

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091104 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.12

(22) Дата подачи заявки
2018.10.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/761* (2015.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) АДЕНОВИРУС И ПУТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 17199347.0

(32) 2017.10.31

(33) EP

(86) PCT/EP2018/079704

(87) WO 2019/086450 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 нуклеиновой кислоты аденовируса и аденовирусным векторам, содержащим указанные последовательности нуклеиновой кислоты. Аденовирусные векторы по изобретению можно использовать для индукции защитного иммунного ответа у субъекта.

202091104

A1

A1

202091104

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562320ЕА/045

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 выделенной нуклеиновой кислоты. Последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодируют

полипептид фибры, характеризующийся по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2). В определенных вариантах осуществления последовательность выделенной нуклеиновой кислоты дополнительно предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты гексона, кодирующую полипептид гексона, содержащий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0006] Также настоящим изобретением предусмотрены последовательности выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0007] Вариантами осуществления настоящего изобретения также предусмотрены выделенные полипептиды фибры и гексона, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты фибры и гексона по настоящему изобретению.

[0008] В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, 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. 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.

[0009] 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.

[0010] 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.

[0011] Дополнительно предусмотрены аденовирусные векторы, содержащие (a) по меньшей мере один сайт вставки трансгена и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, причем полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2). В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0012] Дополнительно настоящим изобретением предусмотрены аденовирусные векторы, содержащие (a) по меньшей мере один сайт вставки трансгена и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, при этом полипептид гексона предусматривает полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0013] 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).

[0014] В определенных вариантах осуществления сайт вставки трансгена расположен в участке, прилегающем к инвертированному концевому повтору (ITR). В определенных вариантах осуществления трансген вставлен в один или несколько сайтов вставки трансгена, выбранных из группы, состоящей из сайта вставки трансгена, расположенного в области делеции E1 или прилегающего к ней, сайта вставки трансгена, расположенного в области делеции E3 или прилегающего к ней, и сайта вставки трансгена, прилегающего к ITR, например, между областью E4 и правым ITR (RITR).

[0015] В определенных вариантах осуществления аденовирусные векторы, предусмотренные настоящим изобретением, содержат последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:55.

[0016] 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

[0017] 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.

[0018] На фигуре 1 показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные BB21.FLuc и BB24.FLuc. На фигуре 1A показана схема эксперимента, причем эту схему также использовали для экспериментов, показанных на фигуре 2 и фигуре 3. На фигуре 1B показан график клеточных иммунных ответов, индуцированных Ad26.FLuc, BB21.FLuc и BB24.FLuc, развившихся 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 спленоцитов, а пунктирной линией обозначено значение 95% процентиля для средовых стимуляторов.

[0019] На фигуре 2 показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad4Ptr13-BB21.FLuc и Ad4.FLuc. На графике показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad26.FLuc, Ad4Ptr13-BB21.FLuc и Ad4.FLuc, развившиеся против кодируемого вектором антигена (т. е. Fluc), как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ .

[0020] На фигуре 3 показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad4Ptr01-BB24.FLuc. На графике показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad26.FLuc и Ad4Ptr01-BB24.FLuc, развившиеся против кодируемого вектором антигена (т. е. Fluc), как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ .

[0021] На фигуре 4 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BB21.RSVF-2A-GLuc. На фигуре 4A показана схема эксперимента, причем эту схему также использовали для экспериментов, показанных на фигуре 5 и фигуре 6. На фигуре 4B показаны результаты анализа нейтрализации респираторного-синцитиального вируса (VNA), проведенного через восемь недель после иммунизации Ad26.RSVF-2A-GLuc и BB21.RSVF-2A-GLuc в трех различных концентрациях (10^8 , 10^9 и 10^{10} в. ч.) или Ad26.FLuc и BB21.FLuc в количестве 10^{10} в. ч. На графике изображены титры VNA в отношении штамма A2 респираторно-синцитиального вируса (RSV A2), рассчитанные как конечные показатели титра ($\log_2$). На фигуре 4C показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc и BB21.RSVF-2A-GLuc, против кодируемого вектором антигена RSV F, как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ . На фигуре 4D показан график титров RSV F-специфичных связывающих антител IgG, индуцированных Ad26.RSVF-2A-GLuc или BB21.RSVF-2A-GLuc в сыворотке крови иммунизированных мышей через 8 недель после иммунизации. На графике изображены титры по результатам ELISA с IgG, рассчитанные как конечные показатели титра ($\log_{10}$).

[0022] На фигуре 5 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BB24.RSVF-2A-GLuc. На фигуре 5A показаны результаты анализа нейтрализации респираторного-синцитиального вируса (VNA), проведенного через восемь недель после иммунизации Ad26.RSVF-2A-GLuc, BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad48.RSVF-2A-GLuc в трех различных концентрациях (10^8 , 10^9 и 10^{10} в. ч.) или Ad26.FLuc, BB24.FLuc и Ad48.FLuc в количестве 10^{10} в. ч. На графике изображены титры VNA в отношении RSV A2, рассчитанные как конечные показатели титра ($\log_2$). На фигуре 5B показан клеточный иммунный ответ, индуцированный посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc, BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad48.RSVF-2A-GLuc, против кодируемого вектором антигена RSV F, как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ . На фигуре 5C показан график титров RSV F-специфичных связывающих антител

IgG, индуцированных Ad26.RSVF-2A-GLuc, BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad48.RSVF-2A-GLuc в сыворотке крови иммунизированных мышей через 8 недель после иммунизации. На графике изображены титры по результатам ELISA с IgG, рассчитанные как конечные показатели титра ($\log_{10}$).

[0023] На фигуре 6 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc. На фигуре 6А показаны результаты анализа нейтрализации респираторного-синцитиального вируса (VNA), проведенного через восемь недель после иммунизации Ad26.RSVF-2A-GLuc, Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc в трех различных концентрациях (10^8 , 10^9 и 10^{10} в. ч.) или Ad26.FLuc, Ad4Ptr01-BB24.FLuc и Ad4Ptr13-BB21.FLuc в количестве 10^{10} в. ч. На графике изображены титры VNA в отношении RSV A2, рассчитанные как конечные показатели титра ($\log_2$). На фигуре 6В показан клеточный иммунный ответ, индуцированный посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc, Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc, против кодируемого вектором антигена RSV F, как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ . На фигуре 6С показан график титров RSV F-специфичных связывающих антител IgG, индуцированных Ad26.RSVF-2A-GLuc, Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc в сыворотке крови иммунизированных мышей через 8 недель после иммунизации. На графике изображены титры по результатам ELISA с IgG, рассчитанные как конечные показатели титра ($\log_{10}$).

[0024] На фигуре 7 показаны титры нейтрализации гомологичных и гетерологичных аденовирусов, индуцированные у мышей, иммунизированных аденовирусными векторами Ad4, Ad5, Ad26, Ad35, Ad49, BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24.

[0025] На фигуре 8 показана серопревалентность для Ad5, Ad26, BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 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.

[0026] На фигуре 9 показана схема плазмиды pBB21.dE1.dE3 (SEQ ID NO:13).

[0027] На фигуре 10 показана схема плазмиды pBB21.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:14).

[0028] На фигуре 11 показана схема плазмиды pBB24.dE1.dE3 (SEQ ID NO:15).

[0029] На фигуре 12 показана схема плазмиды pBB24.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:16).

[0030] На фигуре 13 показана схема плазмиды pAd4.5orf6 (SEQ ID NO:18).

[0031] На фигуре 14 показана схема плазмиды pAd4.Ptr01.BB24.5orf6 (SEQ ID NO:21).

[0032] На фигуре 15 показана схема плазмиды pAd4.Ptr13.BB21.5orf6 (SEQ ID NO:22).

[0033] На фигуре 16 показаны результаты выравнивания фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта фибры BB21 (SEQ ID NO:58) и фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[0034] На фигуре 17 показана продуктивность в отношении новых векторов BB21.Fluc и BB24.Fluc в линии клеток-продуцентов sPER.C6.

[0035] На фигуре 18 показана продуктивность в отношении новых содержащих химерный капсид векторов Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 в линии клеток-продуцентов sPER.C6.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0036] Настоящее изобретение основано, по меньшей мере отчасти, на выделении и идентификации новых изолятов аденовирусов шимпанзе, отнесенных к аденовирусам человека вида C, а также на создании и оценке вакцинных векторов, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области полипептидов гексона и фибры аденовируса шимпанзе. Настоящее изобретение дополнительно основано, по меньшей мере отчасти, на создании химерных аденовирусных векторов, содержащих остов аденовируса человека и по меньшей мере одну из полипептидных последовательностей химерного гексона или химерной фибры либо полипептидных последовательностей гексона или фибры аденовируса шимпанзе. 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.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] 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.

[0040] 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.

[0041] 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.

[0042] 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).

[0043] 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, удовлетворяющий требованию термина "и/или".

[0044] 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.

[0045] 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.

[0046] 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.

[0047] Слова "правый", "левый", "нижний" и "верхний" обозначают направления на графических материалах, на которые делается ссылка.

[0048] 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.

[0049] 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.

[0050] 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.

[0051] 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 гомологичного 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)).

[0052] 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.

[0053] 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)).

[0054] 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.

[0055] 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.

[0056] 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.

[0057] 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.

[0058] 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

[0059] 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.

[0060] «Капсидный белок» относится к белку на капсиде аденовируса (например, BB21, BB24, 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 BB21 и фибра BB21, гексон BB24 и фибра BB24, гексон PrtoAdV-1 и вариант фибры BB21, гексон PtroAdV-13 и фибра BB24 и т. д.).

[0061] "Полипептид гексона" относится к гексоновым белкам оболочки аденовируса, их функциональным фрагментам и производным.

[0062] "Полипептид фибры" относится к белкам фибры аденовируса, их функциональным фрагментам и производным.

[0063] 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 шимпанзе, может позволить сконструировать аденовирусные векторы, которые были бы менее восприимчивы к нейтрализации антителами, обычно встречающимися у людей.

[0064] 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 аденовируса шимпанзе, 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.

[0065] Настоящим изобретением предусмотрены выделенные и химерные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды гексона и/или полипептиды фибры, полученные из выделенных серотипов аденовирусов человека и обезьян, и аденовирусные векторы, содержащие по меньшей мере одну из последовательностей выделенных и/или химерных нуклеиновых кислот.

[0066] "Аденовирусный вектор" относится к рекомбинантному вектору, полученному по меньшей мере из части аденовирусного генома или содержащему такую часть аденовирусного генома.

[0067] В предпочтительных вариантах осуществления последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодируют полипептид фибры, характеризующийся по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодируют полипептид фибры, характеризующийся по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодируют полипептид фибры, характеризующийся по меньшей мере 98%, 99% идентичностью с SEQ ID NO:1. Полипептид фибры может, например, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2). В определенных предпочтительных вариантах осуществления

последовательность выделенной нуклеиновой кислоты дополнительно предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области полипептида гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. Полипептид гексона может, например, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0068] В предпочтительных вариантах осуществления последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодируют полипептид гексона, содержащий полипептидную последовательность, предусматривающую полипептид, охватывающий гипервариабельные области полипептида гексона, при этом полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4. В определенных вариантах осуществления полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0069] 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.

[0070] В предпочтительных вариантах осуществления предусмотрены векторы, предпочтительно аденовирусные векторы, содержащие по меньшей мере одну из последовательности выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид гексона, и/или последовательности выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид фибры, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Аденовирусные векторы могут, например, содержать по меньшей мере один сайт вставки трансгена 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 полипептида гексона, а полипептид фибры предусматривает описанный в данном документе полипептид фибры.

[0071] 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 однострунной.

[0072] 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 обезьянообразных с высоким уровнем доставки антигена и презентующей способности существующих аденовирусных векторов, таких как rAd4, rAd5, rAd26 или rAd35.

[0073] 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 A, B, C, D, E, 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.

[0074] 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 C со свойствами, сходными со свойствами аденовируса человека серотипа 5 (Ad5). В исследованиях на людях, в которых оценивали кандидатные вакцины к вирусу гепатита C (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 и WO2011/0130627.

[0075] 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.

[0076] 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-продуcentом, 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.

[0077] 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 компенсированию 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 амниоциты (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. Продуцирование аденовирусных векторов в клетках-продуцентах описано в (Kovesdi et al., 2010, Viruses 2: 1681-703).

[0078] 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).

[0079] 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 pTR. Трансген обычно функционально связан с последовательностями, контролирующими экспрессию. В предпочтительных вариантах осуществления трансген вставлен в сайт вставки трансгена.

[0080] При необходимости последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона 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.

[0081] 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 кассете экспрессии.

[0082] В предпочтительных вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:55.

[0083] Иммуногенные композиции

[0084] Иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие иммунологически эффективное количество очищенных или частично очищенных векторов на основе аденовируса человека или обезьяны (например, шимпанзе) 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.

[0085] 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.

[0086] 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, Adjuvax, PG-026, GSK-I, AS01, AS03, AS04, AS15, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, квасцы и MF59.

[0087] 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.

[0088] 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

[0089] 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.

[0090] 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.

[0091] 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, генитальный 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 лиофилизированного порошка, содержащего вакцину.

[0092] В случае внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в участок поражения вектор будет представлен в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным 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.

[0093] 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.

[0094] Иммуногенные композиции, содержащие векторы на основе аденовируса человека или обезьяны (например, шимпанзе), 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.

[0095] 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.

[0096] 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.

[0097] В одном иллюстративном режиме аденовирусный вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме от приблизительно 100 мкл до приблизительно 10 мл, содержащем концентрации приблизительно от 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.

[0098] 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.

[0099] 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.

[0100] 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

[0101] Настоящим изобретением также предусмотрены следующие неограничивающие варианты осуществления.

[0102] Вариант осуществления 1 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, характеризующийся по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.

[0103] Вариант осуществления 2 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 1, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[0104] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 1 или 2, при этом выделенная нуклеиновая кислота дополнительно предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

[0105] Вариант осуществления 4 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 3, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[0106] Вариант осуществления 5 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 1 или 2, при этом выделенная нуклеиновая кислота дополнительно предусматривает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона Ptr01 (SEQ ID NO:8) или полипептида гексона Ptr13 (SEQ ID NO:10).

[0107] Вариант осуществления 6 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ

ID NO:4.

[00108] Вариант осуществления 7 представляет собой последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 6, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[00109] Вариант осуществления 8 представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 1-7.

[00110] Вариант осуществления 9 представляет собой вектор по варианту осуществления 8, который представляет собой аденовирусный вектор и дополнительно содержит трансген.

[00111] Вариант осуществления 10 представляет собой рекомбинантную клетку, содержащую вектор по варианту осуществления 8 или 9.

[00112] Вариант осуществления 11 представляет собой способ получения вектора, включающий (а) выращивание рекомбинантной клетки по варианту осуществления 10 в условиях, обеспечивающих продуцирование вектора; и (b) выделение вектора из рекомбинантной клетки.

[00113] Вариант осуществления 12 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую вектор по варианту осуществления 8 или 9.

[00114] Вариант осуществления 13 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по варианту осуществления 12.

[00115] Вариант осуществления 14 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (а) по меньшей мере один трансген и (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.

[00116] Вариант осуществления 15 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 14, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.

[00117] Вариант осуществления 16 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 14 или 15, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO:1.

[00118] Вариант осуществления 17 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-16, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:1.

[00119] Вариант осуществления 18 представляет собой аденовирусный вектор по

любому из вариантов осуществления 14-17, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[00120] Вариант осуществления 19 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-18, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

[00121] Вариант осуществления 20 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 19, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[00122] Вариант осуществления 21 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (а) по меньшей мере один сайт вставки трансгена и (б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, при этом полипептид гексона предусматривает полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

[00123] Вариант осуществления 22 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 21, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[00124] Вариант осуществления 23 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-22, при этом аденовирусный вектор дополнительно предусматривает делецию E1 или инактивированный E1.

[00125] Вариант осуществления 24 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-23, при этом аденовирусный вектор дополнительно предусматривает делецию E3 или инактивированный E3.

[00126] Вариант осуществления 25 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-24, при этом аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты аденовируса человека.

[00127] Вариант осуществления 26 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 25, при этом последовательности нуклеиновой кислоты аденовируса человека происходят из аденовируса-4 человека (hAdV-4), аденовируса-5 человека (hAdV-5), аденовируса-26 человека (hAdV-26) или аденовируса-35 человека (hAdV-35).

[00128] Вариант осуществления 27 представляет собой аденовирусный вектор по

варианту осуществления 26, при этом аденовирусный вектор содержитorf6 E4 аденовируса-5 человека (hAdv-5).

[00129] Вариант осуществления 28 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-27, при этом сайт вставки трансгена расположен в участке, прилегающем к инвертированному концевому повтору (ITR).

[00130] Вариант осуществления 29 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 28, при этом трансген вставлен в один или несколько сайтов вставки трансгена, выбранных из группы, состоящей из сайта вставки трансгена, расположенного в области делеции E1, сайта вставки трансгена, расположенного в области делеции E3, и сайта вставки трансгена, прилегающего к ITR.

[00131] Вариант осуществления 30 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-29, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29.

[00132] Вариант осуществления 31 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-18 и 23-29, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную SEQ ID NO:51 или SEQ ID NO:55.

[00133] Вариант осуществления 32 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (а) по меньшей мере один трансген; (b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5), полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6), полипептида гексона Ptr01 (SEQ ID NO:8), полипептида гексона Ptr13 (SEQ ID NO:10); и (с) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[00134] Вариант осуществления 33 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 32, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона Ptr01 (SEQ ID NO:8) или полипептида гексона Ptr13 (SEQ ID NO:10), а полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[00135] Вариант осуществления 34 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 33, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона Ptr01 (SEQ ID NO:8), а полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[00136] Вариант осуществления 35 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 33, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную

последовательность полипептида гексона Ptr13 (SEQ ID NO:10), а полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58).

[00137] Вариант осуществления 36 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 32, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5), а полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1).

[00138] Вариант осуществления 37 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 32, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6), а полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[00139] Вариант осуществления 38 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 32-37, при этом аденовирусный вектор дополнительно содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот, происходящих из аденовируса-4 человека (HAdV-4), аденовируса-5 человека (HAdV-5), аденовируса-26 человека (HAdV-26) или аденовируса-35 человека (HAdV-35).

[00140] Вариант осуществления 39 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 38, при этом аденовирусный вектор содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты из аденовируса-4 человека (HAdV-4) и последовательность нуклеиновой кислотыorf6 E4 аденовируса-5 человека (HAdV-5).

[00141] Вариант осуществления 40 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 39, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:51 и SEQ ID NO:55.

[00142] Вариант осуществления 41 представляет собой вакцину, содержащую аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 14-40 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00143] Вариант осуществления 42 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту вакцины по варианту осуществления 41.

[00144] Вариант осуществления 43 представляет собой способ получения вакцины, включающий объединение аденовирусного вектора по любому из вариантов осуществления 14-40 с фармацевтически приемлемым носителем.

[00145] Вариант осуществления 44 представляет собой выделенный полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

[00146] Вариант осуществления 45 представляет собой выделенный полипептид гексона по варианту осуществления 44, при этом полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

[00147] Вариант осуществления 46 представляет собой выделенный полипептид гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона Ptr01 (SEQ ID NO:8) или полипептида гексона Ptr13 (SEQ ID NO:10).

[00148] Вариант осуществления 47 представляет собой выделенный полипептид фибры, при этом полипептид фибры характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.

[00149] Вариант осуществления 48 представляет собой выделенный полипептид фибры по варианту осуществления 47, при этом полипептид фибры характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.

[00150] Вариант осуществления 49 представляет собой выделенный полипептид фибры, при этом полипептид фибры характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью с SEQ ID NO:1.

[00151] Вариант осуществления 50 представляет собой выделенный полипептид фибры по варианту осуществления 49, при этом полипептид фибры характеризуется по меньшей мере 99% идентичностью с SEQ ID NO:1.

[00152] Вариант осуществления 51 представляет собой выделенный полипептид фибры по варианту осуществления 49, при этом полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

[00153] Вариант осуществления 52 представляет собой вакцину по варианту осуществления 41 для индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта.

[00154] Вариант осуществления 53 представляет собой применение вакцины по варианту осуществления 41 для получения лекарственного препарата для индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта.

[00155] Вариант осуществления 54 представляет собой аденовирусный вектор, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57.

[00156] Вариант осуществления 55 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:38.

[00157] Вариант осуществления 56 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:39.

[00158] Вариант осуществления 57 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:46.

[00159] Вариант осуществления 58 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:47.

[00160] Вариант осуществления 59 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:52.

[00161] Вариант осуществления 60 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:53.

[00162] Вариант осуществления 61 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:56.

[00163] Вариант осуществления 62 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 54, при этом аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO:57.

ПРИМЕРЫ

[00164] **Пример 1. Создание предусматривающих делеции E1 и E3 векторов на основе новых изолятов аденовируса BB21 и BB24**

[00165] Были выявлены и секвенированы два новых изолята аденовируса шимпанзе: BB21 (также обозначаемый JAd2-WT) и BB24 (также обозначаемый JAd3-WT). Было обнаружено, что изоляты аденовируса шимпанзе филогенетически принадлежат к аденовирусам человека вида E (HAdV-E). Нуклеотидные последовательности полных геномов BB21 и BB24 определены под SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12 соответственно. Полипептидные последовательности гексона и фибры BB21 определены под SEQ ID NO:5 и 1 соответственно. Полипептидные последовательности гексона и фибры BB24 определены под SEQ ID NO:6 и 2 соответственно. Результаты выравнивания полипептидных последовательностей фибры BB21 и BB24 представлены на фигуре 15.

Описание систем на основе единичной плазмиды, применяемой для создания Ad-векторов на основе BB21 и BB24

[00166] pBB21.dE1.dE3 (SEQ ID NO:13; фигура 9), pBB21.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:14; фигура 10), pBB24.dE1.dE3 (SEQ ID NO:15; фигура 11) и pBB24.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:16; фигура 12) представляют собой плазмиды, несущие полноразмерные геномы предусматривающих делеции E1 и E3 аденовирусных векторов на основе изолятов BB21 и BB24. Геномные последовательности Ad-вектора, содержащиеся в этих плаزمиды, представлены под SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29 соответственно. В пределах каждой из этих плазмид геном аденовирусного вектора фланкирован двумя сайтами рестрикционных ферментов SmaI (т. е. на каждом конце генома вектора расположено по одному сайту SmaI). Такие сайты SmaI предназначены для способствования вырезанию генома Ad-вектора из плазмидного остова перед "спасением" вируса путем трансфекции подходящих E1-дополняющих клеток (таких как клетки

НЕК293, 911 и PER.C6). Геномы Ad-вектора, содержащиеся в этих плазмидах, 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 BB21 и BB24

[00167] Каждый из геномов Ad-вектора на основе BB21 и BB24 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 RsrII. Другой сайт вставки трансгена создавали путем вставки последовательности сайта рестрикционного фермента PacI в участок, прилегающий к инвертированному концевому повтору (ITR) каждого аденовируса. Последовательности BB21 и BB24, предусматривающие кодирующие последовательности orf6 и orf6/7 E4, заменяли на SEQ ID NO:30 и SEQ ID NO:40 соответственно. Эти заменяющие последовательности предусматривают кодирующие последовательности orf6 и orf6/7 E4 аденовируса-5 человека (HAdV-5) (пары оснований 32914-34077 последовательности GenBank AC_000008), модифицированные так, чтобы они несли одну молчащую мутацию, деактивирующую определенный сайт AseI (с целью клонирования).

[00168] Разрабатывали и конструировали два типа делеций области E1. Геномы Ad-векторов на основе BB21 и BB24 соответственно, содержащиеся в pBB21.dE1.dE3 и pBB24.dE1.dE3, несут делецию области E1, что соответствует удалению нуклеотидов 456-3027 из SEQ ID NO:11 и нуклеотидов 457-3025 из SEQ ID NO:12 соответственно. В то же время геномы Ad-векторов на основе BB21 и BB24 соответственно, содержащиеся в pBB21.dE1.dE3.5IXP и pBB24.dE1.dE3.5IXP, несут большую делецию последовательности, охватывающей область E1, которая предусматривает удаление всех кодирующих последовательностей E1 в BB21 или BB24 (т. е. нуклеотидов 456-3418 из SEQ ID NO:11 или нуклеотидов 457-3420 из SEQ ID NO:12 соответственно). Эти последние два генома Ad-вектора дополнительно разрабатывали с обеспечением того, чтобы он нес замену не кодирующего участка последовательности между последовательностями, кодирующими 55K и pIX E1B, на последовательность HAdV-5 (т.

е. последовательности, соответствующие нуклеотидам 3419-3502 из SEQ ID NO:11 или 3421-3504 из SEQ ID NO:12, заменяли на нуклеотиды 3510-3608 из GenBank AC_000008 (т. е. SEQ ID NO:25)).

Конструирование единичных плазмид, содержащих геномы Ad-вектора на основе BB21

[00169] pBB21.dE1.dE3 (SEQ ID NO:13) конструировали за несколько стадий генного синтеза (который был осуществлен компанией GenScript, Пискалавей, Нью-Джерси) и стандартных процедур молекулярного клонирования. Во-первых, синтезировали фрагмент ДНК длиной 3576 п. о. (SEQ ID NO:31), 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 RITR), и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента EcoRI-AseI в расщепленную посредством EcoRI и NdeI плазмиду pBR322 (регистрационный номер в GenBank - J01749.1), что приводило к получению промежуточной плазмиды 1 BB21. Во-вторых, синтезировали фрагмент длиной 4256 п. о. (SEQ ID NO:32), содержащий левый конец требуемого генома Ad-вектора (т. е. несущий вышеупомянутую делецию E1), и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента SnaBI-EcoRI в расщепленную посредством ZraI и EcoRI промежуточную плазмиду 1 BB21, что приводило к получению промежуточной плазмиды 2 BB21. В-третьих, синтезировали фрагмент длиной 4077 п. о. (SEQ ID NO:33), содержащий средний фрагмент генома Ad-вектора, и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента EcoRI-HpaI в расщепленную посредством EcoRI и HpaI промежуточную плазмиду 2 BB21, что приводило к получению промежуточной плазмиды 3 BB21 (SEQ ID NO:34). В-четвертых, рестрикционный фрагмент AbsI-EcoRI длиной 18815 п. о. из вирусного генома BB21 (SEQ ID NO:11) лигировали в расщепленную посредством AbsI и EcoRI промежуточную плазмиду 3 BB21, что приводило к получению конечной плазмиды pBB21.dE1.dE3 (SEQ ID NO:13).

[00170] pBB21.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:14) конструировали таким же образом, что и pBB21.dE1.dE3, за исключением того, что вышеупомянутую промежуточную плазмиду 3 BB21 (SEQ ID NO:34) сначала модифицировали так, чтобы она предусматривала требуемую делецию E1 и вставку промотора pIX Ad5. Это осуществляли путем синтеза фрагмента длиной 224 п. о. (SEQ ID NO:35), который впоследствии лигировали в виде рестрикционного фрагмента AsiSI-FseI в расщепленную посредством AsiSI и FseI промежуточную плазмиду 3 BB21.

[00171] pBB21.FLuc (SEQ ID NO:36) и pBB21.RSVF-2A-GLuc (SEQ ID NO:37) представляли собой плазмиды, полученные из pBB21.dE1.dE3, каждая из которых несет геном Ad-вектора на основе BB21, снабженный содержащей трансген кассетой экспрессии, вставленной в местоположение делеции E1. Последовательности генома Ad-вектора, переносимые в данных плазмидах, представлены под SEQ ID NO:38 и SEQ ID NO:39 соответственно. pBB21.FLuc несет содержащую трансген 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. pBB21.RSVF-2A-GLuc несет содержащую трансген 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 pBB21.dE1.dE3 с получением pBB21.FLuc и pBB21.RSVF-2A-GLuc соответственно.

Конструирование единичных плазмид, содержащих геномы Ad-вектора на основе BB24

[00172] pBB24.dE1.dE3 (SEQ ID NO:15) конструировали за несколько стадий генного синтеза (который был осуществлен компанией GenScript) и стандартных процедур молекулярного клонирования. Во-первых, синтезировали фрагмент ДНК размером 8144 п. о. (SEQ ID NO:41), содержащий левый и правый концы требуемого генома Ad-вектора (т. е. несущий вышеупомянутую делецию E1, делецию E3, частичную замену последовательности E4 и сайт вставки трансгена, прилегающий к RITR), и лигировали его в виде рестрикционного фрагмента MfeI-AseI в расщепленную посредством EcoRI и NdeI pBR322 (регистрационный номер GenBank - J01749.1), что приводило к получению промежуточной плазмиды 1 BB24 (SEQ ID NO:42). Во-вторых, рестрикционный фрагмент NdeI-EcoRI длиной 22482 п. о. из вирусного генома BB24 (SEQ ID NO:12) лигировали в расщепленную посредством NdeI и EcoRI промежуточную плазмиду 1 BB24, что приводило к получению конечной плазмиды pBB24.dE1.dE3.

[00173] Аналогичным образом конструировали pBB24.dE1.dE3.5IXP (SEQ ID NO:16). Во-первых, вышеупомянутую промежуточную плазмиду 1 BB24 (SEQ ID NO:42) модифицировали так, чтобы она несла требуемую делецию E1 и вставку промотора pIX Ad5. Это осуществляли путем синтеза фрагмента длиной 2671 п. о. (SEQ ID NO:43), который впоследствии лигировали в виде рестрикционного фрагмента AsiSI-EcoRI в расщепленную посредством AsiSI и EcoRI промежуточную плазмиду 1 BB24. Во-вторых, рестрикционный фрагмент XbaI-EcoRI длиной 19470 п. о. из вирусного генома BB24 (SEQ ID NO:12) лигировали в модифицированную плазмиду (расщепленную посредством XbaI и EcoRI).

[00174] pBB24.FLuc (SEQ ID NO:44) и pBB24.RSVF-2A-GLuc (SEQ ID NO:45) представляли собой плазмиды, полученные из pBB24.dE1.dE3, каждая из которых содержит геном Ad-вектора на основе BB24, снабженный содержащей трансген кассетой

экспрессии, вставленной в местоположение делеции E1. Геномные последовательности Ad-вектора, содержащиеся в этих плаزمиды, представлены под SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47 соответственно. pBB24.FLuc несет ту же кассету экспрессии FLuc, которая описана в данном документе для pBB21.FLuc. pBB24.RSVF-2A-GLuc несет ту же кассету экспрессии RSVF-2A-GLuc, которая описана в данном документе для pBB21.RSVF-2A-GLuc. Каждую из этих двух кассет конструировали за несколько стандартных стадий синтеза генов и молекулярного клонирования, после чего их лигировали в уникальный сайт рестрикционного фермента AsiSI в pBB24.dE1.dE3 с получением pBB24.FLuc и pBB24.RSVF-2A-GLuc соответственно.

Создание и получение аденовирусных векторов на основе BB21 и BB24

[00175] Аденовирусные векторы BB21.FLuc (также обозначаемый JAd2NVT003), BB21.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемый JAd2NVT001), BB24.FLuc (также обозначаемый JAd3NVT003) и BB24.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемый JAd3NVT001), которые содержали последовательности генома аденовирусного вектора SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:47 соответственно, получали путем трансфекции соответствующими плазмиды с геномом Ad-вектора (т. е. pBB21.FLuc, pBB21.RSVF-2A-GLuc, pBB24.FLuc и pBB24.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)).

Пример 2. Создание предусматривающих делеции E1 и E3 векторов на основе HAdV-4, несущих последовательности гексона и фибры из аденовирусов человекообразных обезьян.

[00176] Для создания неспособных к репликации аденовирусных векторов на основе аденовируса человека типа 4 (HAdV-4), которые предусматривают модификации в последовательностях гексона или гексона и фибры, конструировали плазмиды, несущие полный геном вектора на основе HAdV-4, несущий делеции E1 и E3, вставки трансгена и

замены гексона и/или фибры, как описано ниже. Содержащие трансген кассеты экспрессии вставляли в делецию E1 вектора. Трансфекция плазмидами E1-комплементарных линий клеток, таких как HEK 293 или PER.C6, приводила к "спасению" векторов на основе HAdV-4, в которых капсидные белки (гексона или гексона и фибры) были заменены гетерологичными последовательностями, полученными от определенных изолятов аденовируса человекообразных обезьян. Разработка и конструирование плазмид на основе Ad-векторов описаны в последующих разделах.

Разработка и конструирование единичных плазмид, содержащих геномы Ad-вектора на основе HAdV-4

[00177] Полная последовательность изолята HAdV-4, использованная для разработки и конструирования вектора (35990 п. о.), определена ранее (SEQ ID NO:17).

[00178] Единичную плазмиду, несущую геном вектора на основе HAdV-4 (несущий делеции, делающие ее неспособной к репликации, а также создающие пространство для вставки чужеродных содержащих трансген кассет), создавали с помощью стандартных методик молекулярной биологии и клонирования ДНК. Вкратце, фрагменты ДНК, содержащие левый и правый концы требуемого Ad-вектора на основе HAdV-4, были синтезированы в GenScript и встроены в pBR322. Затем получали недостающую среднюю часть генома HAdV-4, т. е. рестрикционный фрагмент HindIII-HindIII длиной примерно 19 т. п. о., из очищенной геномной ДНК HAdV-4 дикого типа (путем расщепления ферментом рестрикции), а затем лигировали ее в содержащую левый и правый конец плазмиду на основе pBR322. Это приводило к получению плазмиды pAd4.dE1.dE3. Данная плазида несет предусматривающий делеции E1 и E3 геном Ad-вектора на основе HAdV-4, фланкированный сайтами SwaI. Данные сайты SwaI обеспечивают возможность вырезания гена вектора из плазмиды для осуществления "спасения" аденовирусного вектора путем трансфекции E1-комплементарной линии клеток, такой как линия клеток PER.C6 или HEK293. В местоположении делеции E1 плазида несет сайт вставки трансгена, содержащийся в сайте фермента рестрикции AsiSI. Другой сайт вставки трансгена, содержащийся в сайте PacI, расположен в участке, прилегающем к правому инвертированному концевому повтору.

[00179] Также создавали модифицированную по области E4 версию pAd4.dE1.dE3, представляющую собой pAd4.5orf6 (SEQ ID NO:18; фигура 13). Тогда как pAd4.dE1.dE3 создавали таким образом, чтобы она содержала нативную последовательность E4 HAdV-4, pAd4.5orf6 создавали таким образом, чтобы она содержала модифицированную область E4, в которой нуклеотиды 33018-34165 нативной последовательности HAdV-4 заменяли последовательностью, предусматривающей последовательности orf6 и orf6/7 E4 из HAdV-5 (т. е. нуклеотидами 32914-34077 последовательности HAdV-5 с номером GenBank AC_000008 (SEQ ID NO:48). Геномная последовательность Ad-вектора, содержащаяся в pAd4.5orf6, представлена под SEQ ID NO:49. pAd4.5orf6 получали путем вырезания и замены с использованием стандартных методик клонирования фрагмента psiI-PacI длиной 2,9 т. п. о. из pAd4.dE1.dE3 синтезированной последовательностью (созданной компанией

GenScript), несущей описанную модификацию. За исключением модифицированной области E4, в остальном плазмиды pAd4.dE1.dE3 и pAd4.5orf6 одинаковы. Карта pAd4.5orf6 показана на фигуре 12. Указаны делеции E1 и E3, а также области, кодирующие гексон и фибру.

[00180] Обе версии вектора на основе HAdV-4 можно "спасать" при трансфекции соответствующими плазмидами (т. е. pAd4.dE1.dE3 и pAd4.5orf6) подходящих E1-комплементарных клеток (таких как HEK293 и PER.C6). Тем не менее, было обнаружено, что применение содержащей orf6 E4 последовательности из HAdV-5 улучшает выходы векторов и эффективность продуцирования. Ранее при аналогичной замене в векторе на основе HAdV-35 наблюдали аналогичные результаты (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)).

[00181] Каждая из pAd4.dE1.dE3 и pAd4.5orf6 несет в геноме Ad-вектора уникальный сайт рестрикции AsiSI в местоположении делеции E1 и уникальный сайт рестрикции PacI, прилегающий к правому инвертированному концевому повтору. Эти сайты делают возможной вставку содержащих трансген кассет экспрессии в соответствующих местоположениях генома Ad-вектора с помощью стандартных методик клонирования. Например, одну или несколько таких кассет можно вставить в одно или оба из этих местоположений.

pAd4.FLuc и pAd4.RSVF-2A-GLuc представляют собой версии pAd4.5orf6, предусматривающие содержащие трансген кассеты экспрессии, соответственно несущие содержащие трансген кассеты, кодирующие люциферазу светлячка (FLuc) и слитый белок, содержащий фузогенный гликопротеин респираторно-синцитиального вируса A2, пептид 2A, полученный из вируса ящура, и люциферазу Gaussia (RSVF-2A-GLuc). Их конструировали путем вставки соответствующих кассет в сайт AsiSI в pAd4.5orf6 с помощью стандартных методик клонирования. Данные две содержащие трансген кассеты являлись такими же, как и использованные в примере 1, в контексте аденовирусных векторов на основе BB21 и BB24.

Разработка и конструирование единичных плазмид, содержащих векторы на основе HAdV-4, несущие замены последовательностей гексона и фибры

[00182] Конструировали плазмиды с геномом вектора на основе HAdV-4, у которых последовательности, кодирующие гексон и фибру, были заменены последовательностями определенных изолятов аденовируса шимпанзе, которые, как и HAdV-4, были отнесены к аденовирусам человека вида E. Изолятами аденовируса, которые служили донором последовательностей гексона для этих конструкций, являлись PtroAdV-1 и PtroAdV-13, для которых частичная нуклеотидная последовательность гексона была ранее депонирована в GenBank (под JN163971 и JN163983 соответственно). Последовательности фибры, использованные для конструирования, получали из новых изолятов аденовируса шимпанзе BB21 и BB24, которые в данном документе описаны в примере 1. Создавали две различные комбинации замен последовательностей гексона и

фибры (в контексте плазмид с геном вектора на основе HAdV-4): (1) нуклеотидные последовательности гексона PtroAdV-1 объединяли с нуклеотидными последовательностями, кодирующими фибру BB24 (SEQ ID NO:2), и (2) нуклеотидные последовательности гексона PtroAdV-13 объединяли с нуклеотидными последовательностями, кодирующими вариант фибры BB21 (SEQ ID NO:58). Сконструированными плазмидами, несущими указанную первую комбинацию замен последовательностей гексона и фибры, являются pAd4.Ptr01.BB24.5orf6 (SEQ ID NO:21; фигура 13), pAd4.Ptr01.BB24.5orf6.Fluc (SEQ ID NO:19) и pAd4.Ptr01.BB24.5orf6.RSVF-2A-Gluc (SEQ ID NO:50), которые несут геномные последовательности Ad-вектора, которые представлены под SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52 и SEQ ID NO:53 соответственно. Сконструированными плазмидами, несущими указанную вторую комбинацию замен последовательностей гексона и фибры, являются pAd4.Ptr13.BB21.5orf6 (SEQ ID NO:22; фигура 14), pAd4.Ptr13.BB21.5orf6.Fluc (SEQ ID NO:20) и pAd4.Ptr13.BB21.5orf6.RSVF-2A-Gluc (SEQ ID NO:54), которые содержат геномные последовательности Ad-вектора, которые представлены под SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57 соответственно.

[00183] Каждую из вышеупомянутых плазмид с геном Ad-вектора с модифицированными гексоном и фиброй конструировали с помощью стандартных процедур генного синтеза и молекулярного клонирования. Синтезировали (с помощью GenScript) фрагменты последовательности, предусматривающие соответствующие модифицированные последовательности гексона и фибры, а затем подвергали последовательным стадиям субклонирования, которые совместно приводили к вставке этих последовательностей в pAd4.5orf6 (заменяя в них соответствующие последовательности, содержащие нативные гексон и фибру HAdV-4). Полученные плазмиды pAd4.Ptr01.BB24.5orf6 и pAd4.Ptr13.BB21.5orf6 затем снабжали вышеупомянутыми кассетами экспрессии для Fluc и RSVF-2A-Gluc путем встраивания этих кассет в уникальный сайт AsiSI этих плазмид (что приводило к конструированию pAd4.Ptr01.BB24.5orf6.Fluc, pAd4.Ptr01.BB24.5orf6.RSVF-2A-Gluc, pAd4.Ptr13.BB21.5orf6.Fluc и pAd4.Ptr13.BB21.5orf6.RSVF-2A-Gluc).

[00184] Произведенные в данном случае замены последовательности гексона приводили к конструированию химерных кодирующих гексон последовательностей "Ptr01" (SEQ ID NO:7) и "Ptr13" (SEQ ID NO:9). Эти последовательности представляют собой гены гексона HAdV-4, в которых последовательности, кодирующие гипервариабельные области (HVR), заменяли последовательностями из PtroAdV-1 и PtroAdV-13 соответственно. Химерные полипептиды гексона, кодируемые Ptr01 и Ptr13, представлены под SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:10 соответственно.

[00185] Произведенные в данном случае замены последовательности фибры предусматривали замену полной кодирующей фибры последовательности HAdV-4 последовательностями, полученными из изолятов-доноров фибры BB21 и BB24, которые описаны в данном документе в примере 1. Заменяющие нуклеотидные последовательности кодируют вариант фибры BB21 (SEQ ID NO:58) и фибру BB24 (SEQ

ID NO:2) соответственно. На фигуре 16 показаны результаты выравнивания полипептидов этих двух фибр и фибры BB21 (SEQ ID NO:1).

Создание и получение векторов на основе HAdV-4, несущих замены последовательностей гексона и фибры

Аденовирусные векторы Ad4Ptr01-BB24.FLuc (также обозначаемый Ad4C1NVT003), Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемый Ad4C1NVT001), Ad4Ptr13-BB21.FLuc (также обозначаемый Ad4C2NVT003) и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемый Ad4C2NVT001), которые содержат геномные последовательности аденовирусных векторов SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57 соответственно, создавали путем трансфекции E1-комплементарных клеток PER.C6 расщепленными посредством SmaI плазмидами с геномом Ad-вектора pAd4.Ptr01.BB24.5orf6.FLuc, pAd4.Ptr01.BB24.5orf6.RSVF-2A-GLuc, pAd4.Ptr13.BB21.5orf6.FLuc и pAd4.Ptr13.BB21.5orf6.RSVF-2A-GLuc соответственно. Аналогично, контрольные аденовирусные векторы Ad4.FLuc и Ad4.RSVF-2A-GLuc получали с использованием плазмид pAd4.FLuc и pAd4.RSVF-2A-GLuc соответственно. Все трансфекции и последующие амплификации, очистки и титрования векторов выполняли в соответствии с теми же стандартными процедурами, которые описаны в данном документе для векторов на основе BB21 и BB24 в примере 1.

Оценка снижения титра нейтрализующих антител к аденовирусу вследствие замены гексона и фибры HAdV-4

[00186] Рекомбинантные аденовирусы, экспрессирующие люциферазу светлячка (с заменами капсидных белков, т. е. гексона и фибры, сконструированными так, как описано ранее), использовали для определения того, приводит ли замена капсидных белков, гексона и фибры, гомологичными белками из аденовирусов человекообразных обезьян к снижению нейтрализации образцами человеческой сыворотки крови, которые обладали нейтрализующей в отношении HAdV-4 активностью.

[00187] Вкратце, содержащие равное количество инфекционных единиц аликвоты неочищенного вирусного исходного материала подлежащего тестированию аденовируса инкубировали с серийными разведениями образца сыворотки крови. Начальное разведение, используемое для этих анализов, было 16-кратным. После периода инкубирования содержащую аденовирус аликвоту использовали для инфицирования индикаторной линии клеток, такой как клетки A549, при этом любой аденовирус, который не был нейтрализован в результате инкубации с сывороткой крови, мог инфицировать индикаторные клетки. Затем трансдуцированные вирусом клетки инкубировали в течение ночи для обеспечения экспрессии трансгена люциферазы светлячка. Титром нейтрализующих антител для любого образца сыворотки крови, обладающего нейтрализующей аденовирус активностью, было минимальное разведение сыворотки крови, которое могло обеспечивать 90% снижение активности люциферазы в репортерных клетках по сравнению с содержащей аденовирус аликвотой, которую не инкубировали с сывороткой крови.

Определяли титр нейтрализующих аденовирус антител в 22 образцах сыворотки крови человека (из 79 протестированных образцов), для которых было обнаружено, что они содержат нейтрализующие Ad4.FLuc антитела (таблица 1). При сравнении титров нейтрализующих антител для тех же образцов сыворотки против химерных аденовирусов Ad4.Ptr01-BB24.FLuc и Ad4.Ptr13-BB21.FLuc соответственно было очевидно, что имеет место выраженное снижение нейтрализующей аденовирус активности в результате изменений капсида, внесенных в последовательности, кодирующих гексон и фибру. Эти результаты подтверждают, что аденовирусные белки гексона и фибры содержат важные антигенные детерминанты для опосредованной антителами нейтрализации аденовируса. Они также иллюстрируют, что предсуществующий гуморальный иммунитет к вектору у людей, направленный на векторы на основе аденовируса человека (в данном случае Ad4.FLuc, вектор на основе HAdV-4), можно преодолевать путем замены белков гексона и фибры вектора на таковые аденовирусов человекообразных обезьян, которые вероятно будут характеризоваться низкой серопревалентностью в популяциях людей.

Подводя итог вышесказанному, было показано, что Ad4.Ptr01-BB24.FLuc и Ad4.Ptr13-BB21.FLuc серологически отличаются от их родительского вектора Ad4.FLuc на основе HAdV-4. Более того, наблюдали полное отсутствие (в случае Ad4.Ptr01-BB24.FLuc) или лишь ограниченную (в случае Ad4.Ptr13-BB21.FLuc) нейтрализующую активность в отношении этих двух векторов в панели нейтрализующих Ad4.FLuc образцов сыворотки крови человека.

Таблица 1. Титры нейтрализующих антител к аденовирусу в образцах сыворотки крови людей, положительных в отношении нейтрализующих антител к Ad4

Образец сыворотки крови №	Титр антител к AdV-4.FLuc	Титр антител к Ad4.Ptr01-BB24.FLuc	Титр антител к Ad4.Ptr13-BB21.FLuc
1	726	<16	<16
2	328	<16	<16
3	285	<16	<16
4	252	<16	<16
5	116	<16	<16
6	102	<16	<16
7	86	<16	<16
8	78	<16	<16
9	70	<16	<16
10	63	<16	110
11	59	<16	<16
12	58	<16	<16
13	53	<16	<16
14	50	<16	47
15	48	<16	<16
16	42	<16	<16
17	40	<16	<16
18	33	<16	<16
19	32	<16	<16
20	31	<16	<16
21	29	<16	<16
22	22	<16	<16

<16 означает, что при наиболее низком 16-кратном разведении не наблюдали

нейтрализации

Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные новыми аденовирусными векторами

[00188] В примерах 3-8 описаны эксперименты, проводимые для оценки иммуногенности четырех новых, созданных в соответствии с настоящим документом векторов, т. е. аденовирусных векторов BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24. 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-FA₂-2A-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), 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 3. Клеточные иммунные ответы, индуцированные BB21.FLuc и BB24.FLuc

[00189] Для оценки клеточной иммуногенности новых аденовирусных векторов BB21 и BB24 мышей Balb/C иммунизировали внутримышечно посредством векторов Ad26.FLuc (положительный контроль), BB21 и BB24, экспрессирующих люциферазу светлячка (т. е. BB21.FLuc или BB24.FLuc), или посредством аденовектора, который не кодировал трансген FLuc (пустого Ad26). При введении тестировали две дозы вектора: 10^9 и 10^{10} вирусных частиц (в. ч.) на мышь. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделяли спленоциты (фигура 1A). Клеточные иммунные ответы определяли анализом ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток после стимуляции спленоцитов в течение ночи с помощью пула 15-мерных перекрывающихся пептидов FLuc (фигура 1B). Из результатов было видно, что при иммунизации в более высоких дозах (10^{10}) клеточные иммунные ответы, индуцированные BB21.FLuc и BB24.FLuc, были приблизительно такими же высокими, как и ответ, наблюдаемый в случае Ad26.FLuc. В отличие от этого, при иммунизации более низкой дозой (10^9) как BB21.FLuc, так и BB24.FLuc обеспечивали более сильный ответ, чем Ad26.FLuc. В целом, клеточные иммунные ответы, индуцированные экспрессирующими FLuc рекомбинантными аденовирусными векторами BB21 и BB24 по настоящему изобретению, четко указывали на сильную иммуногенность этих векторов у мышей.

Пример 4. Клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad4Ptr13-BB21.FLuc

[00190] Для оценки клеточной иммуногенности нового сконструированного аденовирусного вектора Ad4Ptr13-BB21 мышей Balb/C иммунизировали внутримышечно посредством Ad4Ptr13-BB21, Ad26 (положительный контроль) или Ad4 (родительский вектор Ad4Ptr13-BB21), каждый из которых экспрессировал люциферазу Firefly (Fluc), или посредством не кодирующего трансген аденовектора пустого Ad26. При введении тестировали две дозы вектора: 10^9 и 10^{10} вирусных частиц (в. ч.) на мышь. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделяли спленоциты в соответствии с той же схемой эксперимента, что и в случае BB21.Fluc и BB24.Fluc (фигура 1A). Клеточные иммунные ответы определяли анализом ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток после стимуляции спленоцитов в течение ночи с помощью пула 15-мерных перекрывающихся пептидов FLuc (фигура 2). Из результатов видно, что при иммунизации более высокими дозами (10^{10}) клеточный иммунный ответ, индуцированный посредством Ad4Ptr13-BB21.Fluc, был примерно таким же, как и наблюдаемый с эталонным контрольным вектором Ad26.Fluc, тогда как при иммунизации более низкими дозами (10^9) Ad4Ptr13-BB21.Fluc обеспечивал несколько более сильный ответ, чем Ad26.Fluc.

[00191] В целом, клеточные иммунные ответы, индуцированные экспрессирующим FLuc новым сконструированным аденовирусным вектором Ad4Ptr13-BB21, который содержал вариант фибры BB21 (SEQ ID NO:58), ясно свидетельствовали о сильной иммуногенности этого вектора у мышей.

Пример 5. Клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad4Ptr01-BB24.Fluc

[00192] Для оценки клеточной иммуногенности нового сконструированного аденовирусного вектора Ad4Ptr01-BB24.Fluc мышей Balb/C иммунизировали внутримышечно посредством Ad26.Fluc (положительный контроль), Ad4Ptr01-BB24, экспрессирующего FLuc, или посредством не кодирующего трансген аденовектора пустого Ad26. При введении тестировали две дозы: 10^9 и 10^{10} вирусных частиц (в. ч.) на мышь. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделяли спленоциты в соответствии с той же схемой эксперимента, что и в случае BB21.Fluc и BB24.Fluc (фигура 1A). Клеточные иммунные ответы определяли анализом ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток после стимуляции спленоцитов в течение ночи с помощью пула 15-мерных перекрывающихся пептидов FLuc (фигура 3). Из результатов видно, что при более высокой дозе Ad4Ptr01-BB24.Fluc явно индуцировал клеточные иммунные ответы против кодируемого антигена, причем показания были близкими, но несколько более низкими, чем показания, которые наблюдали для вектора положительного контроля Ad26.Fluc.

[00193] В целом, клеточные иммунные ответы, индуцированные экспрессирующим FLuc новым сконструированным аденовирусным вектором Ad4Ptr01-BB24, который содержал фибру BB24 (SEQ ID NO:2), ясно свидетельствовали об иммуногенности этого вектора у мышей.

Пример 6. Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BB21.RSVF-2A-GLuc

[00194] Иммуногенность нового аденовирусного вектора BB21 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 BB21.RSVF-2A-GLuc (оба в количестве 10^8 , 10^9 и 10^{10} вирусных частиц на мышь) либо посредством Ad26.FLuc или BB21.FLuc (оба в количестве 10^{10} вирусных частиц на мышь). Мышей умерщвляли спустя восемь недель и собирали образцы крови и спленоциты (фигура 4А). Оценивали различные иммунные параметры так, как описано ниже.

[00195] Проводили анализ нейтрализации вируса для оценки способности BB21.RSVF-2A-GLuc индуцировать выработку нейтрализующих респираторно-синцитиальный вирус антител. На фигуре 4В 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. BB21.RSVF-2A-GLuc приводили к титрам нейтрализации RSV A2, находящимся в том же диапазоне, что и титры, которые определяли для эталонного вектора Ad26, кодирующего тот же антиген.

[00196] 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 спленоциты 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 BB21.RSVF-2A-GLuc, имели дозозависимый характер и для каждой дозы были схожи по величине с ответами, индуцированными эталонным вектором Ad26.RSVF-2A-GLuc (фигура 4С). Как и ожидалось, в результате измерений не было обнаружено специфичных к RSV-F_{A2} ответов среди спленоцитов мышей, иммунизированных аденовекторами, кодирующими люциферазу светлячка.

[00197] Способность экспрессирующих RSVF-2A-GLuc векторов вызывать выработку специфичных к RSV-F_{A2} антител IgG оценивали с помощью ELISA. Сыворотку крови, собранную спустя 8 недель после иммунизации у мышей, иммунизированных векторами Ad26 или BB21, экспрессирующими RSVF-2A-GLuc или люциферазу светлячка, 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 BB21.RSVF-2A-GLuc дозозависимым образом вызывал

выработку титров специфичных к pre-RSV-F антител IgG, схожих с титрами, выработка которых была индуцирована посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc (фигура 4D). В отличие от этого, как и ожидалось, титры антител, специфичных к RSV-F_{A2}, в сыворотке крови мышей, иммунизированных векторами, кодирующими люцифразу светлячка, обнаружены не были.

[00198] В целом, из данных видно, что вектор BB21 индуцировал сильные клеточный и гуморальный иммунные ответы на кодируемый антиген, которые были схожи по величине с ответами, которые индуцировались эталонным вектором на основе HAdV-26. Эти иммунные ответы четко указывали на сильную иммуногенность вектора BB21 у мышей.

Пример 7. Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные BB24.RSVF-2A-GLuc

[00199] Иммуногенность нового аденовирусного вектора BB24 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), BB24.RSVF-2A-GLuc или Ad48.RSVF-2A-GLuc (каждый в количестве 10^8 , 10^9 и 10^{10} вирусных частиц на мыш) либо посредством Ad26.FLuc, BB24.FLuc или Ad48.FLuc (каждый в количестве 10^{10} вирусных частиц на мыш). Согласно той же схеме эксперимента, которую использовали для BB21.RSVF-2A-GLuc (фигура 4A), через восемь недель после иммунизации мышей умерщвляли и собирали кровь и спленоциты. Оценивали различные иммунные параметры так, как описано ниже.

[00200] Проводили анализ нейтрализации вируса для оценки способности BB24.RSVF-2A-GLuc индуцировать выработку нейтрализующих респираторно-синцитиальный вирус антител. На фигуре 5A 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 мыш, столбцы обозначают среднее по группе, а пунктирная линия соответствует нижнему пределу количественного определения (LLOQ=6,88; средний конечный титр линейных образцов). Результаты, полученные для трех векторов, были схожими: титры нейтрализующих антител наблюдали для нескольких или всех иммунизаций дозой 10^9 и 10^{10} в. ч., тогда как при дозе 10^8 в. ч. титры нейтрализующих антител обнаруживали с большим трудом или вовсе не обнаруживали. 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 спленоциты 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 BB24.RSVF-2A-GLuc,

имели дозозависимый характер и для каждой дозы были по меньшей мере схожи по величине с ответами, индуцированными векторами сравнения Ad26.RSVF-2A-GLuc и Ad48.RSVF-2A-GLu (фигура 5B). Как и ожидалось, в результате измерений не было обнаружено специфичных к RSV-F_{A2} ответов среди спленоцитов мышей, иммунизированных аденовекторами, кодирующими люциферазу светлячка.

[00201] Способность экспрессирующих RSVF-2A-GLuc векторов вызывать выработку специфичных к RSV-F_{A2} антител IgG оценивали с помощью ELISA. Сыворотку крови, собранную спустя 8 недель после иммунизации у мышей, иммунизированных векторами Ad26, Ad48 или BB24, экспрессирующими RSVF-2A-GLuc или люциферазу светлячка, 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 BB24.RSVF-2A-GLuc дозозависимым образом вызывал выработку титров специфичных к pre-RSV-F антител IgG, схожих с титрами, выработка которых была индуцирована посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc и Ad48.RSVF-2A-GLuc (фигура 5C). В отличие от этого, как и ожидалось, титры антител, специфичных к RSV-F_{A2}, в сыворотке крови мышей, иммунизированных векторами, кодирующими люциферазу светлячка, обнаружены не были.

[00202] В целом, из данных видно, что вектор BB24 индуцировал сильные клеточный и гуморальный иммунные ответы на кодируемый антиген, которые были схожи по величине с ответами, которые индуцировались эталонным вектором на основе HAdV-26. Эти иммунные ответы четко указывали на сильную иммуногенность вектора BB24 у мышей.

Пример 8. Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc

[00203] Соответствующую иммуногенность новых сконструированных аденовирусных векторов Ad4Ptr01-BB24 и Ad4Ptr13-BB21 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), Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc или Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc (каждый в количестве 10^8 , 10^9 и 10^{10} вирусных частиц на мышь) либо посредством Ad26.FLuc, Ad4Ptr01-BB24.FLuc или Ad4Ptr13-BB21.FLuc (каждый в количестве 10^{10} вирусных частиц на мышь). Согласно той же схеме эксперимента, которую использовали для BB21.RSVF-2A-GLuc (фигура 4A), образцы крови и спленоциты собирали через восемь недель после иммунизации. Оценивали различные иммунные параметры так, как описано ниже.

[00204] Проводили анализы нейтрализации вируса для оценки способности Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc индуцировать выработку нейтрализующих респираторно-синцитиальный вирус антител. На фигуре 6A 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. как Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc, так и Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc обеспечивала титры нейтрализующих RSV A2 антител.

[00205] 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 спленоциты от иммунизированных мышей и стимулировали их в течение ночи 15-мерными перекрывающимися пептидами, охватывающими белок RSV-F_{2A}, и клеточные иммунные ответы определяли с помощью анализа ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток. Из данных видно, что как Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc, так и Ad4Ptr01-BB24.RSVF-2A-GLuc были способны вызывать дозозависимые антигенспецифические клеточные иммунные ответы (фигура 6B). Как и ожидалось, в результате измерений не было обнаружено специфичных к RSV-F_{A2} ответов среди спленоцитов мышей, иммунизированных аденовекторами, кодирующими люцифразу светлячка.

[00206] Способность экспрессирующих RSVF-2A-GLuc векторов вызывать выработку специфичных 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), Ad4Ptr13-BB21 или Ad4Ptr01-BB24, экспрессирующими RSVF-2A-GLuc или люцифразу светлячка, 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 как Ad4Ptr13-BB21.RSVF-2A-GLuc, так и Ad4Ptr01-BB24 способны дозозависимым образом вызывать выработку титров специфичных к pre-RSV-F антител IgG (фигура 6C). Как и ожидалось, титры антител, специфичных к RSV-F_{A2}, в сыворотке крови мышей, иммунизированных векторами, кодирующими только люцифразу светлячка, обнаружены не были.

[00207] В целом, из данных видно, что новые экспрессирующие RSVF-2A-GLuc сконструированные аденовирусные векторы Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24, которые соответственно содержат вариант фибры BB21 (SEQ ID NO:58) и фибру BB24 (SEQ ID NO:2), были способны вызывать значительные клеточные и гуморальные иммунные ответы против кодируемого антигена. Эти иммунные ответы явно свидетельствовали о хорошей иммуногенности Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 у мышей.

Пример 9. Оценка серологической перекрестной нейтрализации среди новых и существующих аденовирусных векторов

Для обеспечения своей потенциальной применимости в качестве новых аденовирусных вакцинных векторов новые аденовирусные векторы, 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 BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 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 люцифразу 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.

Результаты демонстрировали отсутствие или наличие очень низкого уровня перекрестной нейтрализации среди протестированных векторов (фигура 7). Единственная незначительная перекрестная нейтрализация, которую наблюдали, присутствовала между векторами BB21 и Ad4Ptr13-BB21. Титры реципрокной перекрестной нейтрализации, наблюдаемые для этих векторов, были значительно ниже, чем соответствующие титры гомологичной нейтрализации, полученные для этих же векторов. Важно отметить, что ни один из новых векторов (т. е. BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24) не демонстрировал перекрестную нейтрализацию с векторами на основе аденовируса человека, включенными в тестируемую панель, т. е. Ad26, Ad35, Ad49, Ad5 и Ad4. Следовательно, каждый из новых аденовирусных векторов BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 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 10. 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 каждый из векторов BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 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). Каждый вектор тестировали в отношении нейтрализации образцами сыворотки крови человека, проводя стандартный анализ нейтрализации аденовируса, который проводили в примере 9 и который был описан ранее (Sprangers 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), 16-300, 300-1000, 1000-4000 и >4000.

Из результатов видно, что все четыре новых аденовирусных вектора (т. е. BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21, Ad4Ptr01-BB24) характеризуются значительно более низкой серопревалентностью у субъектов-людей, чем контрольный вектор Ad5 (фигура 8). Более того, векторы BB21, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 дополнительно проявляли более низкую серопревалентность, чем эталонный вектор Ad26. Более того, положительные титры нейтрализации, которые наблюдали в отношении новых векторов, были, в целом, довольно низкими, в основном не превышали 300. Напротив, большинство обнаруженных положительных титров нейтрализации к Ad26 и Ad5 превышали 300.

В целом, приведенные выше данные указывали на то, что предсуществующий гуморальный противовекторный иммунитет к векторам BB21, BB24, Ad4Ptr13-BB21 и Ad4Ptr01-BB24 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 11. Продуктивность аденовирусного вектора в суспензии клеток PER.C6

[00208] 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).

[00209] 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 кодирующих Fluc версий новых векторов, которые описаны в примерах 1 и 2. 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).

[00210] На фигуре 17 показаны результаты в отношении продуктивности, полученные для новых векторов BB21.Fluc и BB24.Fluc, тогда как на фигуре 18 представлены результаты в отношении продуктивности, наблюдаемые для новых химерных векторов Ad4Ptr01-BB24.Fluc и Ad4Ptr13-BB21.Fluc, а также их родительского вектора Ad4.Fluc. Для BB21.Fluc и BB24.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. Аналогично, для двух химерных векторов Ad4Ptr01-BB24.Fluc и Ad4Ptr13-BB21.Fluc наблюдали хорошую продуктивность, при этом получали титры в. ч., которые либо превышали, либо являлись эквивалентными титрам, которые были получены для Ad26.Fluc (в зависимости от использованного соотношения инфицирования в. ч. на клетку). Кроме того, у этих двух химерных векторов наблюдали незатронутые показатели продуктивности по сравнению с родительским не подвергнутым модификации капсида вектором Ad4.Fluc.

[00211] Вышеупомянутые результаты демонстрировали хорошую продуктивность для каждого из новых векторов в модели бессывороточной суспензионной культуры на основе sPER.C6.

[00212] В совокупности, результаты исследований гуморального и клеточного иммунных ответов, индуцированных новыми рекомбинантными аденовирусными векторами по настоящему изобретению, которые представлены выше, ясно указывали на сильную иммуногенность этих векторов у мышей. Кроме того, было продемонстрировано, что векторы не индуцировали перекрестные ответы нейтрализующих антител в отношении определенных существующих векторов-кандидатов аденовирусных вакцин (например, Ad26 и Ad35) или наоборот, а также не индуцировали или индуцировали лишь очень низкий перекрестный нейтрализующий ответ антител друг к другу. 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.

[00213] 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 фибры с по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.
2. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.2, где полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).
3. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.1 или п.2, где выделенная нуклеиновая кислота дополнительно включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, включающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.
4. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.3, где полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).
5. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид гексона, включающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.
6. Последовательность выделенной нуклеиновой кислоты по п.5, где полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).
7. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-6.
8. Вектор по п.7, представляющий собой аденовирусный вектор и дополнительно содержащий трансген.
9. Рекомбинантная клетка, содержащая вектор по п.7 или п. 8.
10. Способ получения вектора, включающий:
выращивание рекомбинантной клетки по п.9 в условиях, обеспечивающих продуцирование вектора;
выделение вектора из рекомбинантной клетки.
11. Иммуногенная композиция, содержащая вектор по п.8.
12. Способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по п.11.
13. Аденовирусный вектор, содержащий:
по меньшей мере один трансген и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фибры, где полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 98% идентичностью с аминокислотами 6-375 из SEQ ID NO:1.

14. Аденовирусный вектор по п.13, где полипептид фибры содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:1), варианта полипептида фибры BB21 (SEQ ID NO:58) или полипептида фибры BB24 (SEQ ID NO:2).

15. Аденовирусный вектор по п.13 или п.14, дополнительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, включающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:4.

16. Аденовирусный вектор по п.15, где полипептид гексона содержит аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей полипептида гексона BB21 (SEQ ID NO:5) или полипептида гексона BB24 (SEQ ID NO:6).

17. Аденовирусный вектор по любому из пп. 13-16, где аденовирусный вектор дополнительно включает делецию E1.

18. Аденовирусный вектор по любому из пп. 13-17, где аденовирусный вектор дополнительно включает делецию E3.

19. Аденовирусный вектор по любому из пп. 13-18, где аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты аденовируса человека.

20. Аденовирусный вектор по п.19, где последовательности нуклеиновой кислоты аденовируса человека происходят из аденовируса-4 человека, аденовируса-5 человека, аденовируса-26 человека или аденовируса-35 человека.

21. Аденовирусный вектор по п.20, где аденовирусный вектор содержитorf6 E4 аденовируса-5 человека (hAdv-5).

22. Аденовирусный вектор по любому из пп. 13-21, где трансген расположен в сайте делеции E1, в сайте делеции E3 или в участке, прилегающем к правому инвертированному концевому повтору (rITR).

23. Аденовирусный вектор по любому из пп. 13-22, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29.

24. Аденовирусный вектор по любому из пп. 13-14 и пп. 17-23, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO:51 или SEQ ID NO:55.

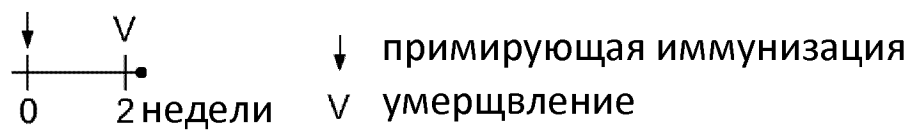
25. Вакцина, содержащая аденовирусный вектор по любому из пп. 13-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту вакцины по п.25.

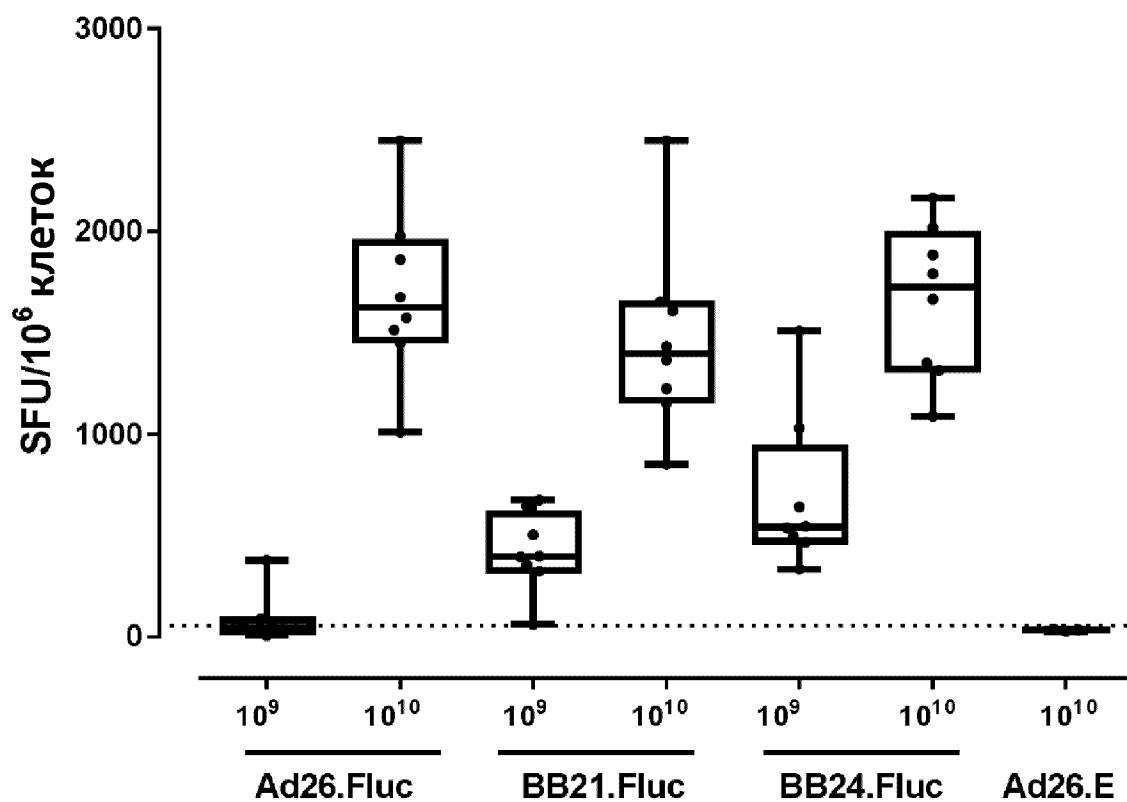
27. Способ получения вакцины, включающий комбинирование аденовирусного вектора по любому из пп. 13-24 с фармацевтически приемлемым носителем.

По доверенности

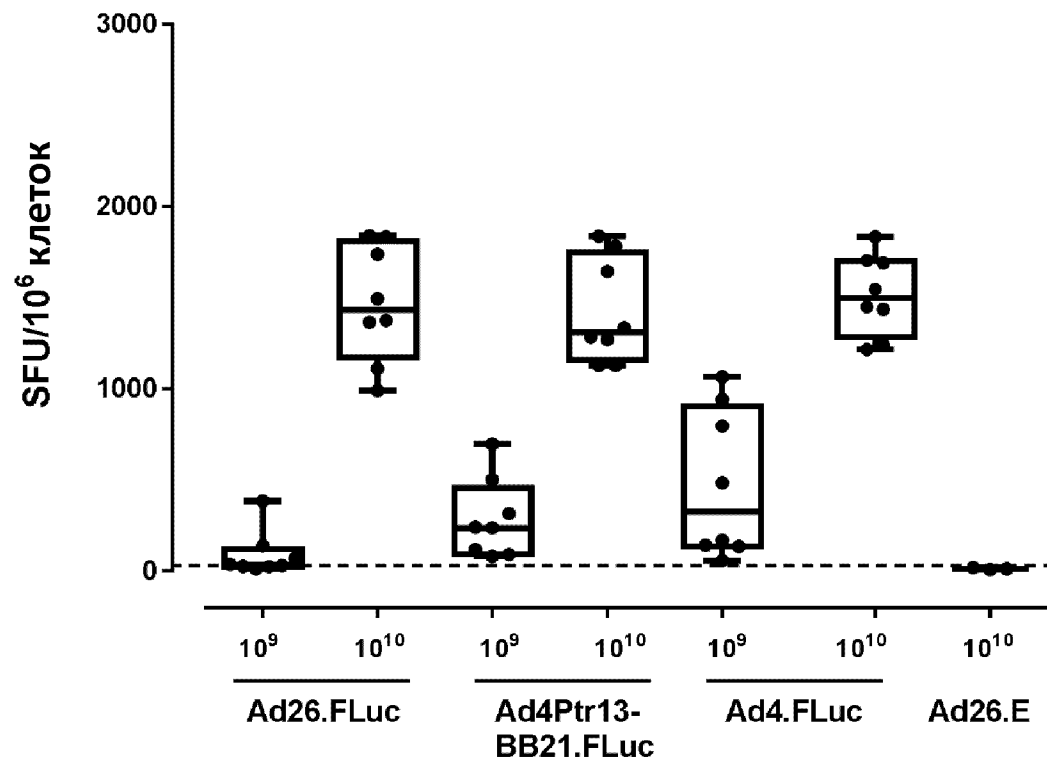
1/20



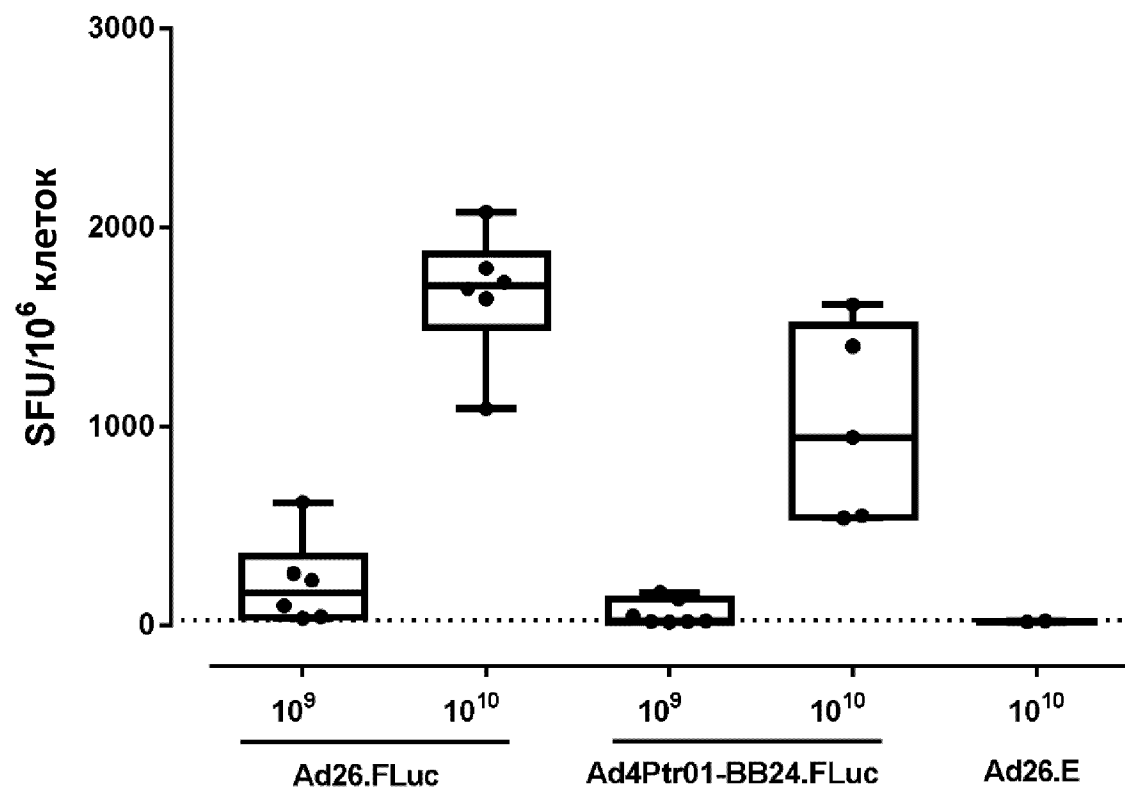
Фиг. 1А



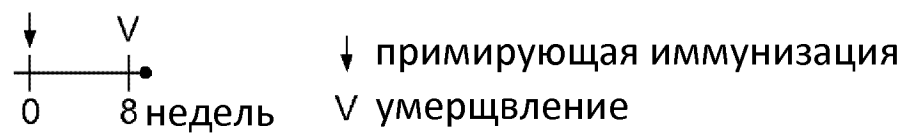
Фиг. 1В



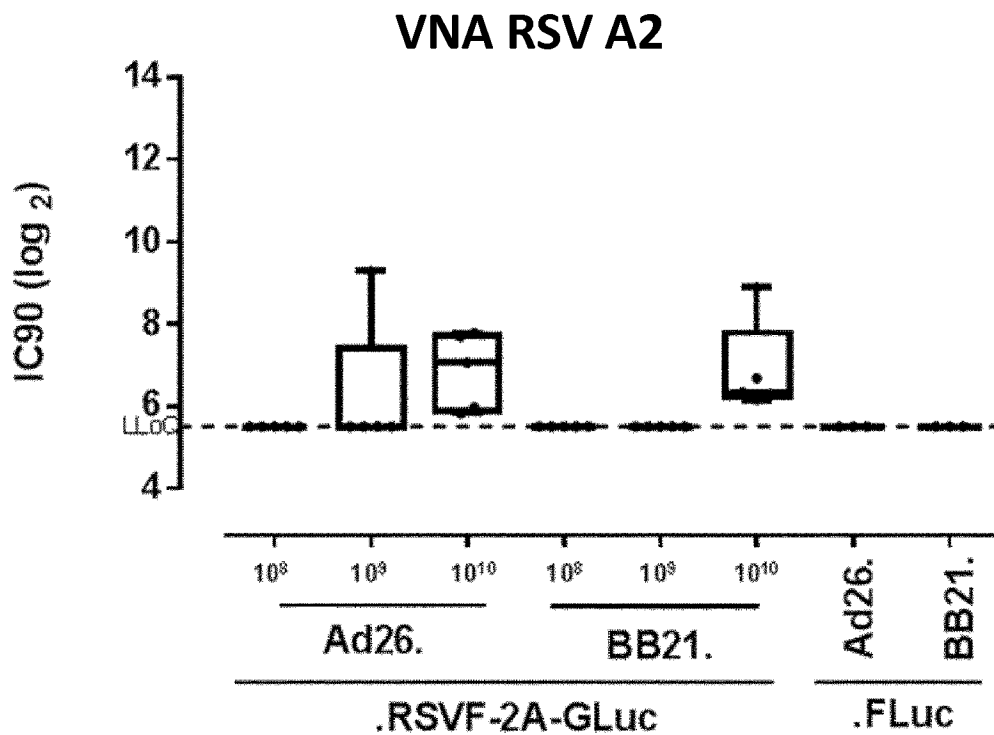
Фиг. 2



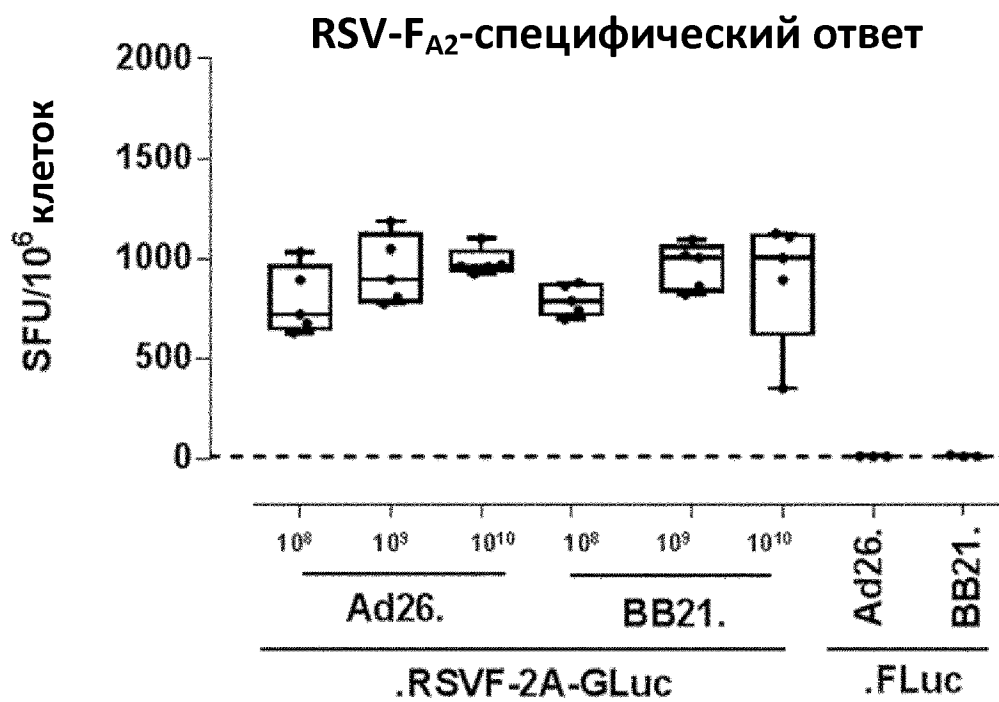
Фиг. 3



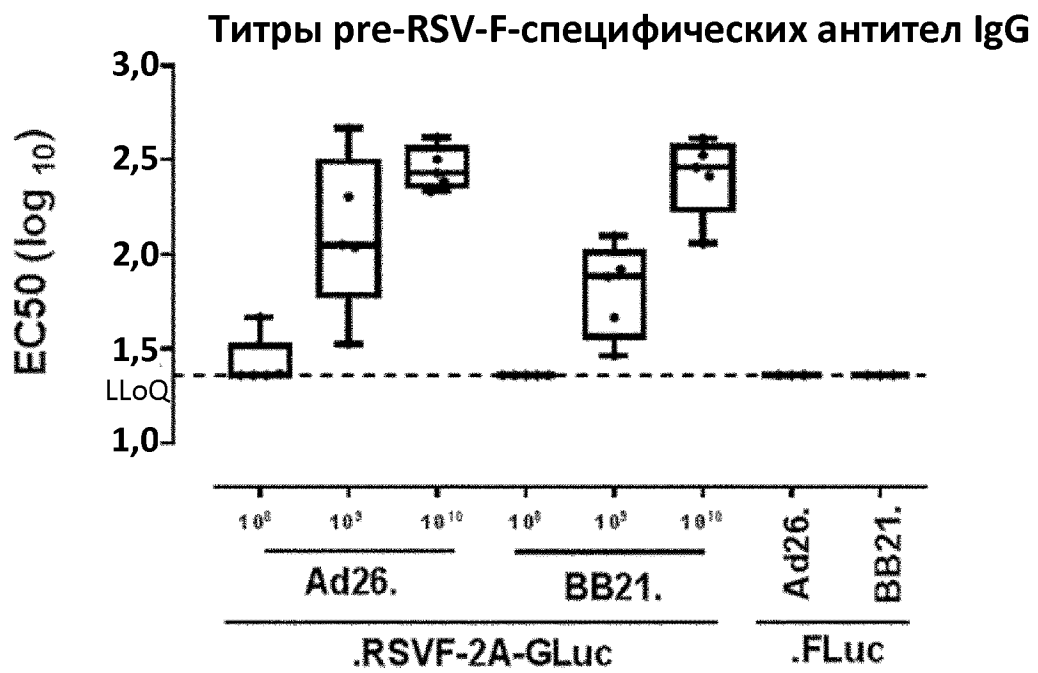
Фиг. 4А



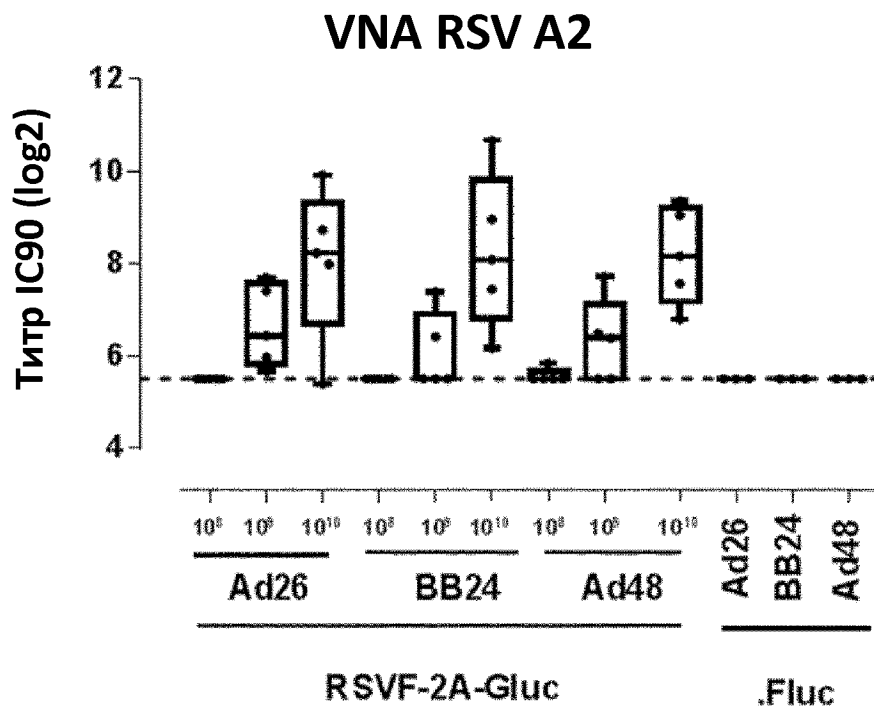
Фиг. 4В



Фиг. 4С

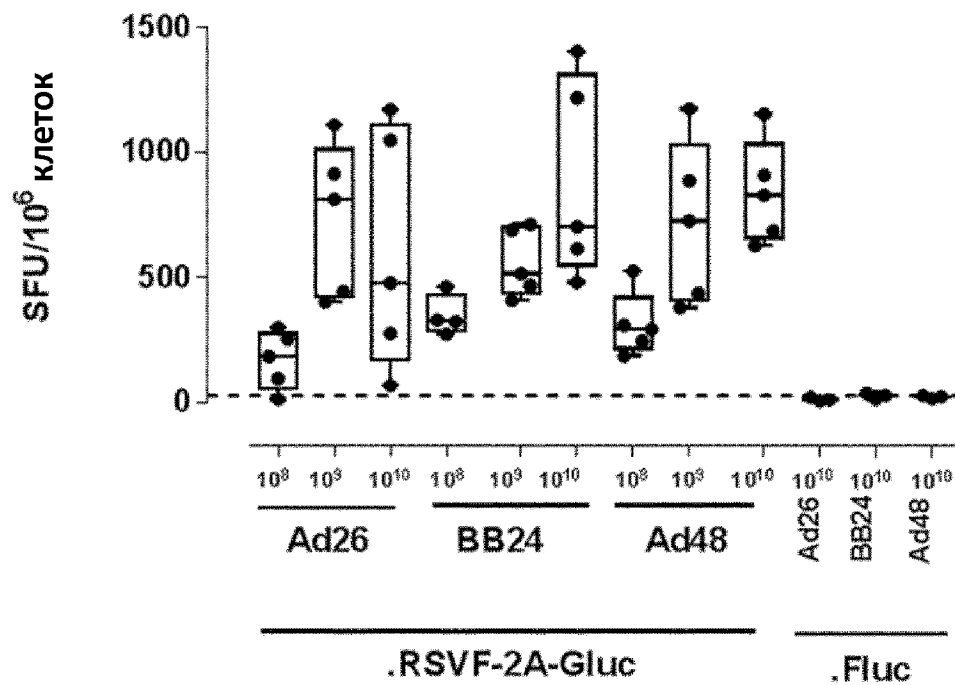


Фиг. 4D



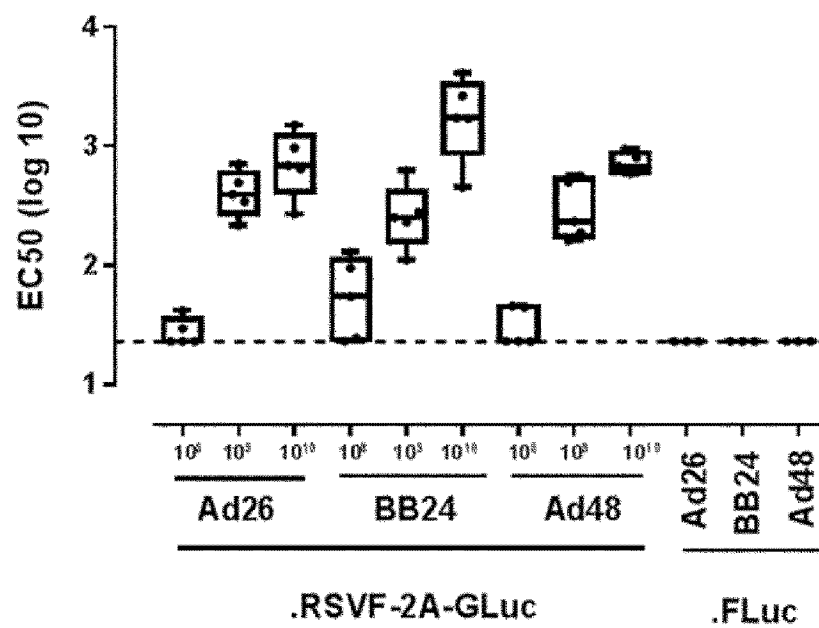
Фиг. 5A

RSV-F_{A2}-специфический ответ

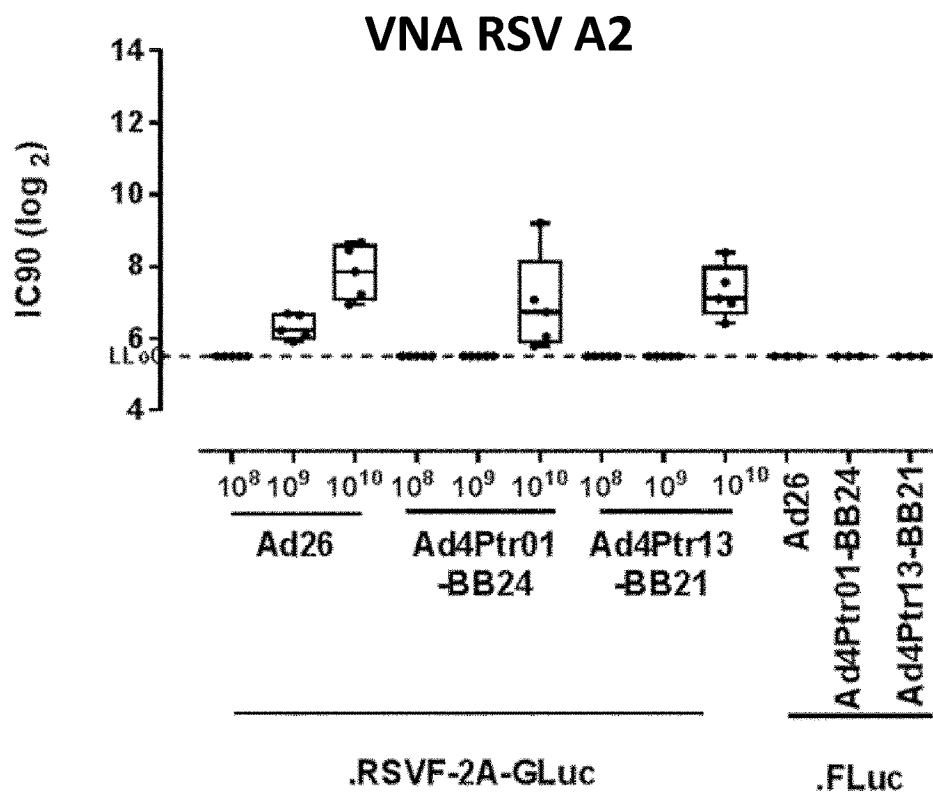


Фиг. 5В

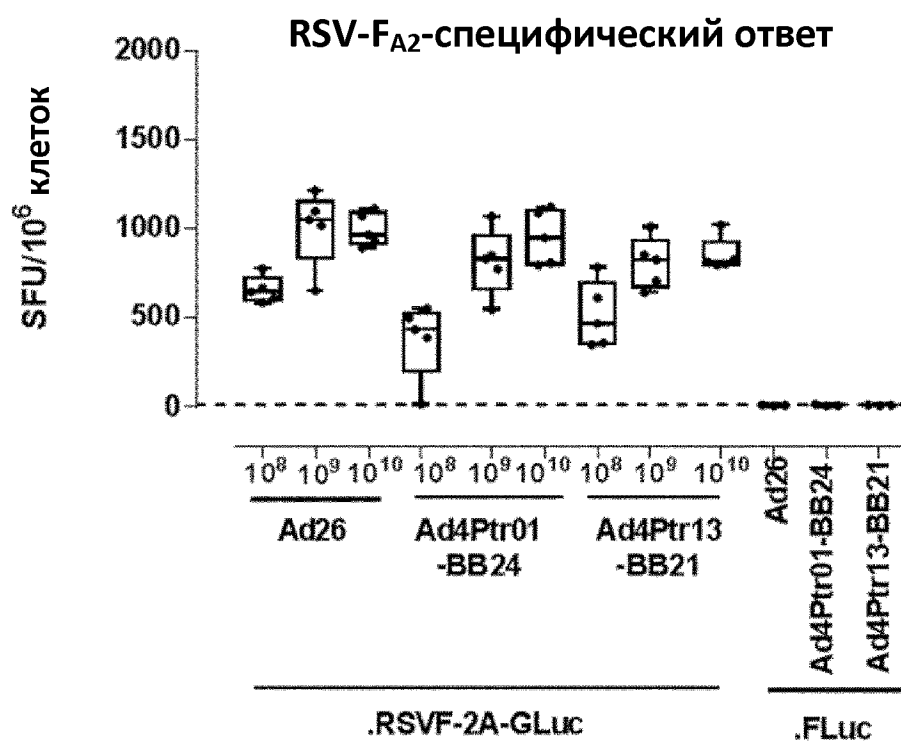
Титры pre-RSV-F-специфических антител IgG



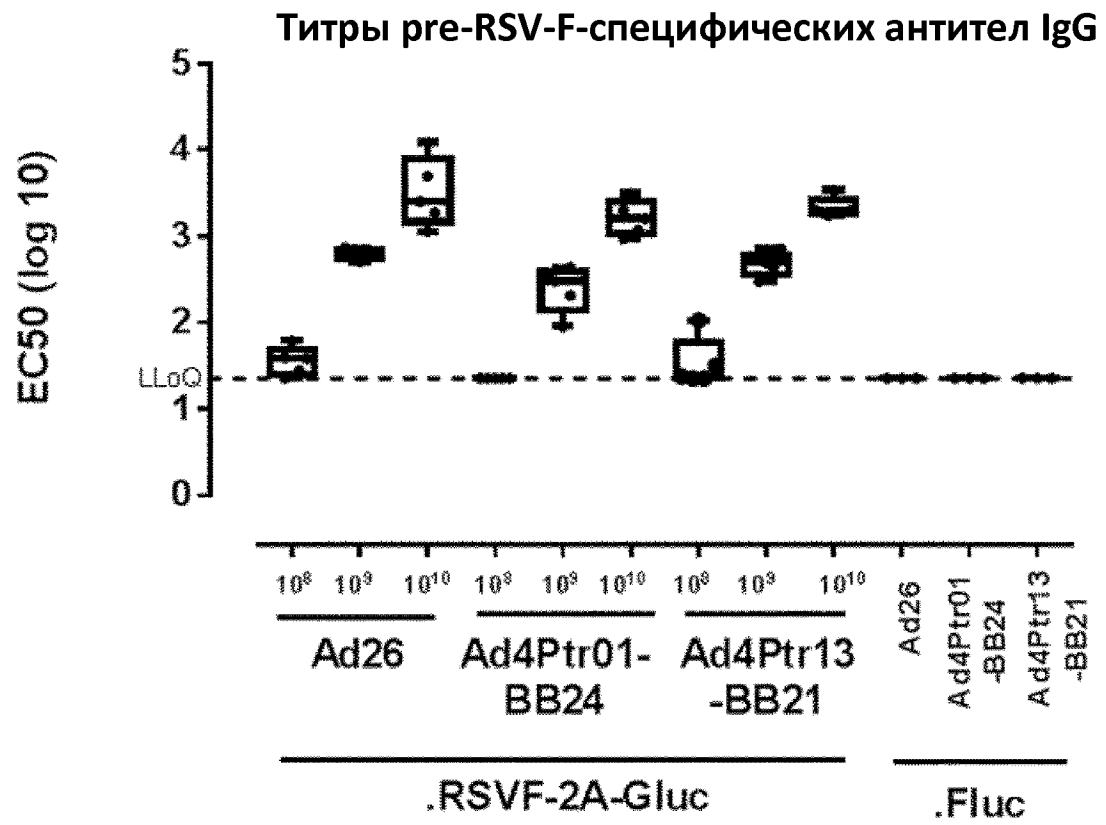
Фиг. 5С



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 6С

		Аденовирусные векторы								
		Ad35 (B)	Ad26 (D)	Ad49 (D)	Ad5 (C)	Ad4 (E)	Ad4Ptr01- BB24 (E)	Ad4Ptr13- BB21 (E)	BB21 (E)	BB24 (E)
Образцы сыворотки крови*	Ad35 (B)	13384	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	Ad26 (D)	<16	2786	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	Ad49 (D)	<16	<16	365	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	Ad5 (C)	<16	<16	<16	6007	<16	<16	<16	<16	<16
	Ad4 (E)	<16	<16	<16	<16	1914	<16	<16	<16	<16
	Ad4Ptr01-BB24 (E)	<16	<16	<16	<16	<16	1104	<16	<16	<16
	Ad4Ptr13-BB21 (E)	<16	<16	<16	<16	<16	<16	1548	16,39	<16
	BB21 (E)	<16	<16	<16	<16	<16	<16	20,16	844	<16
	BB24 (E)	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	157

* 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

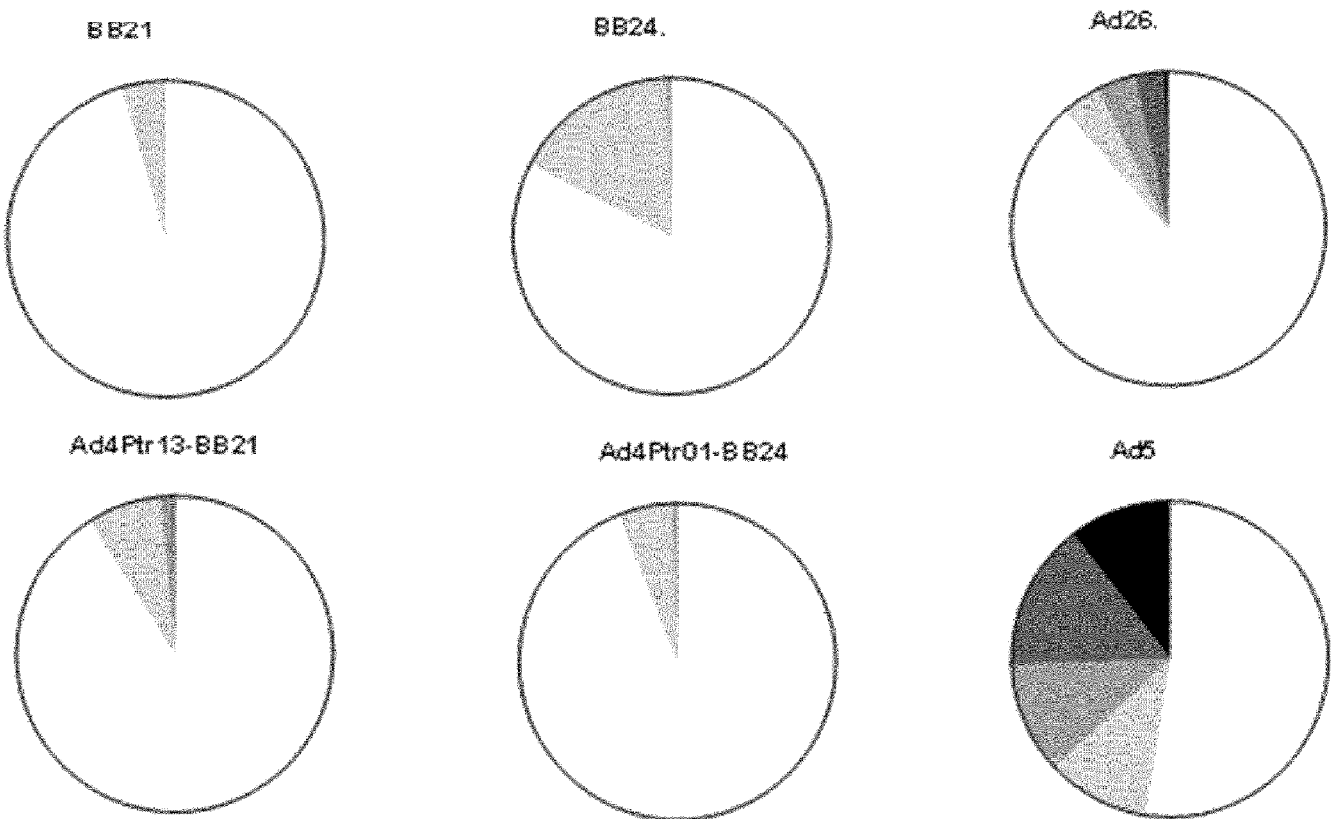
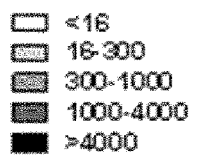
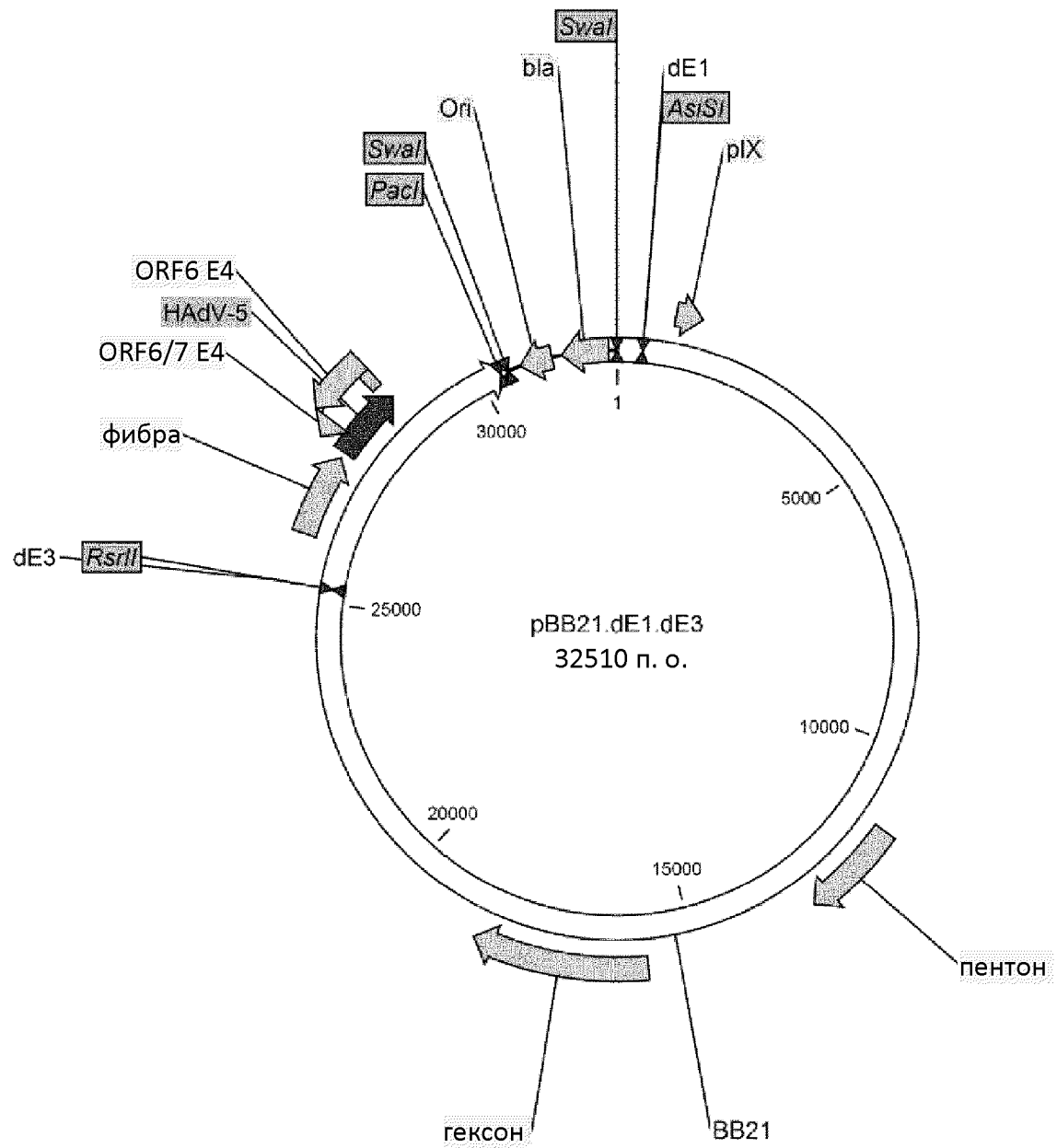
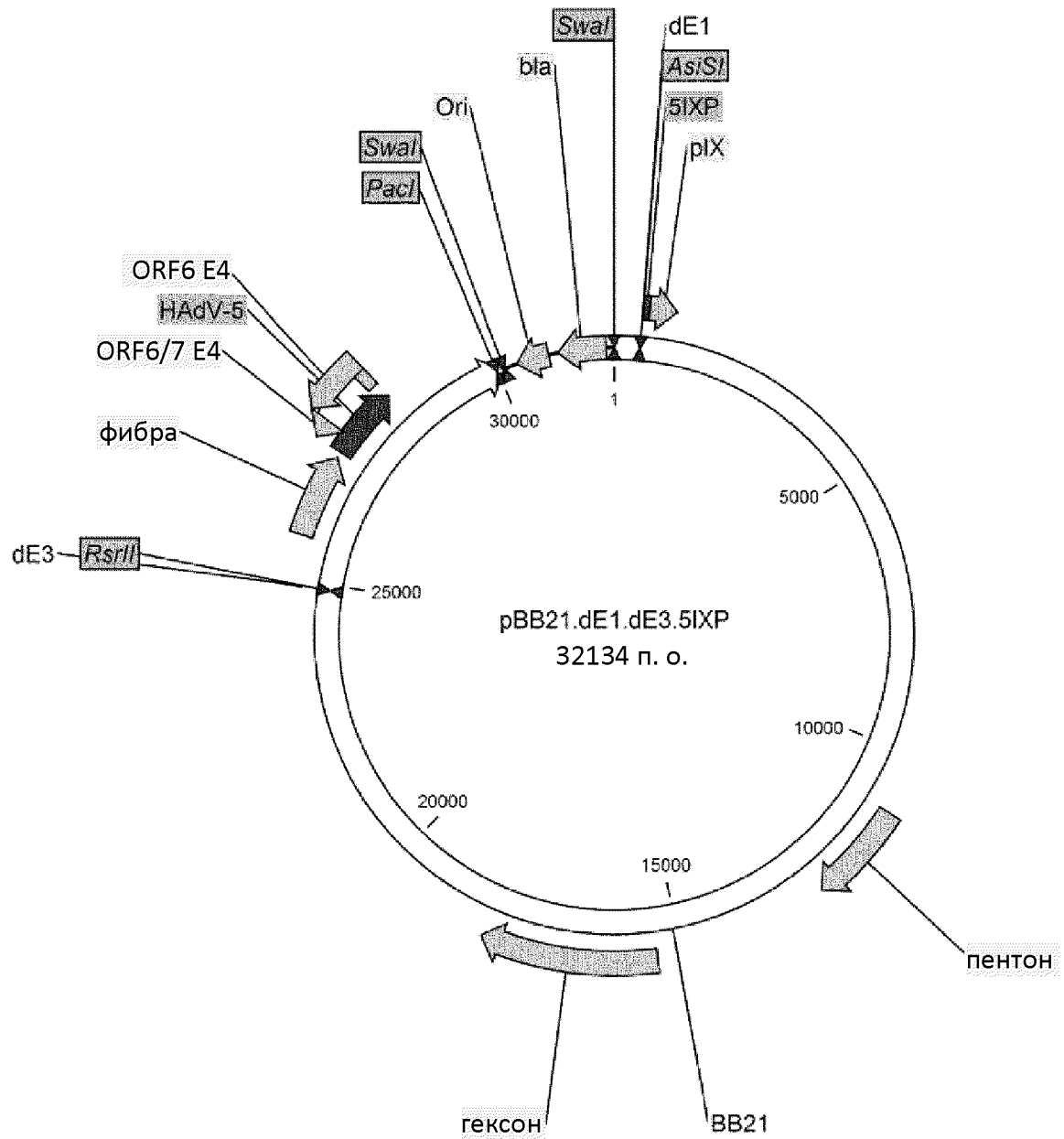


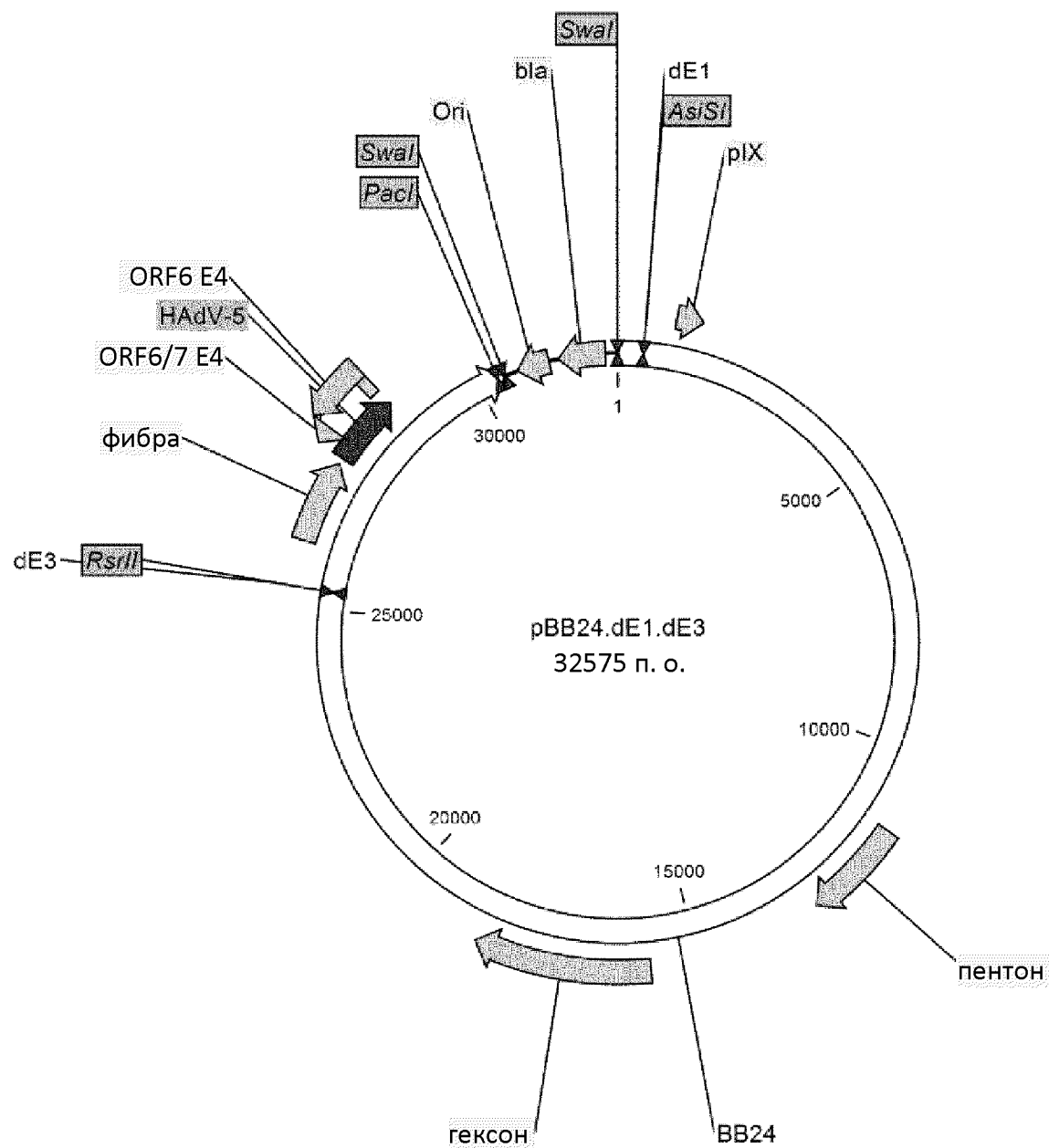
FIG. 8



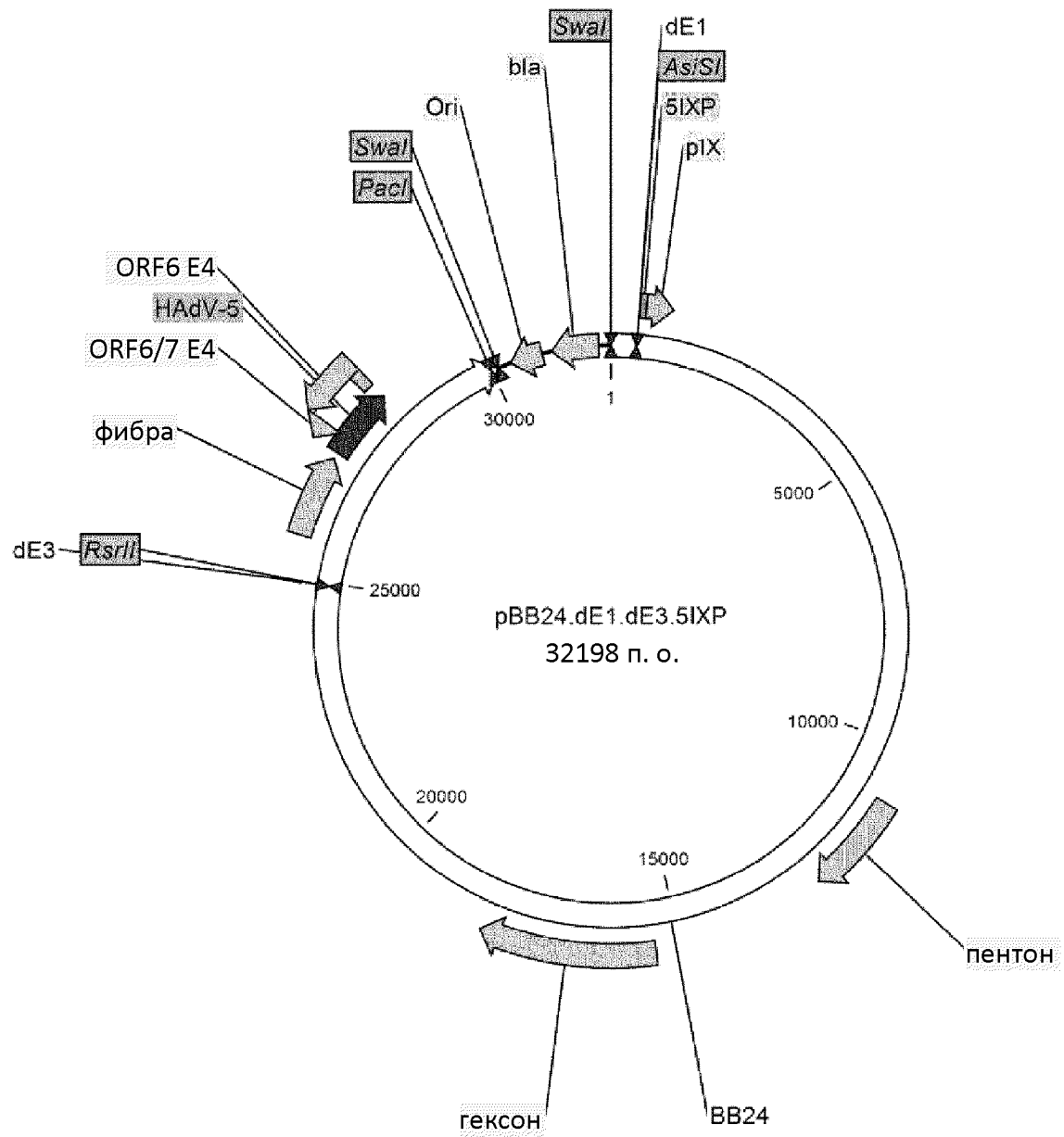
Фиг. 9



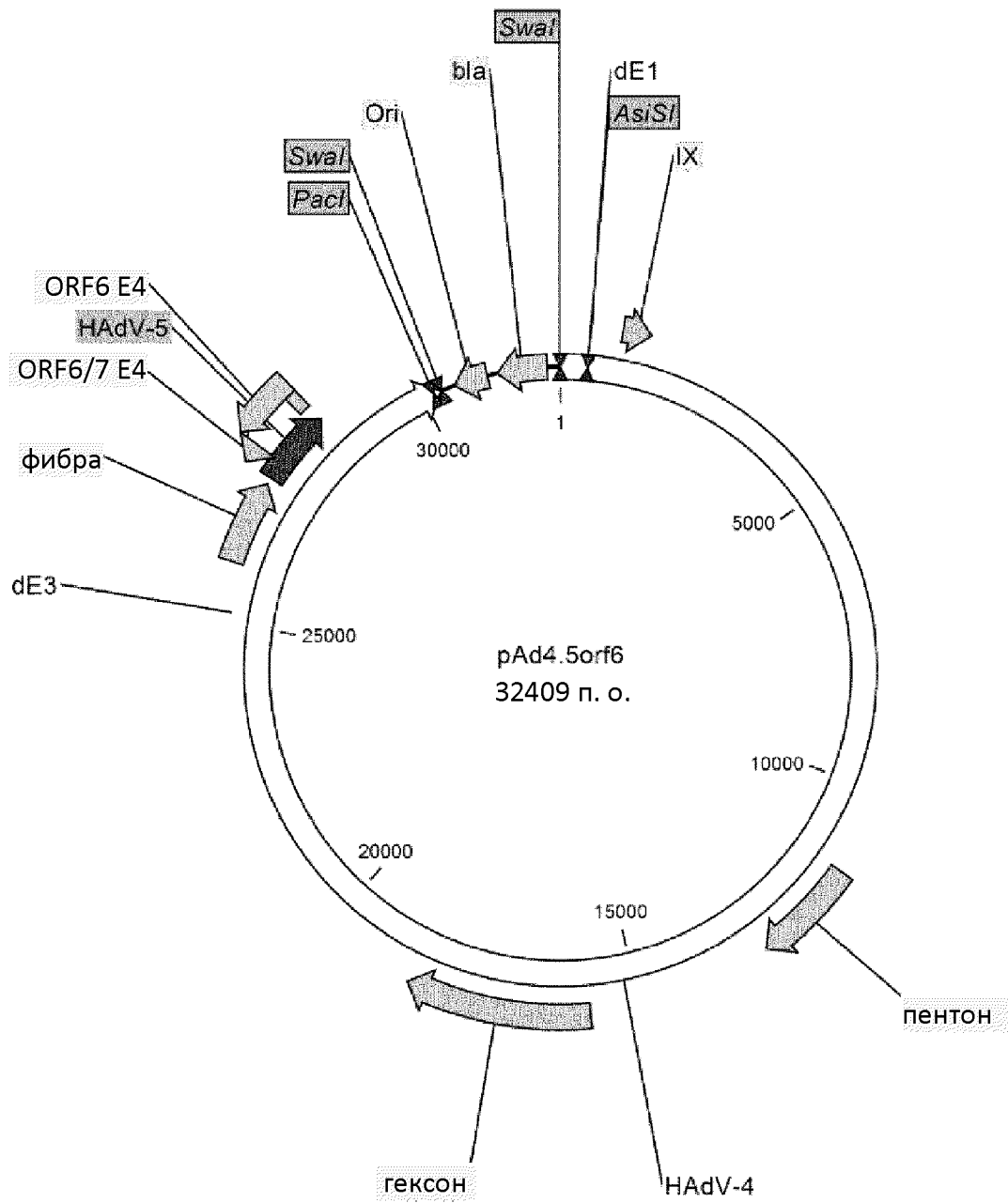
Фиг. 10



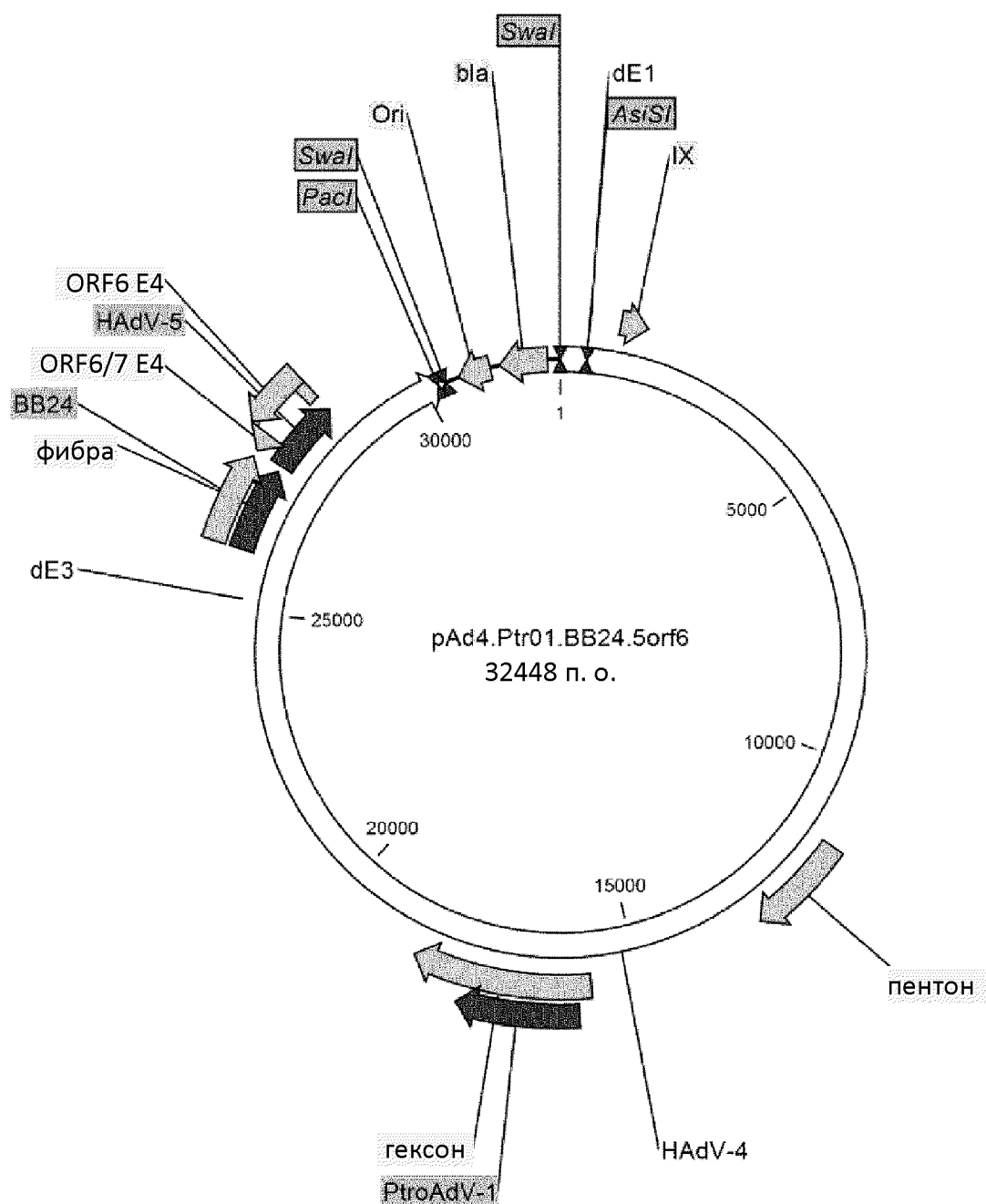
Фиг. 11



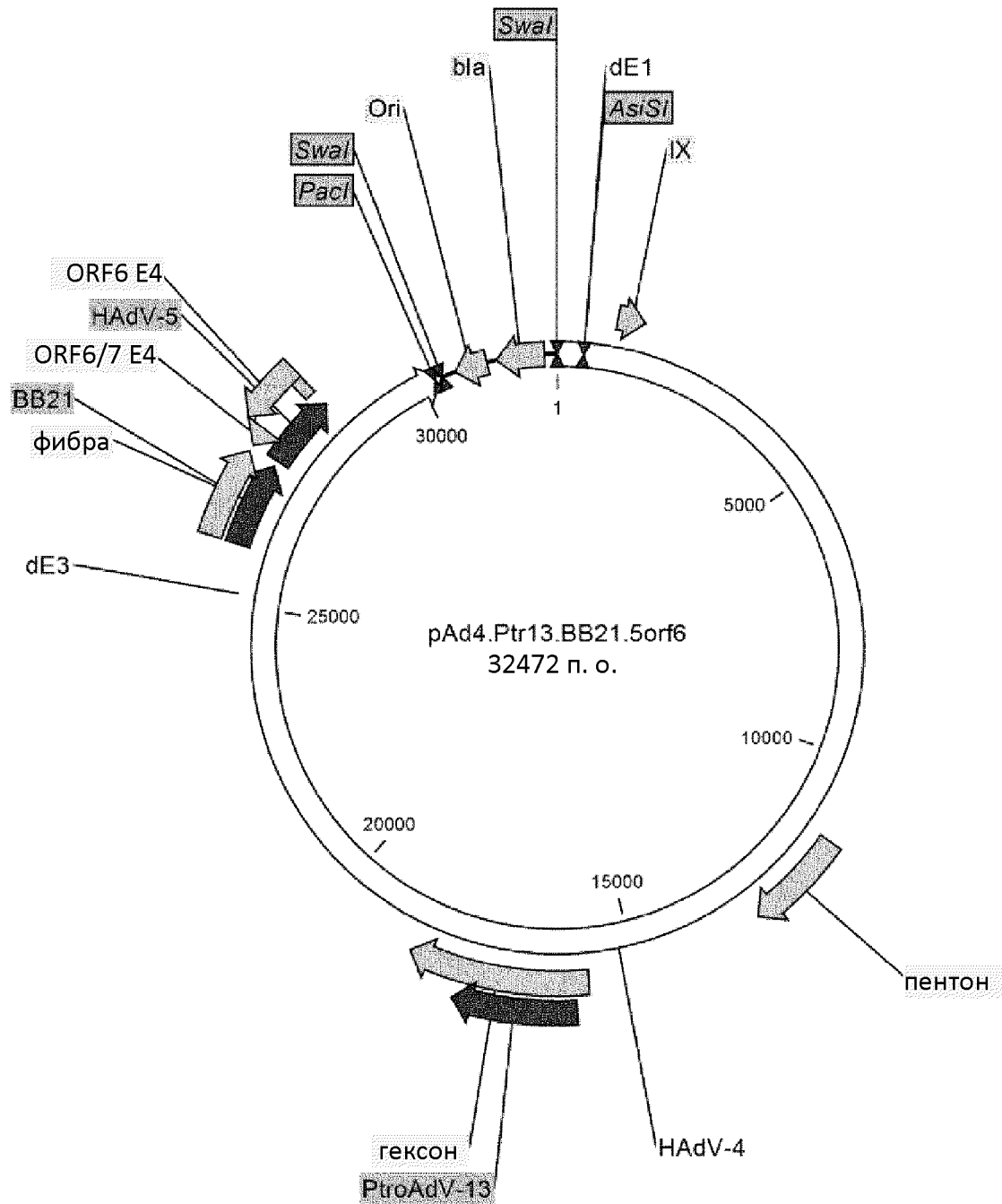
Фиг. 12



Фиг. 13



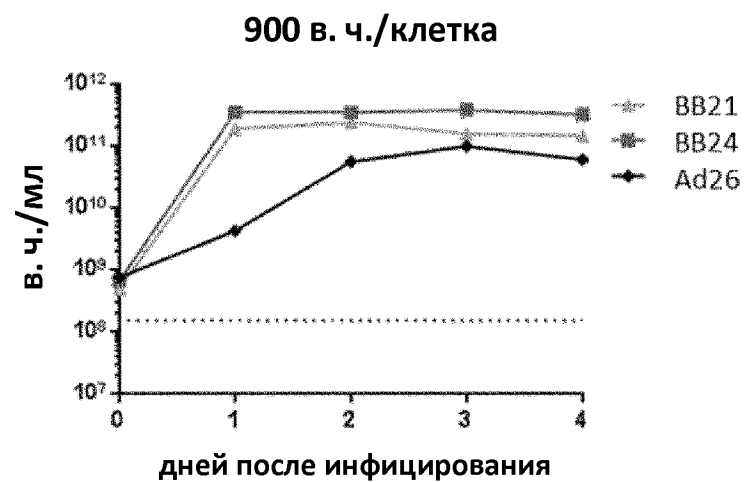
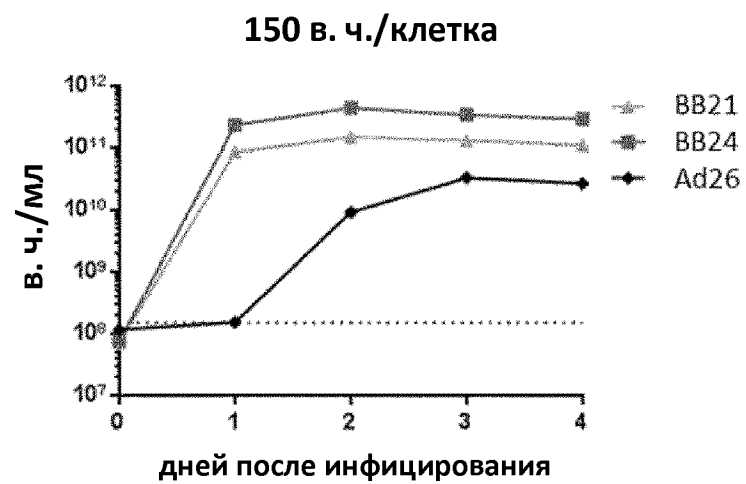
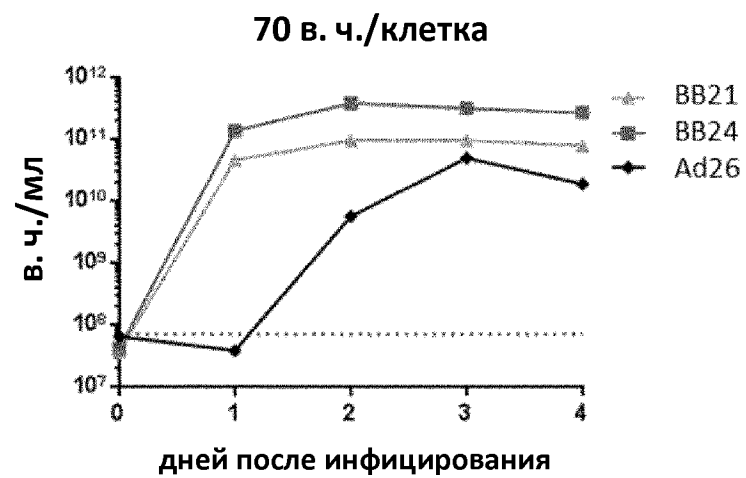
Фиг. 14



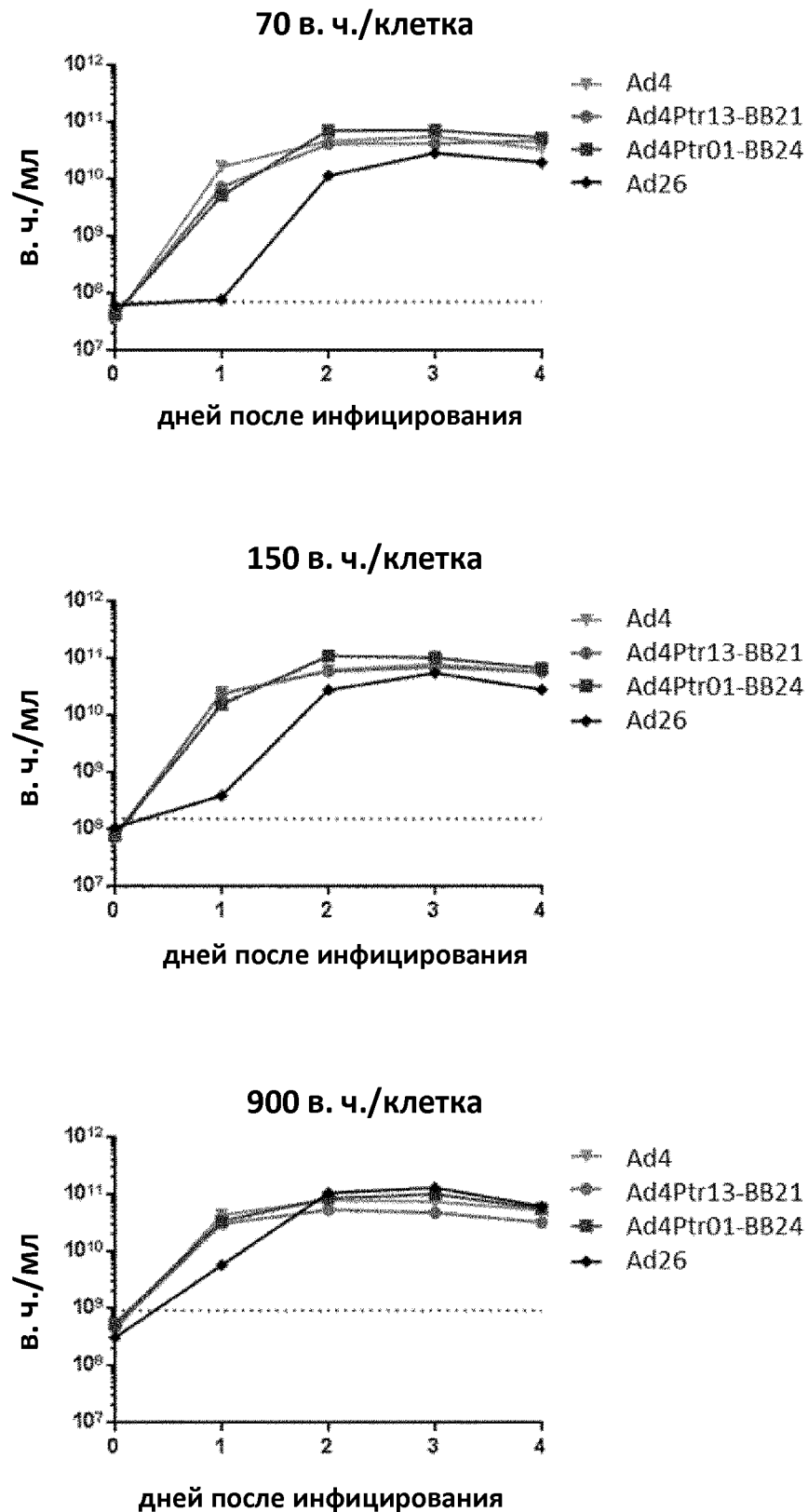
Фиг. 15

Фибра BB21	MSKKRARVDD	GFDPVYPYDA	DNAPTVPFIN	PPFVSSDGFQ	EKPLGVLSLR	50
Вариант фибры BB21						50
Фибра BB24						50
Фибра BB21	LADPVTTKNG	AVTLKLGEGV	DLDDSGKLIS	KNATKATAPL	SISNNTISLN	100
Вариант фибры BB21						100
Фибра BB24						100
Фибра BB21	MDAPLYNNNG	KLGI RIGAPL	KVVDLLNTLA	VAYGSGLGLK	NNALTVQLVS	150
Вариант фибры BB21						150
Фибра BB24		E.....	Q.....V.....			150
Фибра BB21	PLTFDNKGNV	KINLGNGLPT	VAANRLSVTC	KRGLYVTTTG	DALESNISWA	200
Вариант фибры BB21						200
Фибра BB24						200
Фибра BB21	KGIRFEGNAI	AANIGKGLEF	GTTSESSEDS	NAYPIQVKLG	TGLTFDSTGA	250
Вариант фибры BB21						250
Фибра BB24						250
Фибра BB21	IVAWNKEDDK	LT LWTTADPS	PNCKIYSEKD	AKLTLCLTKC	GSQILGTVTV	300
Вариант фибры BB21						300
Фибра BB24						300
Фибра BB21	LAVNNGSLNP	ITNAVSTAIV	YLKFDANGVL	LSNSTLNKEY	WNFRKGDVTP	350
Вариант фибры BB21	K.....					350
Фибра BB24		I.....				350
Фибра BB21	AEAYTNAIGF	MPNIKAYPKN	TNVASKSHIV	GQVYLNGDET	KPLMLIITFN	400
Вариант фибры BB21						400
Фибра BB24						400
Фибра BB21	ETDDATCTYC	ITFQWKWDNS	KYTGETLATS	SFPFSYIAQE		440
Вариант фибры BB21						440
Фибра BB24	E.....					440

19/20



Фиг. 17



Фиг. 18