцией клеток PER.C6, которые выращивали в качестве адгезивных культур на модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 10 mM MgCl₂, плазмиды с геномом Ad-вектора расщепляли с помощью SmaI для высвобождения соответствующих геномов аденовирусных векторов из плазмиды. Трансфекции выполняли в соответствии со стандартными процедурами с применением реагента для трансфекции липофектамина (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния). После сбора вирусов, "спасенных" путем трансфекции, вирусы дополнительно размножали с помощью нескольких последовательных циклов инфицирования на культурах клеток PER.C6. Вирусы очищали из собранной неочищенной вирусной биомассы с помощью двухстадийной процедуры ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl), как описано ранее (Havenga et al., "Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells," J. Gen. Virol. 87(8):2135-43 (2006)). Титры вирусных частиц (в. ч.) измеряли с помощью ранее описанной спектрофотометрической процедуры (Maizel et al., "The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12," Virology, 36(1):115-25 (1968)).

Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные новыми

аденовирусными векторами

[00122] В примерах 2 и 3 описаны эксперименты, проведенные для оценки иммуногенности новых аденовирусных векторов на основе BLY6, полученных в соответствии с данным документом. В этих экспериментах новые векторы оценивали в отношении их способности индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы к кодируемым вектором (модельным) антигенам у мышей после внутримышечной иммунизации. Векторы тестировали с помощью двух разных антигенов: люциферазы светлячка (FLuc) и RSV-F_{A2}-2A-GLuc (RSVF-2A-GLuc). RSVF-2A-GLuc представляет собой химерный белок, состоящий из фузогенного гликопротеина респираторно-синцитиального вируса штамма A2, пептида 2A вируса ящура и люциферазы Gaussia (GLuc). Каждый вектор сравнивали параллельно с эталонным вектором на основе аденовируса человека типа 26 (HAdV-26, также называемого в данном документе Ad26) или аденовируса человека типа 49 (HAdV-49, также называемого в данном документе Ad49), несущем ту же самую кодирующую антиген трансгенную кассету. Иммунные ответы на соответствующие антигены измеряли с помощью хорошо известных иммунологических анализов, таких как иммуноферментный спот-анализ (ELISPOT), иммуноферментный анализ (ELISA) и, в случае антигена RSVF-2A-GLuc, анализ нейтрализации респираторного-синцитиального вируса (VNA).

Пример 2. Клеточные иммунные ответы, индуцированные BLY6.FLuc

[00123] Для оценки клеточной иммуногенности нового аденовирусного вектора BLY6 мышей Balb/C иммунизировали внутримышечной инъекцией Ad26.FLuc, Ad49.FLuc (положительные контроли), вектора BLY6, экспрессирующего люциферазу светлячка (BLY6.FLuc), или аденовектора, не кодирующего трансген (пустого Ad26). При введении тестировали две дозы вектора: 10^9 и 10^{10} вирусных частиц (в. ч.) на мышью. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли, а спленоциты стимулировали в течение ночи с помощью пула 15-мерных перекрывающихся пептидов FLuc (схема эксперимента на фигуре 1A). Клеточные иммунные ответы определяли путем анализа ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток (фигура 1B). Из результатов было видно, что при иммунизации в более высоких дозах (10^{10}) клеточные иммунные ответы, индуцированные BLY6, были приблизительно такими же высокими, как и ответ, наблюдаемый в случае Ad26.FLuc. В отличие от этого, при иммунизации более низкой дозой (10^9) BLY6.FLuc обеспечивал более сильный ответ, чем Ad26.FLuc.

[00124] В целом, клеточные иммунные ответы, индуцированные экспрессирующим FLuc рекомбинантным аденовирусным вектором BLY6 по настоящему изобретению, четко указывали на сильную иммуногенность этого вектора у мышей.

Пример 3. Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BLY6.RSVF-2A-GLuc

[00125] Иммуногенность нового аденовирусного вектора BLY6 дополнительно оценивали с помощью RSV-F_{A2}-2A-GLuc (RSVF-2A-GLuc) в качестве кодируемого вектором (модельного) вакцинного антигена. Мышей Balb/C иммунизировали

внутримышечно посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc (положительный контроль) или BLY6.RSVF-2A-GLuc (оба в количестве 10^8 , 10^9 и 10^{10} вирусных частиц на мышь) либо посредством Ad26.FLuc или BLY6.FLuc (оба в количестве 10^{10} вирусных частиц на мышь). Мышей умерщвляли спустя восемь недель и собирали образцы крови и спленциты (фигура 2A). Оценивали различные иммунные параметры так, как описано ниже.

[00126] Проводили анализ нейтрализации вируса для оценки способности BLY6.RSVF-2A-GLuc индуцировать выработку нейтрализующих респираторно-синцитиальный вирус антител. На фигуре 2B показаны титры VNA для респираторно-синцитиального вируса штамма A2 (RSV A2), измеренные для образцов сыворотки крови, собранных через восемь недель после иммунизации. Каждая точка обозначает одну мышь; столбцы обозначают среднее по группе, а пунктирная линия соответствует нижнему пределу количественного определения (LLOQ=6,88; средний конечный титр линейных образцов). Из результатов видно, что иммунизации дозой 10^{10} в. ч. BLY6.RSVF-2A-GLuc приводили к более высоким титрам нейтрализации RSV A2, чем титры, которые определяли для эталонного вектора Ad26, кодирующего тот же антиген. Титры в отношении BLY6.RSVF-2A-GLuc обнаруживали в основном при самой высокой дозе, использованной для иммунизации, составляющей 10^{10} в. ч. Как и ожидалось, не обнаруживали специфических в отношении RSV A2 ответов на аденовекторы, кодирующие люциферазу светлячка.

[00127] Индукцию клеточного иммунитета к кодируемому вектором антигену оценивали с помощью анализа ELISPOT, специфичного в отношении RSV-F_{A2}. С этой целью через восемь недель после иммунизации выделяли спленциты от иммунизированных мышей и стимулировали их в течение ночи 15-мерными перекрывающимися пептидами, охватывающими белок RSV-F_{A2}, и клеточные иммунные ответы определяли с помощью анализа ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток. Из данных видно, что антигенспецифические клеточные иммунные ответы, вызванные новым вектором BLY6, кодирующим RSVF-2A-GLuc, имели дозозависимый характер и для каждой дозы были схожи по величине с ответами, индуцированными эталонным вектором Ad26.RSVF-2A-GLuc (фигура 2C). Как и ожидалось, в результате измерений не было обнаружено специфических к RSVF-F_{A2} ответов среди спленцитов мышей, иммунизированных аденовекторами, кодирующими люциферазу светлячка.

[00128] Способность экспрессирующих RSVF-2A-GLuc векторов вызывать выработку специфических к RSV-F_{A2} антител IgG оценивали с помощью ELISA. Сыворотку крови, собранную спустя 8 недель после иммунизации у мышей, иммунизированных векторами Ad26 (положительный контроль) и BLY6, экспрессирующими трансген RSVF-2A-GLuc или люциферазу светлячка (контроль), тестировали на IgG к RSV F_{A2} посредством ELISA. В частности, с помощью данного анализа ELISA обнаруживали антитела IgG, способные связываться с рекомбинантным

стабильным белком RSV-F RSV-F_{A2} в конформации "до слияния" (pre-RSV-F). Из результатов видно, что BLY6.RSVF-2A-GLuc дозозависимым образом вызывал выработку более высоких титров специфических к pre-RSV-F антител IgG, чем в случае титров, выработка которых была индуцирована посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc (фигура 2D). Как и ожидалось, титры антител, специфичных к RSV-F_{A2}, в сыворотке крови мышей, иммунизированных векторами, кодирующими только люциферазу светлячка, обнаружены не были.

[00129] В целом, из данных видно, что вектор BLY6 индуцировал сильные клеточный и гуморальный иммунные ответы на кодируемые антигены, которые были схожи или характеризовались более высоким уровнем, чем ответы, которые индуцировались эталонным вектором на основе HAdV-26. Эти иммунные ответы четко указывали на сильную иммуногенность вектора BLY6 у мышей.

Пример 4. Оценка серологической перекрестной нейтрализации среди новых и существующих аденовирусных векторов

Для обеспечения своей потенциальной применимости в качестве новых аденовирусных вакцинных векторов новые аденовирусные векторы BLY6, созданные в соответствии с настоящим документом, предпочтительно будут серологически отличаться от существующих аденовирусных векторов, которые в настоящее время уже находятся в разработке в качестве вакцинных векторов, таких как векторы на основе аденовируса человека серотипов HAdV-5 и HAdV-35. Поэтому проводили тесты перекрестной нейтрализации среди новых аденовирусных векторов BLY6 и нескольких существующих векторов на основе HAdV-4, HAdV-5, HAdV-26, HAdV-35 и HAdV49. С этой целью антисыворотку мышей, каждая из которых была индуцирована в ответ на один из этих аденовирусных векторов, тестировали в отношении каждого из данных различных векторов в анализе нейтрализации аденовируса. Антисыворотку мышей, применяемую для этого анализа, собирали у мышей Balb/C через две или восемь недель после их иммунизации посредством 10^{10} векторных частиц на мыш. Анализ нейтрализации аденовируса проводили так, как описано ранее (Spangers et al 2003. J.Clin. Microbiol. 41:5046-5052). Вкратце, начиная с разведения 1:16, сыворотку крови серийно разводили в 2 раза, затем предварительно смешивали с аденовирусными векторами, экспрессирующими люциферазу светлячка (FLuc), а затем инкубировали в течение ночи с клетками A549 (при множественности инфицирования, составляющей 500 вирусных частиц на клетку). Уровни активности люциферазы в лизатах инфицированных клеток, измеренные через 24 часа после инфицирования, представляли собой эффективность инфицирования вектором. Титры нейтрализации к данному вектору определяли как наибольшее разведение сыворотки, способное понижать эффективность инфицирования вектором на 90%. Титры нейтрализации условно разделяли на следующие категории: <16 (нейтрализация отсутствовала), 16-200, 200-2000 и >2000. Из результатов видно отсутствие значительной перекрестной нейтрализации среди протестированных векторов (фигура 3). Между векторами BLY6 и Ad26 наблюдали лишь небольшую одностороннюю

перекрестную нейтрализацию, при этом антисыворотка BLY6 демонстрировала титр нейтрализации в отношении Ad26, составляющий 16,12 (т. е. чуть выше нижнего предела обнаружения, составляющего 16), а в случае антисыворотки Ad26 титр нейтрализации в отношении BLY6 не наблюдали. Таким образом, новый аденовирусный вектор BLY6 не демонстрировал перекрестную нейтрализацию или демонстрировал лишь очень слабую перекрестную нейтрализацию с векторами на основе аденовируса человека, включенными в тестируемую панель, т. е. Ad26, Ad35, Ad49, Ad5 и Ad4. Следовательно, данный вектор потенциально можно применять в сочетании с одним или несколькими из этих или других отдельных аденовирусных векторов при последовательных иммунизациях, например, в контексте режима гетерологичной "прайм-буст" вакцинации или, альтернативно или дополнительно, в контексте серии двух или более последовательных режимов вакцинации против различных заболеваний или антигенов.

Пример 5. Серопревалентность новых аденовирусных векторов в популяциях людей

Важным для их потенциального применения в качестве эффективных вакцинных векторов является то, что описанные в данном документе новые аденовирусные векторы не сдерживаются высокими уровнями предсуществующего противовекторного гуморального иммунитета в целевых для вакцины популяциях. По этой причине вектор BLY6 оценивали на его серопревалентность в образцах сыворотки крови, полученных от группы из 200 взрослых человек в возрасте от 18 до 55 лет, проживающих в Соединенных Штатах (США) и Европейском союзе (ЕС). Вектор тестировали в отношении нейтрализации образцами сыворотки крови человека, проводя стандартный анализ нейтрализации аденовируса, который проводили в примере 3 и который был описан ранее (Spangers et al 2003. J.Clin. Microbiol. 41:5046-5052). Вкратце, начиная с разведения 1:16, сыворотку крови серийно разводили в 2 раза, затем предварительно смешивали с аденовирусными векторами, экспрессирующими люциферазу светлячка (FLuc), а затем инкубировали в течение ночи с клетками A549 (при множественности инфицирования, составляющей 500 вирусных частиц на клетку). Уровни активности люциферазы в лизатах инфицированных клеток, измеренные через 24 часа после инфицирования, представляли собой эффективность инфицирования вектором. Титры нейтрализации к данному вектору определяли как наибольшее разведение сыворотки, способное понизить эффективность инфицирования вектором на 90%. Титры нейтрализации условно разделяли на следующие категории: <16 (нейтрализация отсутствовала), 16-300, 300-1000, 1000-4000 и >4000.

Из результатов видно, что аденовирусный вектор BLY6 характеризовался значительно меньшей серопревалентностью у исследованных субъектов-людей, чем контрольный вектор Ad5 и эталонные векторы Ad26 и Ad35 (фигура 4). Более того, положительные титры нейтрализации, которые наблюдали в отношении новых векторов BLY6, были, в целом, довольно низкими, в основном не выше 300. Напротив, большинство обнаруженных положительных титров нейтрализации к Ad26 и Ad5 превышали 300.

[00130] В целом, приведенные выше данные указывали на то, что предсуществующий гуморальный противовекторный иммунитет к векторам BLY6 можно считать низким в оцененных целевых для вакцины популяциях, что позволяло предположить, что эти векторы потенциально могут являться эффективными вакцинными векторами в этих популяциях.

Пример 6. Продуктивность аденовирусного вектора в суспензии клеток PER.C6

[00131] Аденовирусные векторы, подлежащие применению в клинических испытаниях и за их пределами, должны предусматривать легкое получение высоких титров в масштабируемой бессывороточной платформе для получения аденовирусов. Такой платформой являются адаптированные к суспензии клетки PER.C6®, также называемые данным документе суспендированными клетками PER.C6 или sPER.C6, поскольку было показано, что они поддерживают крупномасштабное производство аденовирусных векторов в биореакторах, обеспечивая большие количества препаратов клинического класса на основе векторов с высоким титром, например предусматривающих делецию E1 векторов на основе HAdV-26 или HAdV-35 (EP 2536829 B1, EP 2350268 B1).

[00132] В качестве первоначальной оценки того, будут ли описанные в данном документе новые векторы подходить для способов производства на основе клеток sPER.C6, проводили мелкомасштабные эксперименты по изучению продуктивности вектора на клетках sPER.C6, культивируемых в шейкерных колбах. Такие эксперименты по изучению продуктивности проводили с помощью кодирующей Fluc версии нового вектора Ad BLY6, описанного в примере 1. В качестве эталонного контроля использовали вектор Ad26.Fluc на основе HAdV-26. Суспензию культур клеток PER.C6, высеванных в шейкерные колбы с плотностью 1×10^6 клеток/мл в общем объеме 10 мл среды PERMEXCIS® (доступной от Lonza) с добавлением 4 mM L-глутамина (Lonza), инфицировали различными векторами с различными отношениями вирусных частиц (в. ч.) на клетку, а затем инкубировали в течение 4 дней. Различные отношения в. ч. на клетку, применяемые для инфицирования, составляли 70, 150 и 900. Каждый день собирали образцы инфицированных культур клеток и определяли титры в. ч. в этих образцах с помощью протокола на основе количественной ПЦР (qPCR), который предусматривал использование праймеров и зонда, специфичных к промотору CMV (который присутствовал во всех протестированных векторах). Этот протокол предусматривал обработку ДНКазой тестируемых образцов перед проведением qPCR для удаления любой свободной векторной ДНК (т. е. векторных геномов, которые не были упакованы в вирусные частицы).

Результаты в отношении продуктивности, полученные для нового вектора BLY6.Fluc, показаны на фигуре 8. Для BLY6.Fluc наблюдали более высокие титры в. ч., чем для эталонного контрольного вектора Ad26.Fluc, при всех протестированных отношениях инфицирования в. ч. на клетку и во всех протестированных моментах

времени, когда производили сбор материала. Эти результаты демонстрировали хорошую продуктивность нового вектора BLY6 в модели бессывороточной суспензионной клеточной культуры на основе sPER.C6.

В совокупности, результаты исследований гуморального и клеточного иммунных ответов, индуцированных новыми рекомбинантными аденовирусными векторами на основе BLY6 по настоящему изобретению, которые представлены выше, ясно указывали на сильную иммуногенность этих векторов у мышей. Кроме того, было продемонстрировано, что векторы не индуцировали или индуцировали лишь в крайне незначительной степени перекрестные ответы нейтрализующих антител в отношении определенных существующих векторов-кандидатов аденовирусных вакцин (например, Ad26 и Ad35) или наоборот. Более того, для новых векторов наблюдали низкую серопревалентность у людей. Наконец, новые векторы можно легко получать с высокими показателями выхода. Сочетание низкой серопревалентности, высокой иммуногенности и продуктивности позволяет предположить, что новые аденовирусные векторы по настоящему изобретению могут быть пригодны в качестве новых кандидатов на вакцинный вектор к различным патогенам и дополнительно могут быть применимы в генной терапии и/или диагностике.

[00133] Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отступления от их общего изобретательского замысла. Таким образом, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предусматривает охват модификаций в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенных настоящим раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид гексона или его функциональное производное, включающие полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 или аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1.

2. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.1, где полипептид гексона включает полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1.

3. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.2, где полипептид гексона или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

4. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры или его функциональное производное.

5. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.4, где полипептид фибры включает по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из (1) полипептидной последовательности головки фибры, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, (2) полипептидной последовательности ножки фибры, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и (3) полипептидной последовательности хвостовой части фибры, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, при этом предпочтительно полипептид фибры или его функциональное производное содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична по всей своей длине аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3.

6. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид фибры, включающий по меньшей мере одну последовательность, выбранную из группы, состоящей из (1) полипептидной последовательности головки фибры, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10; (2) полипептидной последовательности ножки фибры, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11; и (3) полипептидной последовательности хвостовой части фибры, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

7. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.6, где полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

8. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-7.

9. Вектор по п.8, представляющий собой аденовирусный вектор и дополнительно

содержащий трансген.

10. Аденовирусный вектор по п. 9, где аденовирусный вектор дополнительно включает по меньшей мере одну из делеции E1 и делеции E3.

11. Аденовирусный вектор по п.9 или п.10, где аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты аденовируса человека, при этом предпочтительно последовательности нуклеиновой кислоты аденовируса человека происходят из по меньшей мере одного из аденовируса-4 человека, аденовируса-5 человека, аденовируса-26 человека или аденовируса-35 человека.

12. Аденовирусный вектор по любому из пп. 9-11, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14.

13. Рекомбинантная клетка, содержащая вектор по любому из пп. 8-12.

14. Способ получения вектора, включающий:

выращивание рекомбинантной клетки по п.13 в условиях, обеспечивающих продуцирование вектора; и

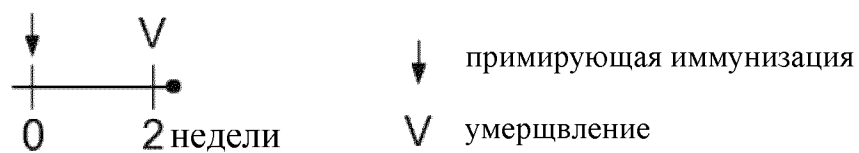
выделение вектора из рекомбинантной клетки.

15. Иммуногенная композиция, содержащая аденовирусный вектор по любому из пп. 9-12.

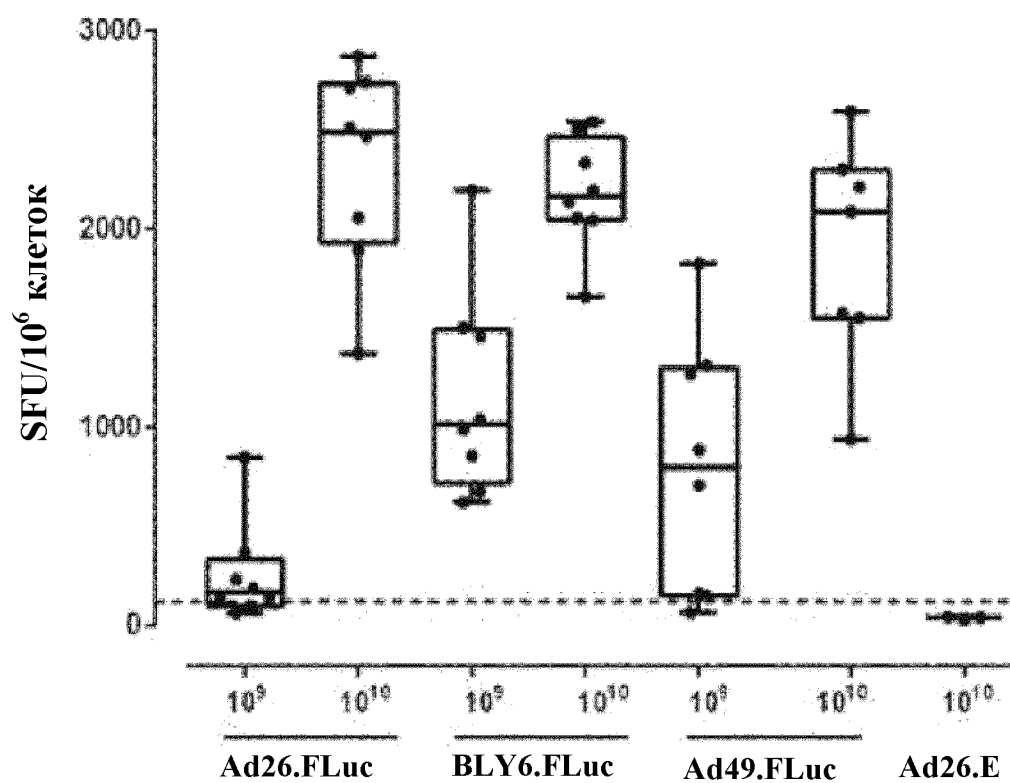
16. Способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по п.15.

17. Способ получения вакцины, включающий комбинирование аденовирусного вектора по любому из пп. 9-12 с фармацевтически приемлемым носителем.

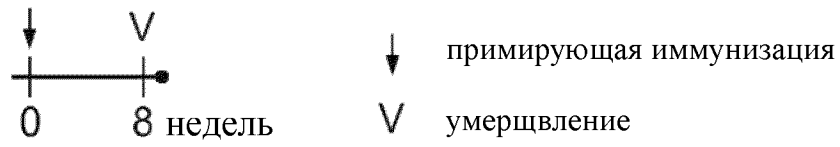
По доверенности



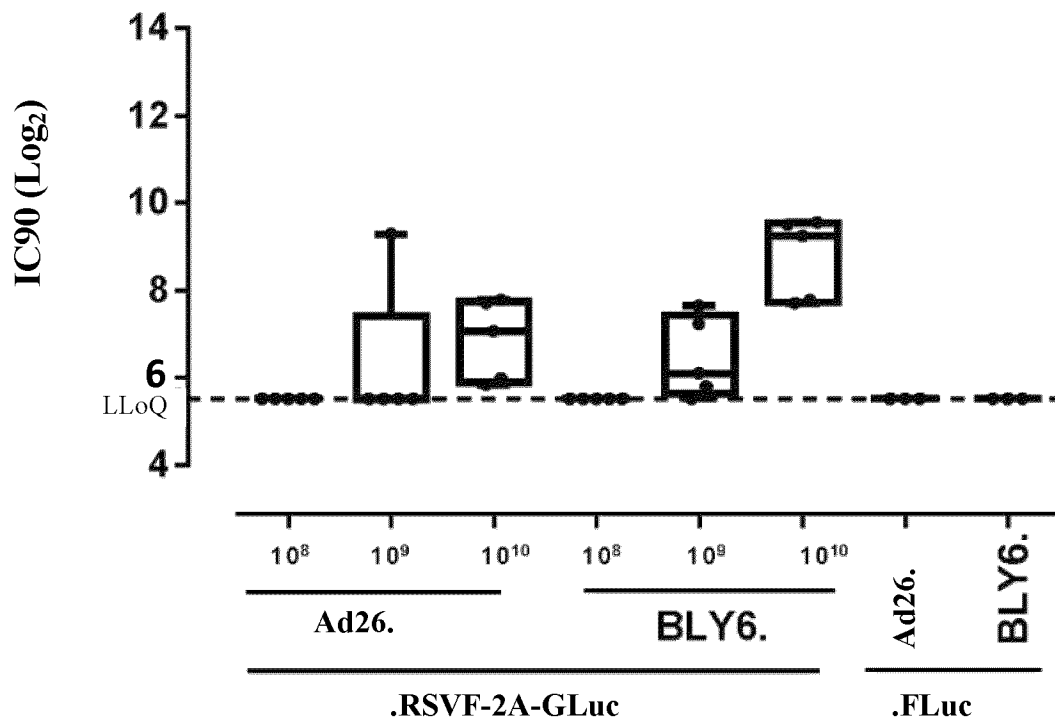
Фиг. 1А



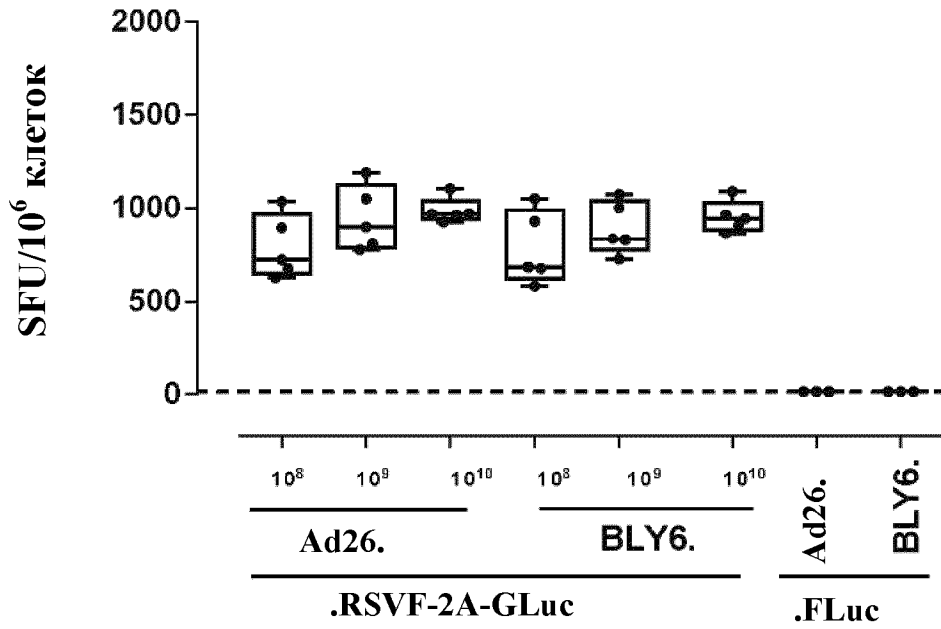
Фиг. 1В



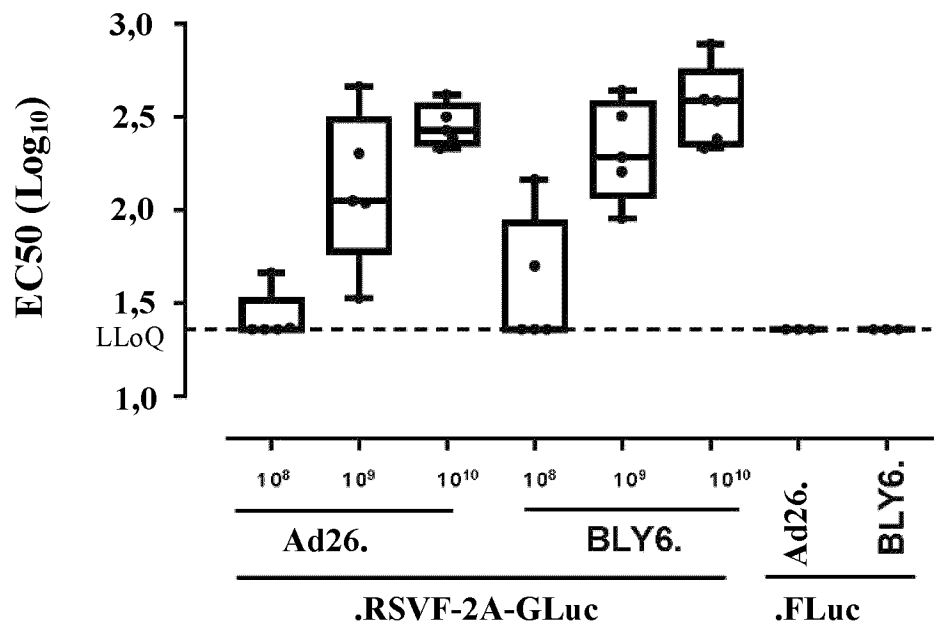
Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 2D

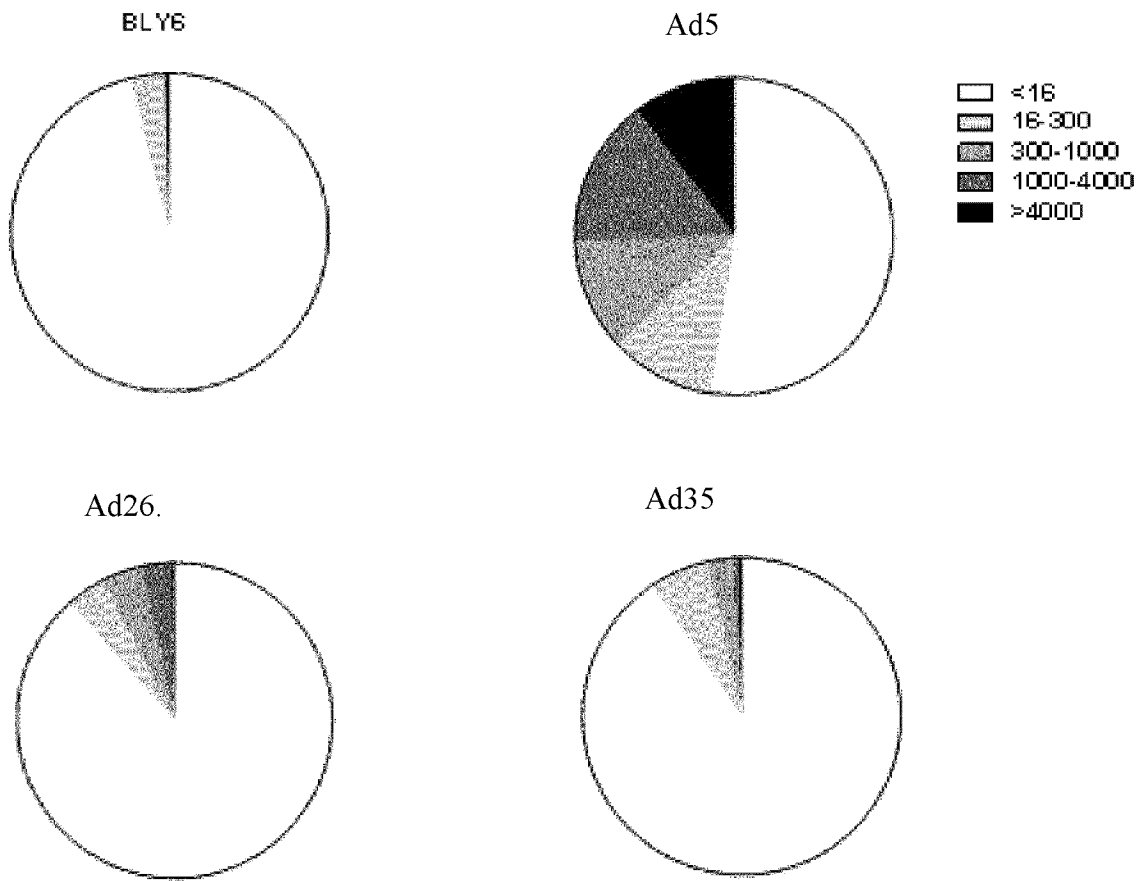
		Аденовирусные векторы					
		Ad35 (B)	Ad26 (D)	Ad49 (D)	Ad5 (C)	Ad4 (E)	BLY6 (E)
Образцы сыворотки крови*	Ad35 (B)	13384	<16	<16	<16	<16	<16
	Ad26 (D)	<16	2786	<16	<16	<16	<16
	Ad49 (D)	<16	<16	893	<16	<16	<16
	Ad5 (C)	<16	<16	<16	6007	<16	<16
	Ad4 (E)	<16	<16	<16	<16	1914	<16
	BLY6 (E)	<16	16,12	<16	<16	<16	15

*Образцы сыворотки крови, полученные от мышей, иммунизированных с помощью указанных серотипов

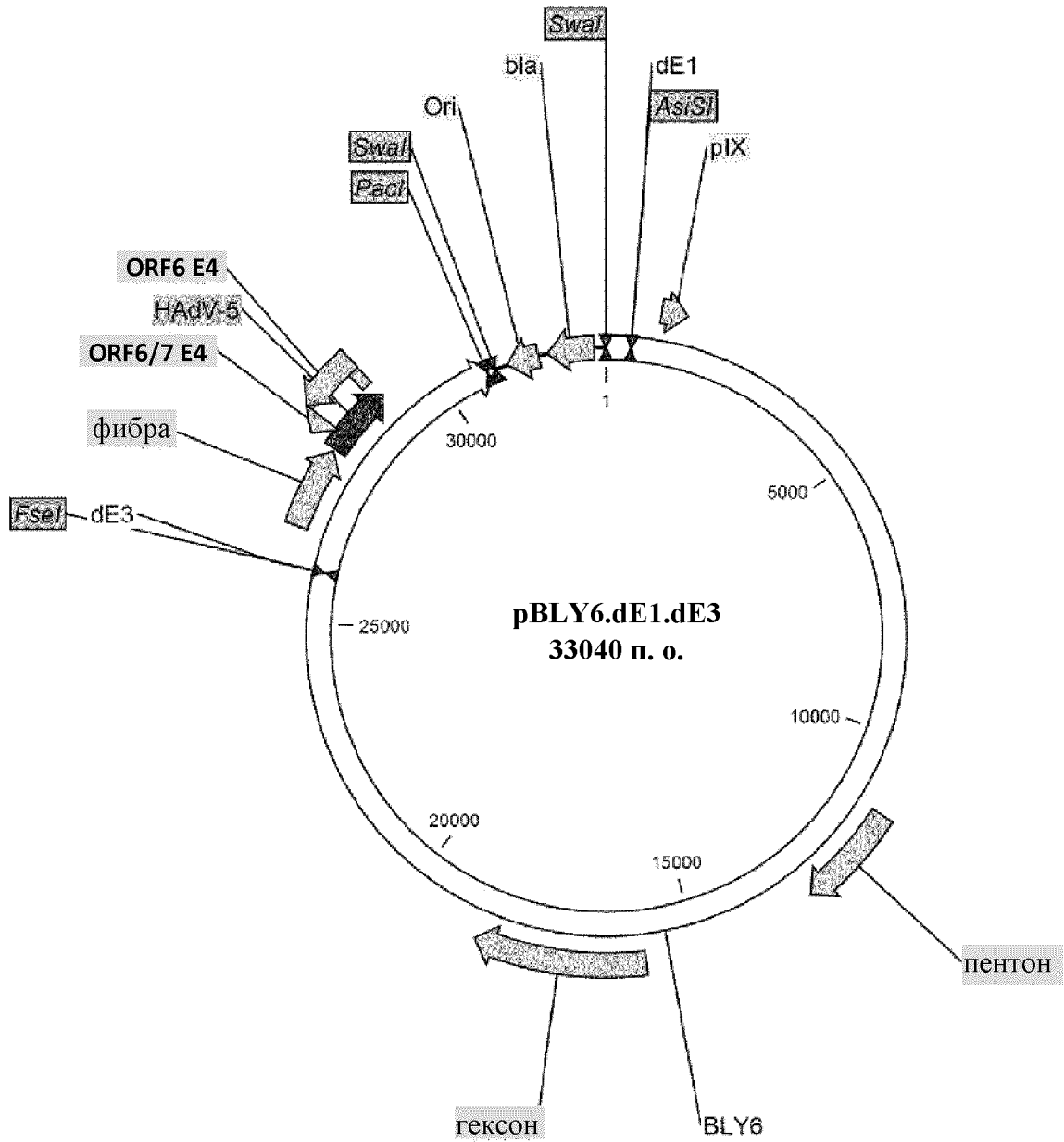
Значения

<16	Нейтрализация отсутствует
16 - 200	Слабая нейтрализация
200 - 2000	Нейтрализация
>2000	Сильная нейтрализация

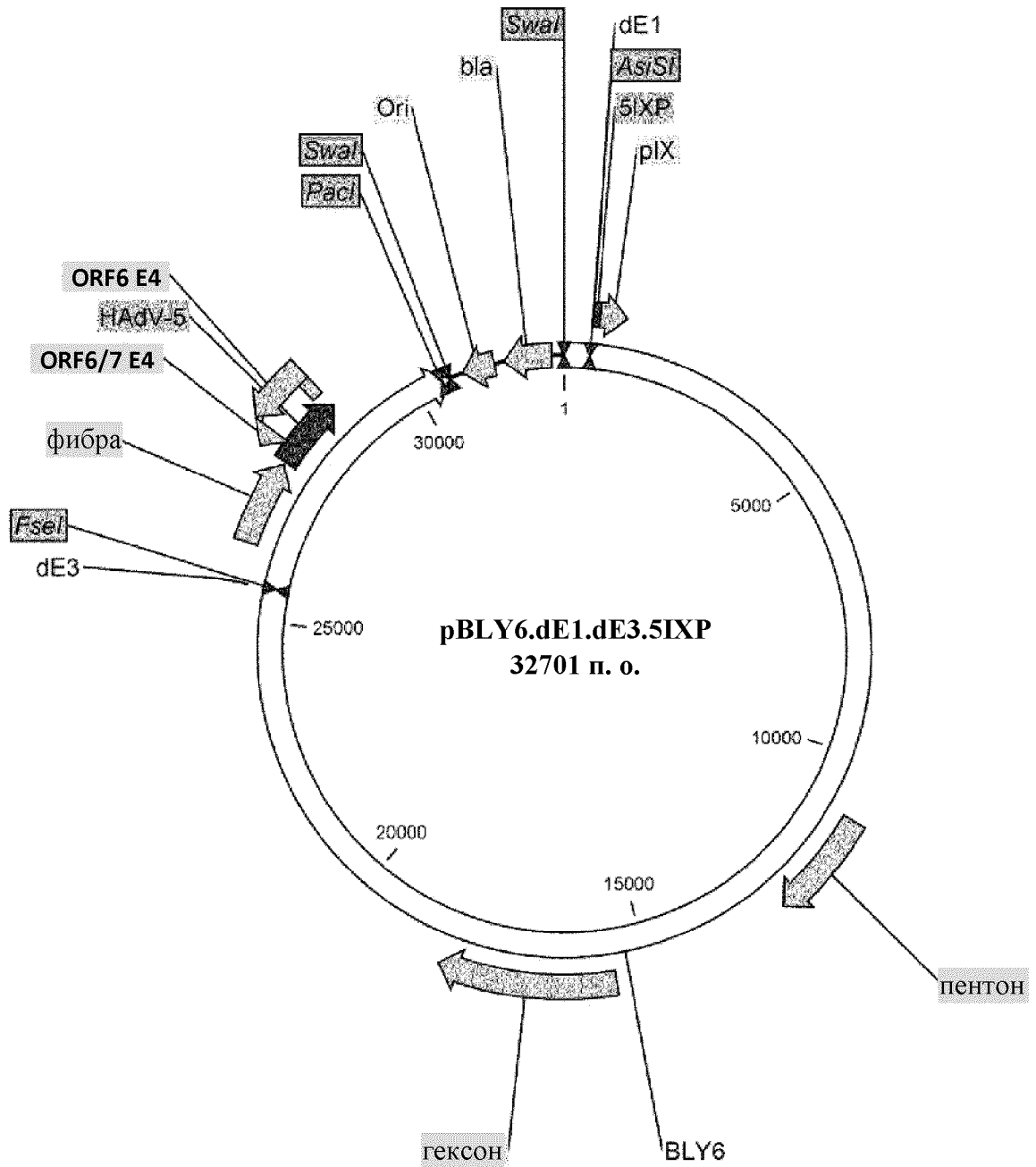
Фиг. 3



Фиг. 4

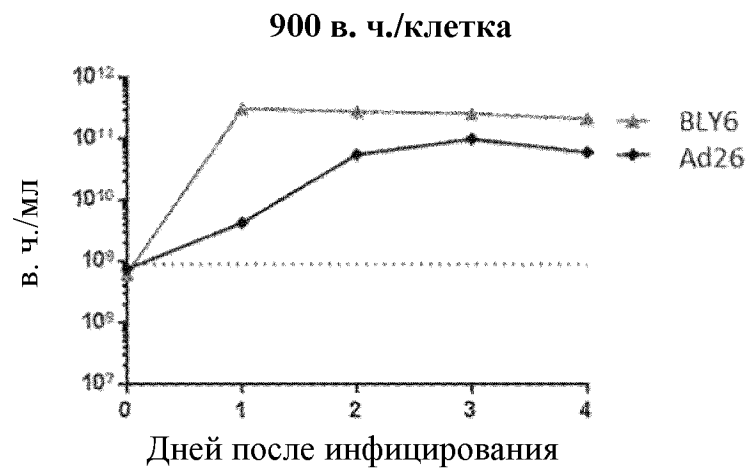
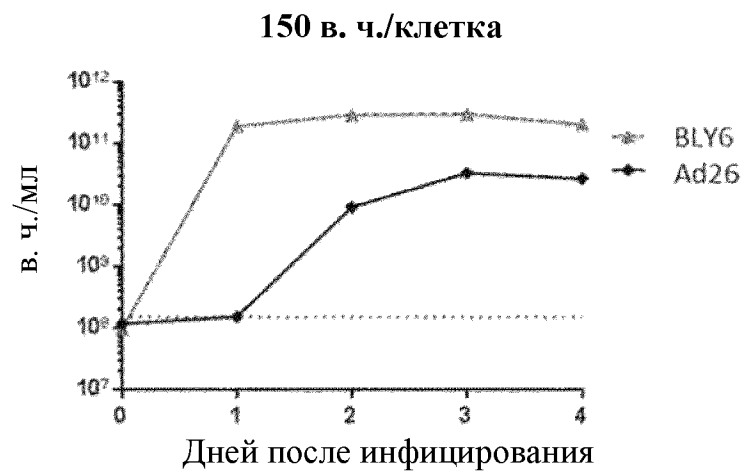
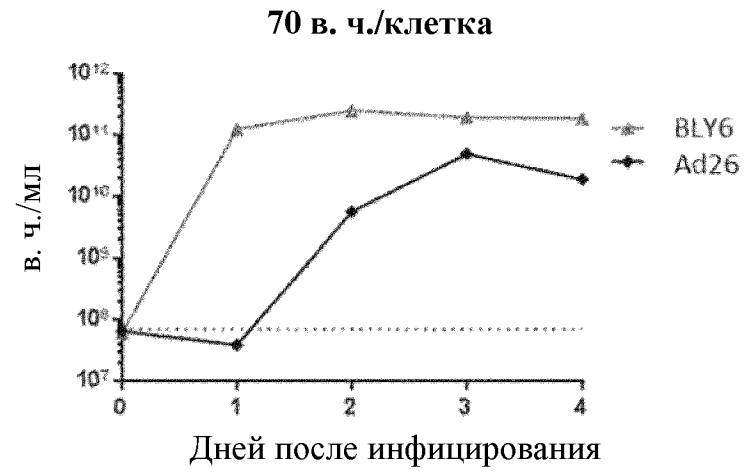


Фиг. 5



Фиг. 6

		20		40		60		80	
BLY6	MATPSMLPQW	AYMHIAGQDA	SEYLSPLGLVQ	FARATDTYFN	LGNKFRNPTV	APTHDVTDDR	SQRLTLRFVP	VDREDNTYSY	80
SAdV-30-1	MATPSMLPQW	AYMHIAGQDA	SEYLSPLGLVQ	FARATDTYFS	LGNKFRNPTV	APTHDVTDDR	SQRLTLRFVP	VDREDNTYSY	80
		100		120		140		160	
BLY6	KVRYTLAVGD	NRVLDMASTY	FDIRGVLDGR	PSFKPYSGTA	YNSLAPKCAP	NSSQWQOKEN	NGQGD AK HTH	YGVAATGGID	160
SAdV-30-1	KVRYTLAVGD	NRVLDMASTY	FDIRGVLDGR	PSFKPYSGTA	YNSLAPKCAP	NSSQW EQ NEN	NGQGD AK HTH	YGVAAMGGID	160
		180		200		220		240	
BLY6	IDKNGLQIGI	DETKEDNNEI	YADKTFQPEP	QIGEENWQDS	ENY Y GGRALK	RET K MKPCYG	SFARPTNAKG	GQAKIKPAQE	240
SAdV-30-1	ITKEGLQIGI	DASKEDDNEI	YADETYQPEP	QIGEENWQDT	ENFYGGRALK	KDT K MKPCYG	SFARPTNVKG	GQAKVKITEE	239
		260		280		300		320	
BLY6	GQQSIDYDID	LAFDIPSTG	GGNGTNVND	KPDMVMYTEN	VNLETPDTHI	VYKPGTSDDS	SEANLTQQAM	ANRPNYIGFR	319
SAdV-30-1	NVQSIFEDID	LAFDIPSTG	IGSNGTNVND	KPDMVMYTEN	VNLETPDTHI	VYKPGTSDDS	SEANLCQQAM	ANRPNYIGFR	317
		340		360		380		400	
BLY6	DNFIGVMYYN	STGNMGVLAG	QASQLNAVVD	LQDRNTELSY	QLLLDSLGR	TRYFSMWNQA	VDSYDPDVR	IENHGVEDEL	399
SAdV-30-1	DNFIGIMYYN	STGNMGVLAG	QASQLNAVVD	LQDRNTELSY	QLLLDSLGR	TRYFSMWNQA	VDSYDPDVR	IENHGVEDEL	397
		420		440		460		480	
BLY6	PNYCFPLDGA	GTNAVYQGVK	TKEDNNGEWE	TDTNVASQNG	ICKGNIYAME	INLQANLWRS	FLYSNVALYL	PDSYKYTPSN	479
SAdV-30-1	PNYCFPLDGA	GTNAVYQGVK	EKIGNNGEWE	ADTNVASQNG	ICKGNIYAME	INLQANLWRS	FLYSNVALYL	PDSYKYTPAN	477
		500		520		540		560	
BLY6	YTLPTNTNTY	DYMNGRVVSP	SLVDAYINIG	ARWSLDAMDN	VNPFNHHRNA	GLRYSMLLG	NGRYVPFHIQ	VPQKFFAIKN	559
SAdV-30-1	YTLPTNTNTY	DYMNGRVVSP	SLVDAYINIG	ARWSLDAMDN	VNPFNHHRNA	GLRYSMLLG	NGRYVPFHIQ	VPQKFFAIKS	557
		580		600		620		640	
BLY6	LLLLPGSYTY	EWNFRKDVNM	ILQSSLGNDL	RTDGA T IQYT	SINLYATFFP	MAHNTASTLE	AMLRNDTNDQ	SFNDYLSAAN	639
SAdV-30-1	LLLLPGSYTY	EWNFRKDVNM	ILQSSLGNDL	RTDGA S ISFT	SINLYATFFP	MAHNTASTLE	AMLRNDTNDQ	SFNDYLSAAN	637
		660		680		700		720	
BLY6	MLYPIPANAT	NVPISIPSRN	WAAFRGWSFT	RLKTKETPSL	GSGFDPYFVY	SGSIPYLDGT	FYLNHTFKKV	SIMFDSSVSW	719
SAdV-30-1	MLYPIPANAT	NVPISIPSRN	WAAFRGWSFT	RLKTKETPSL	GSGFDPYFVY	SGSIPYLDGT	FYLNHTFKKV	SIMFDSSVSW	717
		740		760		780		800	
BLY6	PGNDRLLTPN	EFEIKRTVDG	EGYNVAQCNM	TKDWFLVQML	SHYNI G YQGF	YVPEGYKDRM	YSFFRNFPQM	SRQVV D VNY	799
SAdV-30-1	PGNDRLLTPN	EFEIKRTVDG	EGYNVAQCNM	TKDWFLVQML	AHYNI G YQGF	YVPEGYKDRM	YSFFRNFPQM	SRQVV D VNY	797
		820		840		860		880	
BLY6	KDYMAVTLAY	QHNSGFVGY	LAPTMRQQQP	YPANYPYPLI	GK I AVNSVTQ	KKFLCDRVMW	RIPFSSNFMS	MGALTDLGQN	879
SAdV-30-1	KDYQAVTLAY	QHNSGFVGY	LAPTMRQQQP	YPANYPYPLI	GK S AVNSVTQ	KKFLCDRVMW	RIPFSSNFMS	MGALTDLGQN	877
		900		920		940			
BLY6	MLYANSAHAL	DMNFEVDPMD	ESTLLYVVFE	VFDVVRVHQP	HRGVIEAVYL	RTPFSAGNAT	T	940	
SAdV-30-1	MLYANSAHAL	DMNFEVDPMD	ESTLLYVVFE	VFDVVRVHQP	HRGVIEAVYL	RTPFSAGNAT	T	938	



Фиг. 8