

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042571**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.27**

(21) Номер заявки  
**201991116**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.12.07**

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61K 39/235* (2006.01)  
*C07K 14/075* (2006.01)  
*C12N 15/861* (2006.01)

---

(54) **ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ И ПОЛИПЕПТИДЫ АДЕНОВИРУСА**

---

(31) **1620968.6**

(32) **2016.12.09**

(33) **GB**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/IB2017/057738**

(87) **WO 2018/104911 2018.06.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН  
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:  
**Аммендола Вирджиния, Капоне  
Стефаниа, Коллока Стефано,  
Фольгори Антонелла, Мероне Розелла  
(IT)**

(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2005071093  
WO-A1-2016198621**

---

(57) Данное изобретение относится к последовательностям выделенных полинуклеотидов и полипептидов, имеющих происхождение из нового аденовируса шимпанзе ChAd157, а также к рекомбинантным полинуклеотидам, векторам, аденовирусам, клеткам и композициям, содержащим указанные последовательности полинуклеотидов и полипептидов.

---

**B1**

**042571**

**042571  
B1**

### Область изобретения

Данное изобретение относится к последовательностям выделенных полинуклеотидов и полипептидов, имеющих происхождение из нового аденовируса шимпанзе ChAd157, а также к рекомбинантным полинуклеотидам, векторам, аденовирусам, клеткам и композициям, содержащим указанные последовательности полинуклеотидов и полипептидов.

#### Предшествующий уровень техники

Аденовирусы широко применяли для переноса генов благодаря их способности обеспечивать высокоэффективный перенос генов в различных тканях-мишенях и большой трансгенной емкости. Обычно осуществляют делецию генов E1 аденовируса и заменяют их трансгенной кассетой, состоящей из выбранного промотора, последовательности кДНК (комплементарная ДНК) гена, представляющего интерес, и сигнала поли A (полиаденилирования), в результате чего получается дефектный по репликации рекомбинантный аденовирус.

Рекомбинантные аденовирусы полезны в генной терапии и в качестве вакцин. При разработке генетических вакцин вирусные векторы на основе аденовируса шимпанзе являются альтернативой применению векторов на основе аденовирусов, имеющих происхождение из человека. Аденовирусы, выделенные у шимпанзе, близкородственны аденовирусам, выделенным у человека, о чем свидетельствует их эффективное размножение в клетках человеческого происхождения. Однако поскольку аденовирусы человека и шимпанзе являются близкородственными, между двумя видами вирусов возможна серологическая перекрестная реактивность.

Существует потребность в векторах, которые будут эффективно доставлять молекулы к мишени и минимизировать влияние предсуществующего в популяции иммунитета к отдельным серотипам аденовирусов. Одним аспектом предсуществующего иммунитета, который наблюдается у человека, является гуморальный иммунитет, который может привести к продуцированию и персистенции антител, специфических к аденовирусным белкам. Гуморальный ответ, вызываемый аденовирусом, преимущественно направлен против трех основных структурных белков капсида: фибриллы, пентона и гексона.

#### Сущность изобретения

Предложен выделенный полинуклеотид, который кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

- (а) полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и
- (б) функционального производного полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Также предложен рекомбинантный полинуклеотид, содержащий полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из:

- (а) полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и
- (б) полинуклеотида, кодирующего функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Также предложен рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из:

- (а) полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и
- (б) полинуклеотида, кодирующего функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Также предложен рекомбинантный аденовирус, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид или полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

- (а) полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- (б) полинуклеотида, кодирующего функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;
- (в) полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и
- (г) функционального производного полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Также предложена композиция, содержащая по меньшей мере одно из следующего:

(а) выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(б) выделенный полинуклеотид, кодирующий функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(в) выделенный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(г) выделенное функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(д) вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в (а) или (б) выше, и

(е) рекомбинантный аденовирус, содержащий полинуклеотид, описанный в (а) или (б) выше, и и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Также предложена клетка, содержащая по меньшей мере одно из следующего:

(а) выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

(б) выделенный полинуклеотид, кодирующий функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1;

(в) вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в (а) или (б) выше, и

(г) рекомбинантный аденовирус, содержащий полинуклеотид, описанный в (а) или (б) выше.

Также предложен выделенный аденовирусы полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

(а) полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и

(б) функционального производного полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1А-Г - выравнивание последовательностей белка фибриллы указанных аденовирусов обезьян.

ChAd157 (SEQ ID NO: 1), ChAd3 (SEQ ID NO: 27), PanAd3 (SEQ ID NO: 28), ChAd17 (SEQ ID NO: 29), ChAd19 (SEQ ID NO: 30), ChAd24 (SEQ ID NO: 31), ChAd155 (SEQ ID NO: 7), ChAd11 (SEQ ID NO: 32), ChAd20 (SEQ ID NO: 33), ChAd31 (SEQ ID NO: 34), PanAd1 (SEQ ID NO: 35), PanAd2 (SEQ ID NO: 36).

Фиг. 2 - схематическое изображение челнока ВАС (искусственной бактериальной хромосомы) подгруппы С.

Фиг. 3 - схематическое изображение челночной плазмиды подгруппы С.

Фиг. 4 - схематическое изображение вектора рChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG.

Фиг. 5 - схематическое изображение челнока рARS SpeciesC Ad5orf6-2.

Фиг. 6 - схематическое изображение плазмиды, несущей ChAd157 RG.

Фиг. 7 - экспрессия трансгена ChAd157/GAG, ChAd19/GAG и ChAd155/GAG.

Фиг. 8 - анализ методом вестерн-блоттинг лизатов клеток Hela, инфицированных ChAd155/RG и ChAd157/RG.

Фиг. 9 - иммуногенность ChAd157/GAG, ChAd155/GAG и ChAd19 GAG у мышей BALB/c.

Фиг. 10 - иммуногенность ChAd157/RG и ChAd155/RG у мышей BALB/c.

Фиг. 11 - нейтрализующие титры после предварительной иммунизации мышей различными векторами ChAd.

Фиг. 12 - IFN-γ ELISpot после вакцинации мышей ChAd157/GAG после различных схем предварительной иммунизации.

#### **Описание последовательностей**

SEQ ID NO: 1 - полипептидная последовательность фибриллы ChAd157.

SEQ ID NO: 2 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая фибриллу ChAd157.

SEQ ID NO: 3 - полипептидная последовательность пентона ChAd157.

SEQ ID NO: 4 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая пентон ChAd157.

SEQ ID NO: 5 - полипептидная последовательность гексона ChAd157.

SEQ ID NO: 6 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая гексон ChAd157.

SEQ ID NO: 7 - полипептидная последовательность фибриллы ChAd155.

SEQ ID NO: 8 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая фибриллу ChAd155.

SEQ ID NO: 9 - полипептидная последовательность пентона ChAd155.

- SEQ ID NO: 10 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая пентон ChAd155.  
 SEQ ID NO: 11 - полипептидная последовательность гексона ChAd155.  
 SEQ ID NO: 12 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая гексон ChAd155.  
 SEQ ID NO: 13 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая ChAd155 дикого типа.  
 SEQ ID NO: 14 - полинуклеотидная последовательность челночной ВАС подгруппы С (#1365).  
 SEQ ID NO: 15 - полинуклеотидная последовательность рChAd157ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551.  
 SEQ ID NO: 16 - полинуклеотидная последовательность HIV Gag.  
 SEQ ID NO: 17 - полинуклеотидная последовательность рChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557.  
 SEQ ID NO: 18 - полинуклеотидная последовательность 1 праймера Ad5orf6.  
 SEQ ID NO: 19 - полинуклеотидная последовательность 2 праймера Ad5orf6.  
 SEQ ID NO: 20 - полинуклеотидная последовательность 1 праймера Fiber-E4 polyA.  
 SEQ ID NO: 21 - полинуклеотидная последовательность 2 праймера Fiber-E4 polyA.  
 SEQ ID NO: 22 - полинуклеотидная последовательность ChAd157 ΔE1E4\_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594.  
 SEQ ID NO: 23 - полинуклеотидная последовательность гликопротеина вируса бешенства.  
 SEQ ID NO: 24 - полинуклеотидная последовательность рChAd157 ΔE1E4\_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559.  
 SEQ ID NO: 25 - полинуклеотидная последовательность праймера CMVfor.  
 SEQ ID NO: 26 - полинуклеотидная последовательность праймера CMVrev.  
 SEQ ID NO: 27 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd3.  
 SEQ ID NO: 28 - аминокислотная последовательность белка фибриллы PanAd3.  
 SEQ ID NO: 29 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd17.  
 SEQ ID NO: 30 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd19.  
 SEQ ID NO: 31 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd24.  
 SEQ ID NO: 32 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd11.  
 SEQ ID NO: 33 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd20.  
 SEQ ID NO: 34 - аминокислотная последовательность белка фибриллы ChAd31.  
 SEQ ID NO: 35 - аминокислотная последовательность белка фибриллы PanAd1.  
 SEQ ID NO: 36 - аминокислотная последовательность белка фибриллы PanAd2.  
 SEQ ID NO: 37 - полинуклеотидная последовательность hCMV(tetO).  
 SEQ ID NO: 38 - полинуклеотидная последовательность челночной плазмиды подгруппы С #1376.  
 SEQ ID NO: 39 - полинуклеотидная последовательность BGN polyA.  
 SEQ ID NO: 40 - полинуклеотидная последовательность рARS SpeciesC Ad5orf6-2.  
 SEQ ID NO: 41 - полинуклеотидная последовательность зонда CMVFAM-TAMRA.  
 SEQ ID NO: 42 - полинуклеотидная последовательность, кодирующая усиленный промотор hCMV.

#### Подробное описание изобретения

Векторы, композиции и способы по данному изобретению могут обладать одной или более улучшенными характеристиками относительно существующего уровня техники, включая более высокую продуктивность, улучшенную иммуногенность, повышенную экспрессию трансгена или определенный профиль серологической перекрестной реактивности, не ограничиваясь ими.

Векторы, композиции и способы по данному изобретению могут демонстрировать комбинацию свойств, таких как продуктивность, иммуногенность, экспрессия трансгена и/или серологическая перекрестная реактивность, что означает, что они представляют важную альтернативу известным подходам.

Аденовирус.

Аденовирусы отличаются характерной морфологией с икосаэдрическим капсидом, содержащим три основных белка: гексон (II), основание пентона (III) и булавоподобная фибрилла (IV), а также несколько других минорных белков: VI, VIII, IX, Ша и IVa2. Вирусный геном представлен линейной двуцепочечной ДНК. Вирусная ДНК находится в тесной связи с высокоосновным белком VII и малым пептидом рХ (ранее обозначавшимся мю). Другой белок, V, упакован внутри данного комплекса ДНК-белок и обеспечивает структурную связь с капсидом через белок VI. Вирус также содержит кодируемую вирусом протеазу, которая необходима для процессинга некоторых структурных белков для продуцирования зрелого инфекционного вируса.

Геном аденовируса хорошо охарактеризован. Общая организация генома аденовирусов обычно консервативна в том, что определенные открытые рамки считывания имеют одинаковое расположение, например, расположение генов E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 и L5 каждого вируса. С каждой стороны на концах аденовирусного генома содержится последовательность, известная как инвертированный концевой повтор (ITR), необходимая для вирусной репликации. Вирус также содержит кодируемую вирусом протеазу, которая необходима для процессинга некоторых структурных белков, требующихся для продуцирования патогенных вирионов. Структуру аденовирусного генома описывают в соответствии с порядком, в котором вирусные гены экспрессируются после трансдукции клеток-хозяев. Более конкретно, вирусные гены обозначают как ранние (E) или поздние (L) гены в зависимости от того,

происходит ли их транскрипция до или после начала репликации ДНК. На ранней фазе транскрипции экспрессируются гены аденовируса E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4, чтобы подготовить клетку-хозяина к репликации вируса. На поздней фазе инфекции активируется экспрессия поздних генов L1-L5, которые кодируют структурные компоненты вирусных частиц.

Аденовирусы являются видоспецифичными, и у разных видов млекопитающих были выделены различные серотипы, то есть типы вируса, которые не подвергаются перекрестной нейтрализации антителами. Например, у человека было выделено более 50 серотипов, которые делят на шесть подгрупп (A-F; B подразделяют на B1 и B2) на основе гомологии последовательностей и их способности вызывать агглютинацию эритроцитов (Tatsis and Ertl *Molecular Therapy* (2004) 10:616-629). У обезьян, таких как шимпанзе, бонобо, макаки резус и гориллы, выделили множество аденовирусов, которые классифицировали на такие же группы, как у человека, на основании филогенетических связей, установленных на основании последовательностей гексона или фибриллы (Colloca et al. (2012) *Science Translational Medicine* 4:1-9; Roy et al. (2004) *Virology* 324:361-372; Roy et al. (2010) *Journal of Gene Medicine* 13:17-25).

В WO2005071093 описаны аденовирусы шимпанзе, включая ChAd19. В WO2016198621 (PCT/EP2016/063329) описаны аденовирусы шимпанзе ChAd155, данный документ включен путем ссылки для определения векторов, имеющих происхождение от ChAd155.

Белки капсида аденовируса, включая белок фибриллу, и полинуклеотиды, кодирующие указанные белки.

Как упоминалось выше, капсид аденовируса содержит три основных белка, гексон, пентон и фибриллу. Гексон составляет большинство структурных компонентов капсида, который состоит из 240 тримерных капсомеров типа гексон и 12 оснований пентона. Гексон имеет три консервативных двойных цилиндра, а на его вершине находятся три бугорка, каждый из которых содержит петлю из каждой субъединицы. Гексоны формируют большую часть капсида. Основание гексона у разных серотипов аденовируса является в высокой степени консервативным, тогда как поверхностные петли вариативны (Tatsis and Ertl *Molecular Therapy* (2004) 10:616-629).

Пентон представляет собой другой белок капсида аденовируса, который формирует пентамерное основание, к которому присоединяется фибрилла. Тримерный белок фибриллы отходит от основания пентона в каждой из 12 вершин капсида, и имеет булавообразную структуру. Наличие длинного тонкого белка фибриллы является важным отличием поверхности аденовирусных капсидов от большинства других икосаэдрических вирусов. Основная роль белка фибриллы заключается в прикреплении вирусного капсида к клеточной поверхности путем его взаимодействия с клеточным рецептором.

Белки фибриллы аденовирусов многих серотипов имеют схожую архитектуру: N-концевой хвост, центральный стебель, построенный из повторяющихся последовательностей, и C-концевой глобулярный домен, образующий шаровидное утолщение (или "головку"). Центральный стеблевой домен состоит из вариативного числа бета-повторов. Бета-повторы соединяются, образуя продолговатую структуру из трех скрученных спиральных нитей, которые являются очень жесткими и стабильными. Стебель соединяет N-концевой хвост с глобулярной шаровидной структурой, которая отвечает за взаимодействие с клеточным рецептором-мишенью. Глобулярная природа шаровидного домена аденовируса обеспечивает большую поверхность для латерального и апикального связывания с рецептором. Благодаря такой архитектуре рецептор-связывающий сайт отстоит далеко от вирусного капсида, таким образом вирус освобождается от стерических препятствий, представленных относительно плоской поверхностью капсида.

Несмотря на сходство общей архитектуры фибрилл аденовирусов многих серотипов, их аминокислотные последовательности вариативны, что влияет на их функцию, а также на структуру. Например, ряд областей, экспонированных на поверхности шаровидного утолщения фибриллы, представляют легко адаптирующиеся сайты связывания рецепторов. Глобулярная форма шаровидного утолщения фибриллы позволяет рецепторам связываться по бокам или на вершине шаровидного утолщения фибриллы. Эти сайты связывания обычно располагаются в экспонированных на поверхности петлях, соединяющих бета-нити, консервативность которых среди аденовирусов человека мала. Экспонированные боковые цепи этих петель обеспечивают разнообразие характеристик поверхности шаровидного утолщения при сохранении третичной и четвертичной структуры. Например, электростатический потенциал и распределения заряда на поверхности шаровидного утолщения могут варьировать благодаря широкому диапазону электрических точек у последовательностей шаровидного утолщения, от pI приблизительно 9 для Ad 8, Ad 19 и Ad 37 до приблизительно 5 для аденовирусов подгруппы B. Как структурно сложный вирусный лиганд, белок фибриллы позволяет экспонировать разнообразные связывающие поверхности (шаровидное утолщение) в различных ориентациях и на разном удалении (стебель) от вирусного капсида.

Одним из наиболее очевидных различий между некоторыми серотипами является длина фибриллы. Исследования показали, что длина стебля фибриллы сильно влияет на взаимодействие шаровидного утолщения и вируса с его рецепторами-мишенями. Кроме того, серотипы могут различаться по способности белков фибриллы гнуться. Несмотря на то, что бета-повторы в стебле образуют высоко стабильную и регулярную структуру, исследования с использованием электронной микроскопии (EM) продемонстрировали существование в фибрилле отдельных шарниров. Анализ белковой последовательности нескольких серотипов аденовирусов указывает на нарушение повторяющихся последовательностей

стебля в третьем от N-конца бета-повторе, что сильно коррелирует с одним из шарниров в стебле, как обнаружено посредством EM. Шарниры в фибрилле позволяют шаровидному утолщению принимать различные ориентации относительно вирусного капсида, что позволяет преодолевать стерические препятствия для связывания с рецептором, требующего надлежащей презентации рецептор-связывающего сайта на шаровидном утолщении. Например, жестким фибриллам Ad подгруппы D требуется гибкий рецептор или рецептор, заранее позиционированный для присоединения вируса, поскольку они сами не способны гнуться. (Nicklin et al *Molecular Therapy* 2005 12:384-393).

Применение технологии псевдотипирования фибрилл позволило идентифицировать конкретные клеточные рецепторы для разных серотипов Ad и узнать, как они вносят вклад в тропизм ткани. Несмотря на то, что Ad некоторых подгрупп используют CAR (химерный антигенный рецептор) в качестве первичного рецептора, становится понятным, что многие Ad используют альтернативные первичные рецепторы, что ведет к существенно различному тропизму *in vitro* и *in vivo*. Фибриллы этих серотипов демонстрируют четкие различия в своей первичной и третичной структуре, такие как жесткость стебля фибриллы, длина стебля фибриллы и отсутствие сайта связывания CAR и/или предполагаемого связывающего HSPG (гепаринсульфатпротеогликан) мотива, а также различия в общем заряде в пределах шаровидного утолщения фибриллы. Таким образом, псевдотипирование частиц Ad 5 с заменой стебля фибриллы и шаровидного утолщения позволяет удалить важные связывающиеся с клеткой домены и, помимо этого, может обеспечить более эффективную (и потенциально более селективную в отношении клеток) доставку трансгенов в определенные типы клеток по сравнению с доставкой, обеспечиваемой Ad 5. Нейтрализация частиц Ad с псевдотипированными фибриллами может также быть снижена при использовании фибрилл от Ad с более низким доминированием серотипа у человека или в экспериментальных моделях, что будет способствовать успешному внедрению вектора (Nicklin et al *Molecular Therapy* (2005) 12:384-393). Кроме того, полноразмерная фибрилла, а также выделенные области шаровидного утолщения фибриллы, но не гексон или пентон в отдельности, способны индуцировать созревание дендритных клеток и связаны с индуцированием выраженного ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Molinier-Frenkel et al. *J. Biol. Chem.* (2003) 278:37175-37182). Суммируя вышеизложенное, аденовирусные фибриллы играют важную роль по меньшей мере в связывании с рецептором и иммуногенности аденовирусных векторов.

Выравнивание, приведенное на фиг. 1, демонстрирует различия между белками фибрилл аденовирусов обезьян группы С. Поразительно, что последовательности фибрилл этих аденовирусов можно упрощенно разделить на группы с короткой фибриллой, как ChAd157, или с длинной фибриллой, как ChAd155. Это различие в длине обусловлено делецией 36 аминокислот в короткой фибрилле приблизительно в положении 321 по сравнению с длинной фибриллой. Кроме того, существует ряд аминокислотных замен, которые различаются между подгруппами с короткой и длинной фибриллами, но согласуются внутри каждой подгруппы. Хотя точная функция этих различий до сих пор не выяснена, с учетом функции и иммуногенности фибрилл, они могут быть существенными. Было показано, что одной из детерминант вирусного тропизма является длина стебля фибриллы. Было показано, что вектор Ad5 с более коротким стеблем менее эффективно связывается с рецептором CAR и имеет более низкую инфицирующую способность (Ambriovic-Ristov A. et al.: *Virology*. (2003) 312(2):425-33): Полагают, что данное нарушение является результатом повышенной жесткости более короткой фибриллы, ведущей к менее эффективному присоединению к клеточному рецептору (Wu, E et al.: *J Virol.* (2003) 77(13):7225-7235).

В одном аспекте изобретения предложен выделенный полипептид фибриллы аденовируса шимпанзе ChAd157 и выделенные полинуклеотиды, кодирующие полипептид фибриллы аденовируса шимпанзе ChAd157.

Ожидают, что белок фибриллы способствует низкому доминированию серотипа и, следовательно, его можно применять независимо от полипептидов гексона и пентона ChAd157 или в комбинации (с гексоном или с пентоном или с обоими) для подавления аффинности аденовируса к предсуществующим нейтрализующим антителам, например, для получения рекомбинантного аденовируса с пониженным доминированием серотипа. Такой рекомбинантный аденовирус может быть химерным аденовирусом, включающим белки капсида от различных серотипов, и по меньшей мере белок фибриллы ChAd157.

Последовательность полипептида фибриллы ChAd157 приведена в SEQ ID NO: 1.

Последовательность полипептида пентона ChAd157 приведена в SEQ ID NO: 3.

Последовательность полипептида гексона ChAd157 приведена в SEQ ID NO: 5.

Полипептиды, рекомбинантные аденовирусы, композиции или клетки, содержащие полипептидные последовательности фибриллы ChAd157 или ее функционального производного.

Предпочтительно, выделенный полипептид, рекомбинантный аденовирус, композиция или клетка по изобретению содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Полипептид, рекомбинантный аденовирус, композиция или клетка по изобретению может содержать полипептид, являющийся функциональным производным полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В альтернативном варианте функциональное производное имеет не более одной вставки, делеции



В частности, полинуклеотид, вектор, рекомбинантный аденовирус, композиция или клетка по изобретению дополнительно содержит полинуклеотид, который кодирует:

(а) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и/или

(б) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Полинуклеотид, вектор, рекомбинантный аденовирус, композиция или клетка по изобретению может дополнительно содержать:

(а) полинуклеотид согласно SEQ ID NO: 4; и/или

(б) полинуклеотид согласно SEQ ID NO: 6.

Остовы ChAd157.

В изобретении предложены последовательности выделенных полинуклеотидов аденовируса шимпанзе ChAd157, включая таковые дикого типа, немодифицированного ChAd157 и конструкций ChAd157 с модифицированным остовом. Указанные конструкции с модифицированным остовом включают приведенные в данном документе в качестве примера, такие как pChAd157ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 (SEQ ID NO: 15) и ChAd157 ΔE1E4\_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594 (SEQ ID NO: 22). Остовы ChAd157 можно применять в конструировании рекомбинантных репликативно-компетентных или репликативно-некомпетентных аденовирусов, например, для доставки трансгенов.

Аннотирование последовательности pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG (SEQ ID NO: 17) приведено ниже.

Annotations	ChAd157DE1_TetOhCMV_GAG
IX	3187..3651
IVa2	Complement(3710..5045,5325..5337)
Pol	Complement(4816..8397, 13762..13770)
VA RNAI	10230..10391
pTP	Complement(8196..10199,13762..13770)
48K	10652..11914
pIIIa	11938..13714
III	13807..15588
pVII	15603..16199
V	16275..17390
pX	17415..17660
pVI	17750..18508
Hexon	18623..21499
Protease	21529..22158
DBP	Complement(22274..23926)
92K	23976..26447
22K	26164..26739
33K	Join(26164..26473,26679..27061)
E2e promoter	Complement(27027..27274)
pVIII	27136..27819
E3 12K	27820..28137
E3 CR1-alphap0	28635..28835
E3 gp18K	28838..29329
E3A 11K	30776..31072
E3 RID alpha	31084..31356
E3 RID beta	31359..31757
E3 15K	31750..32136
U exon	Complement(32167..32331)
fibre	32342..33973
E4 ORF6/7	Complement(34181..34456,35168..35341)
E4 ORF6	Complement(34457..35341)
E4 ORF4	Complement(35241..35606)
E4 ORF3	Complement(35622..35969)
E4 ORF2	Complement(35966..36358)
E4 ORF1	Complement(36411..36797)

В одном воплощении предложены фрагменты последовательностей SEQ ID NO: 15, 22 и их комплементарных цепей, кДНК и РНК, комплементарных им. Предпочтительно, фрагменты имеют длину по меньшей мере 15 нуклеотидов, более предпочтительно длину 30 нуклеотидов, более предпочтительно длину 60 нуклеотидов, более предпочтительно длину 120 нуклеотидов, более предпочтительно длину 240 нуклеотидов, более предпочтительно длину 480 нуклеотидов и охватывают функциональные фрагменты, то есть фрагменты, которые представляют биологический интерес. Например, функциональный фрагмент может экспрессировать желаемый аденовирусный продукт или может быть полезным в производстве рекомбинантных вирусных векторов. Такие фрагменты включают последовательности генов, приведенные выше. В некоторых воплощениях предложены выделенные последовательности SEQ ID NO: 15, 22 и их комплементарных цепей, кДНК и РНК, комплементарных им.

Предложены генные продукты аденовируса ChAd157, такие как белки, ферменты и их фрагменты, которые кодируются аденовирусными нуклеиновыми кислотами, описанными в данном документе, и их вышеупомянутые фрагменты. Такие белки включают белки, кодируемые открытыми рамками считывания, указанными выше, и белки, кодируемые полинуклеотидами, приведенными в перечне последовательностей.

Дополнительные полинуклеотиды и полипептиды ChAd157.

В некоторых воплощениях полинуклеотид по изобретению содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид фибриллу; полипептид гексон и полипептид фибриллу; полипептид пентон и полипептид фибриллу или полипептид гексон, полипептид пентон и полипептид фибриллу по изобретению; и может дополнительно содержать дополнительные аденовирусные полинуклеотиды, предпочтительно полинуклеотиды ChAd157. Таким образом, предпочтительно, полинуклеотиды по изобретению содержат одно или более из следующего:

- (а) аденовирусный 5'-инвертированный концевой повтор (ITR);
- (б) аденовирусная область E1A или ее фрагмент, выбранный из областей E1A\_280R и E1A\_243R;
- (в) аденовирусная область E1B или IX или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из областей E1B 19K, E1B 55K и IX;
- (г) аденовирусная область E2B или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из областей E2B\_pTP, E2B\_полимераза и E2B\_IVa2;
- (д) аденовирусная область L1 или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белков L1\_13.6K, L1\_52K и L1\_pIIIa;
- (е) аденовирусная область L2 или область L2, содержащая полинуклеотид, кодирующий белок пентон по изобретению, или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L2\_пентон, белка L2\_pVII, белка L2\_V и белка L2\_pX;
- (ж) аденовирусная область L3 или область L3, содержащая полинуклеотид, кодирующий белок гексон по изобретению, или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L3\_pVI, белка L3\_гексон и белка L3\_протеаза;
- (з) аденовирусная область E2A;
- (и) аденовирусная область L4 или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L4\_100k, белка L4\_33K, белка L4\_22K и белка L4\_VIII;
- (к) аденовирусная область E3 или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из: E3 ORF1, E3 ORF2, E3 ORF3, E3 ORF4, E3 ORF5, E3 ORF6, E3 ORF7, E3 ORF8 и E3 ORF9;
- (л) аденовирусная область L5 или область L5, содержащая полинуклеотид, кодирующий полипептид L5\_фибрилла по изобретению;
- (м) аденовирусная область E4 (такого как Ad5) или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из E4 ORF7, E4 ORF6, E4 ORF4, E4 ORF3, E4 ORF2 и E4 ORF1; в частности, ORF6 указанной области E4;
- (н) аденовирусный 3'-ITR; и/или
- (о) аденовирусная область VAI или VAII PНК, предпочтительно аденовирусная область VAI или VAII PНК из аденовируса, отличного от ChAd157, более предпочтительно из Ad5.

Определения.

Предпочтительно, полинуклеотиды или полипептиды по изобретению являются выделенными. "Выделенный" полинуклеотид это полинуклеотид, который отделен от его исходного окружения. Например, полинуклеотид естественного происхождения является выделенным, если он отделен от всего или части вещества, существующего наряду с ним в естественной системе. Полинуклеотид считают выделенным, например, если он клонирован в вектор, который не является частью его естественного окружения или если он входит в состав кДНК.

Предпочтительно, полинуклеотиды по изобретению являются рекомбинантными. Рекомбинантный означает, что полинуклеотид представляет собой продукт по меньшей мере одной стадии клонирования, рестрикции или лигирования, или других процедур, которые приводят к получению полинуклеотида, отличного от полинуклеотида, встречающегося в природе. Рекомбинантный аденовирус представляет собой аденовирус, содержащий рекомбинантный полинуклеотид. Рекомбинантный вектор представляет собой вектор, содержащий рекомбинантный полинуклеотид. "Рекомбинантный вирус" включает потомков исходного рекомбинантного вируса. "Рекомбинантный вектор" включает репликаты исходного рекомбинантного вектора. "Рекомбинантный полинуклеотид" включает репликаты исходного рекомбинантного полинуклеотида.

Предпочтительно, полипептидная последовательность по данному изобретению содержит по меньшей мере одну модификацию относительно нативной последовательности. Предпочтительно, последовательности полинуклеотидов по данному изобретению содержат по меньшей мере одну модификацию относительно нативной последовательности. Например, полинуклеотид, внедренный генноинженерными способами in плазмиду или вектор, имеющий происхождение из другого вида (и зачастую, другого рода, подсемейства или семейства), представляет собой гетерологичный полинуклеотид. Промотор, отделенный от его нативной кодирующей последовательности и функционально связанный с кодирующей по-

следовательностью, с которой он не связан в природе, представляет собой гетерологичный промотор. Специфический сайт рекомбинации, клонированный в геном вируса или в вирусный вектор, где геном вируса не содержит его в естественных условиях, представляет собой гетерологичный сайт рекомбинации. Гетерологичная нуклеиновокислотная последовательность также включает последовательность, встречающуюся в естественных условиях в аденовирусном геноме, но расположенную в положении аденовирусного вектора, не являющегося нативным.

Обычно "гетерологичный" означает полученный из субъекта, генотипически отличного от того субъекта, с которым проводят сравнение. Гетерологичная нуклеотидная последовательность относится к любой нуклеотидной последовательности, которая не является выделенной из, имеющей происхождение из, или основанной на нуклеотидной последовательности аденовирусного вектора, имеющей естественное происхождение. Гетерологичная белковая последовательность относится к любой последовательности белка, которая не является выделенной из, имеющей происхождение из, или основанной на последовательности белка аденовирусного вектора естественного происхождения. "Естественного происхождения" означает, что последовательность встречается в природе и не получена путем синтеза и не модифицирована. Последовательность "имеет происхождение из" источника, когда она выделена из источника, но модифицирована (например, посредством делеции, замены (мутации), вставки или другой модификации), предпочтительно, таким образом, чтобы не нарушать нормальной функции гена-источника.

"Функциональное производное" или полипептид предпочтительно относится к модифицированному варианту полипептида, например, в котором осуществили делецию, вставку, модификацию и/или замену одной или более аминокислот полипептида. Производное немодифицированного белка капсида аденовируса считают функциональным, если, например:

(а) аденовирус, содержащий в составе своего капсида производное белка капсида, сохраняет, по существу, такое же или имеет более низкое доминирование серотипа по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный белок капсида, и/или

(б) аденовирус, содержащий в составе своего капсида производное белка капсида, сохраняет, по существу, такую же или обладает более высокой способностью инфицировать клетку-хозяина по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный белок капсида, и/или

(в) аденовирус, содержащий в составе своего капсида производное белка капсида, сохраняет, по существу, такую же или имеет более высокую иммуногенность по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный белок капсида, и/или

(г) аденовирус, содержащий в составе своего капсида производное белка капсида, сохраняет, по существу, такую же или обеспечивает более высокую продуктивность в отношении трансгена по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный белок капсида.

Свойства (а)-(г), перечисленные выше, предпочтительно можно оценивать способами, описанными в разделе Примеры ниже.

Предпочтительно, полипептид, вектор или рекомбинантный аденовирус имеет низкое доминирование серотипа в человеческой популяции. "Низкое доминирование серотипа" может означать пониженный уровень предсуществующих нейтрализующих антител по сравнению с человеческим аденовирусом 5 (Ad5). Аналогично или в качестве альтернативы, "низкое доминирование серотипа" может означать доминирование серотипа менее чем приблизительно 20%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 15%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 10%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 5%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 4%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 3%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 2%, доминирование серотипа менее чем приблизительно 1% или отсутствие детектируемого доминирования серотипа. Доминирование серотипа можно определять, как выраженную в процентах долю индивидуумов, имеющих клинически значимый нейтрализующий титр (который можно охарактеризовать как 50% нейтрализующий титр более 200), используя способы, описанные Aste-Amezaga et al., Hum. Gene Ther. (2004) 15(3):293-304.

Термины полипептид, пептид и белок в данном документе используют взаимозаменяемо.

Термин "обезьяний" обычно охватывает приматов, не являющихся человеком, например обезьян Старого Света, обезьян Нового Света, больших человекообразных обезьян и гиббонов. В частности, обезьяний может относиться к большим человекообразным обезьянам, таким как шимпанзе (*Pan troglodyte*), бонобо (*Pan paniscus*) и гориллы (род *Gorilla*). Нечеловекообразные обезьяны могут включать макака реуз (*Macaca mulatta*).

Сравнение последовательностей.

Для сравнения двух близкородственных полинуклеотидных или полипептидных последовательностей можно рассчитывать "% идентичности" между первой последовательностью и второй последовательностью с помощью программ выравнивания, таких как BLAST® (доступна по адресу [blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov), последний доступ 09 марта 2015) с использованием стандартных настроек. % идентичности представляет собой количество идентичных остатков, поделенное на количество остатков эталонной последовательности, умноженное на 100. Значения % идентичности, указанные выше и в формуле изобретения, представляют собой процент, рассчитанный данным способом. Согласно альтер-

нативному определению, % идентичности представляет собой количество идентичных остатков, поделенное на количество выровненных остатков, умноженное на 100. Альтернативные способы включают применение способа с пробелами, в котором пробелы в выравнивании, например делеции в одной последовательности относительно другой последовательности, при расчете веса выравнивания учитывают, присваивая им определенный вес или цену. Для более подробной информации см. обзор по BLAST® доступный по адресу [ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo\\_BLASTGuide.pdf](ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf), последний доступ 09 марта 2015.

Полагают, что последовательности, сохраняющие функциональность полинуклеотида или кодируемого им полипептида, имеют большую идентичность. Полипептидные или полинуклеотидные последовательности называют одинаковыми или идентичными другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они демонстрируют 100% идентичность последовательностей на всем своем протяжении.

"Различие" между последовательностями относится к вставке, делеции или замене одного аминокислотного остатка в положении второй последовательности относительно первой последовательности. Между двумя полипептидными последовательностями может существовать одно, два или более таких аминокислотных различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичность последовательностей) первой последовательности, приводят к снижению процента идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности имеют длину 9 аминокислотных остатков, одна замена во второй последовательности приводит к 88,9% идентичности последовательности. Если идентичные последовательности имеют длину 17 аминокислотных остатков, две замены во второй последовательности приводят к 88,2% идентичности последовательности. Если идентичные последовательности имеют длину 7 аминокислотных остатков, три замены во второй последовательности приводят к 57,1% идентичности последовательности. Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют длину 9 аминокислотных остатков и 6 идентичных остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность более 66% (первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность 66,7%). Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют длину 17 аминокислотных остатков и 16 идентичных остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность более 94% (первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность 94,1%). Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют длину 7 аминокислотных остатков и 3 идентичных остатка, первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность более 42% (первая и вторая полипептидные последовательности имеют идентичность 42,9%).

Альтернативно, для сравнения первой, эталонной полипептидной последовательности со второй, сравниваемой полипептидной последовательностью, может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеции, сделанных в первой последовательности для получения второй последовательности. Добавление представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавления на любом конце первого полипептида). Замена представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида одним отличным аминокислотным остатком. Делеция представляет собой удаление одного аминокислотного остатка из последовательности первого полипептида (включая делецию на любом конце первого полипептида).

Для сравнения первой, эталонной полинуклеотидной последовательности со второй, сравниваемой полинуклеотидной последовательностью, может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеции, сделанных в первой последовательности для получения второй последовательности. Добавление представляет собой добавление одного нуклеотидного остатка в последовательность первого полинуклеотида (включая добавление на любом конце первого полинуклеотида). Замена представляет собой замену одного нуклеотидного остатка в последовательности первого полинуклеотида одним отличным нуклеотидным остатком. Делеция представляет собой удаление одного нуклеотидного остатка из последовательности первого полинуклеотида (включая делецию на любом конце первого полинуклеотида).

Предпочтительно, замены в последовательностях по настоящему изобретению могут представлять собой консервативные замены. Консервативная замена включает замену аминокислоты другой аминокислотой, имеющей химические свойства, схожие с замещаемой аминокислотой (см., например, Strayer et al, *Biochemistry*, 5th Edition 2002, стр. 44-49). Предпочтительно, консервативная замена представляет собой замену, выбранную из группы, состоящей из: (1) замены основной аминокислоты другой, отличной основной аминокислотой; (2) замены кислой аминокислоты другой, отличной кислой аминокислотой; (3) замены ароматической аминокислоты другой, отличной ароматической аминокислотой; (4) замены неполярной алифатической аминокислоты другой, отличной неполярной алифатической аминокислотой и (5) замены полярной незаряженной аминокислоты другой, отличной полярной незаряженной аминокислотой. Основная аминокислота предпочтительно выбрана из группы, состоящей из аргинина, гистидина и лизина. Кислая аминокислота предпочтительно представляет собой аспарат или глутамат. Ароматическая аминокислота предпочтительно выбрана из группы, состоящей из фенилаланина, тирозина и триптофана. Неполярная алифатическая аминокислота предпочтительно выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, валина, лейцина, метионина и изолейцина. Полярная незаряженная аминокислота

предпочтительно выбрана из группы, состоящей из серина, треонина, цистеина, пролина, аспарагина и глутамин. В отличие от консервативной аминокислотной замены, неконсервативная аминокислотная замена представляет собой замену одной аминокислоты любой аминокислотой, которая не подпадает под перечисленные выше консервативные замены (1)-(5).

Векторы и рекомбинантный аденовирус.

Последовательности ChAd155 по изобретению полезны в качестве терапевтических агентов и в конструировании различных систем векторов, рекомбинантного аденовируса и клеток-хозяев. Предпочтительно, термин "вектор" относится к нуклеиновой кислоте, которая была существенно изменена (например, произведена делеция и/или инактивация гена или функциональной области) относительно последовательности дикого типа и/или включает гетерологичную последовательность, то есть нуклеиновую кислоту, полученную из другого источника (также называемую "вставкой"), и реплицирующая и/или экспрессирующая вставленную полинуклеотидную последовательность при введении в клетку (например, клетку-хозяина). Например, вставка может представлять собой всю или часть последовательностей ChAd157, описанных в данном документе. Дополнительно или альтернативно, вектор ChAd157 может представлять собой аденовирус ChAd157, включающий одну или более делеций или инактиваций вирусных генов, таких как E1 или другой вирусный ген или функциональная область, описанные в данном документе. Такой ChAd157, который может содержать или не содержать гетерологичную последовательность, часто обозначается "остовом" и может быть использован в существующем виде или в виде отправной точки для дополнительных модификаций вектора.

Вектор может представлять собой любую подходящую молекулу нуклеиновой кислоты, включая голую ДНК, плазмиду, вирус, космиду, фаговый вектор, такой как вектор лямбда, искусственную хромосому, такую как BAC (искусственная бактериальная хромосома) или эписому. Альтернативно, вектор может представлять собой транскрипционную и/или экспрессионную единицу для бесклеточной транскрипции или экспрессии *in vitro*, такую как T7-совместимая система. Векторы можно применять отдельно или в комбинации с другими аденовирусными последовательностями или фрагментами, или в комбинации с элементами из неаденовирусных последовательностей. Последовательности ChAd157 также полезны в бессмысловых векторах для доставки, векторах для генной терапии или векторных вакцинах. Таким образом, дополнительно предложены векторы для доставки генов и клетки-хозяева, которые содержат последовательности ChAd157.

Термин "репликативно-компетентный" аденовирус относится к аденовирусу, который может реплицироваться в клетке-хозяине в отсутствие каких-либо рекомбинантных хелперных белков, содержащихся в клетке. Предпочтительно, "репликативно-компетентный" аденовирус содержит следующие интактные или функциональные существенные ранние гены: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4. Аденовирусы дикого типа, выделенные у конкретного животного, будут репликативно-компетентными у этого животного.

Термин "репликативно-некомпетентный" или "дефектный по репликации" аденовирус относится к аденовирусу, который не способен к репликации, поскольку он был сконструирован так, чтобы иметь по меньшей мере функциональную делецию (или мутацию с "потерей функции"), то есть делецию или мутацию, которая нарушает функцию гена без полного его удаления, например введение искусственных стоп-кодонов, делецию или мутацию активных сайтов или доменов взаимодействия, мутацию или делецию регуляторной последовательности гена и т.д., или полное удаление гена, кодирующего генный продукт, необходимый для вирусной репликации, такого как один или более из аденовирусных генов, выбранных из E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4 (таких как E3 ORF1, E3 ORF2, E3 ORF3, E3 ORF4, E3 ORF5, E3 ORF6, E3 ORF7, E3 ORF8, E3 ORF9, E4 ORF7, E4 ORF6, E4 ORF4, E4 ORF3, E4 ORF2 и/или E4 ORF1). Наиболее предпочтительно, осуществлена делеция E1 и, возможно E3 и/или E4. При делеции, указанная удаленная область гена предпочтительно не будет учитываться при выравнивании при определении % идентичности с другой последовательностью.

В данном изобретении предложены векторы, такие как рекомбинантный аденовирус, которые доставляют белок, предпочтительно гетерологичный белок, в клетки, либо в целях терапии, либо в целях вакцинации. Вектор может включать любой генетический элемент, включая голую ДНК, фаг, транспозон, космиду, эписому, плазмиду или вирус. Такие векторы содержат ДНК ChAd157, согласно данному описанию, и миниген. Под "минигеном" (или "экспрессионной кассетой") понимают комбинацию выбранного гетерологичного гена (трансгена) и другие регуляторные элементы, необходимые для осуществления трансляции, транскрипции и/или экспрессии продукта гена в клетке-хозяине.

Обычно аденовирусный вектор на основе ChAd157 создают таким образом, чтобы миниген располагался в молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей другие аденовирусные последовательности в нативной для выбранного гена аденовируса области. При необходимости миниген может быть встроен в область существующего гена для нарушения функции данной области. В альтернативном варианте миниген может быть встроен в сайт аденовирусного гена, подвергшегося частичной или полной делеции. Например, миниген может быть расположен в сайте мутации, вставки или делеции, которая делает нефункциональным по меньшей мере один ген в области генома, выбранной из группы, состоящей из E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4. Термин "делает нефункциональным" означает, что удален или иным образом

разрушен достаточный участок гена, так что ген больше не способен продуцировать функциональные продукты экспрессии гена. При желании можно удалять весь участок гена целиком (и предпочтительно заменять минигеном).

Например, для продуцирующего вектора, полезного в создании рекомбинантного вируса, вектор может содержать миниген и либо 5' конец аденовирусного генома, либо 3' конец аденовирусного генома, либо как 5', так и 3' концы аденовирусного генома. 5' конец аденовирусного генома содержит 5' цис-элементы, необходимые для упаковки и репликации; то есть, 5' ITR последовательности (которые функционируют как точки начала репликации) и нативные 5' домены упаковки и энхансера (которые содержат последовательности, необходимые для упаковки линейных геномов Ad и энхансерные элементы для промотора E1). 3' конец аденовирусного генома содержит 3' цис-элементы (включая ITR), необходимые для упаковки и заключения в капсид. Предпочтительно, рекомбинантный аденовирус содержит и 5', и 3' аденовирусные цис-элементы, и миниген (предпочтительно содержащий трансген) располагается между 5' и 3' аденовирусными последовательностями. Аденовирусный вектор на основе ChAd157 может также содержать дополнительные аденовирусные последовательности.

Предпочтительно, векторы на основе ChAd157 содержат один или более аденовирусных элементов, имеющих происхождение из аденовирусного генома ChAd157 по изобретению. В одном воплощении векторы содержат аденовирусные ITR из ChAd157 и дополнительные аденовирусные последовательности из того же аденовирусного серотипа. В другом воплощении векторы содержат аденовирусные последовательности, которые имеют происхождение из другого аденовирусного серотипа, чем тот, который обеспечивает ITR.

Согласно данному описанию, псевдотипированный аденовирус относится к аденовирусу, у которого белки капсида аденовируса имеют происхождение из другого аденовируса, чем аденовирус, который обеспечивает ITR.

Кроме того, можно сконструировать химерные или гибридные аденовирусы, используя аденовирусы, описанные в данном документе, с применением способов, известных специалистам в области техники (например, US 7291498).

ITR и любые другие аденовирусные последовательности, присутствующие в векторе по настоящему изобретению, могут быть получены из многих источников. Разнообразные штаммы аденовирусов предоставляются Американской коллекцией типовых культур, Манассас, Виргиния, или, по запросу, различными коммерческими и академическими организациями. Кроме того, доступ к последовательностям многих таких штаммов предоставляется различными базами данных, включая, например, PubMed и GenBank. В опубликованной литературе описаны гомологичные аденовирусные векторы, полученные из других аденовирусов шимпанзе или человека (например, US 5240846). Доступ к последовательностям ДНК аденовирусов нескольких типов предоставляется GenBank, включая тип Ad5 (номер доступа GenBank M73370). Могут быть получены последовательности аденовирусов любых известных серотипов аденовирусов, таких как 2, 3, 4, 7, 12 и 40, также включая любые из идентифицированных к настоящему времени типов аденовирусов человека. Аналогично, в конструкциях векторов по данному изобретению можно также применять аденовирусы, которые, как известно, инфицируют животных, не являющихся человеком (например, обезьян) (например, US 6083716). Вирусные последовательности, вирусы-хелперы (при необходимости) и рекомбинантные вирусные частицы, а также другие компоненты векторов и последовательности, использованные при конструировании векторов, описанных в данном документе, могут быть получены, как описано ниже.

Получение последовательности, вектора и аденовируса.

Последовательности по изобретению могут быть получены любым подходящим способом, включая рекомбинантное получение, химический синтез или другие способы синтеза. Подходящие методики получения хорошо известны специалистам в области техники. Альтернативно, пептиды также можно синтезировать хорошо известными способами твердофазного синтеза пептидов.

Для получения аденовирусных векторов можно использовать аденовирусные плазмиды (или другие векторы). В одном воплощении аденовирусные векторы представляют собой частицы аденовируса, которые являются репликативно-некомпетентными. В одном воплощении частицы аденовируса становятся репликативно-некомпетентными в результате делеций в генах E1A и/или E1B, в частности, E1A и E1B. В альтернативном варианте аденовирусы делают репликативно-некомпетентными другими способами, возможно при сохранении генов E1A и/или E1B. Аналогично, в некоторых воплощениях снижение иммунного ответа на вектор может достигаться в результате делеций в генах E2B и/или ДНК-полимеразы. Аденовирусные векторы также могут содержать другие мутации аденовирусного генома, например чувствительные к температуре мутации или делеций в других генах. В других воплощениях желательно сохранять интактные области E1A и/или E1B в аденовирусных векторах. Так, интактная область E1 может располагаться в аденовирусном геноме в нативном положении или помещаться в сайт, где произведена делеция нативного аденовирусного генома (например, в область E3).

При конструировании аденовирусных векторов для доставки гена в клетку млекопитающего (такого как человек) в векторах можно использовать ряд модифицированных нуклеотидных последовательностей аденовируса. Например, из аденовирусной последовательности, входящей в состав рекомбинантно-

го вируса, можно удалить весь задержанный ранний ген E3 аденовируса или его часть. Полагают, что функция E3 не важна для функции и продукции частицы рекомбинантного вируса. Аденовирусные векторы могут также быть сконструированы с делециями по меньшей мере области ORF6 гена E4, и более предпочтительно всей области E4 из-за избыточности функции указанной области. Еще один вектор по изобретению содержит делецию в задержанном раннем гене E2A. Можно также осуществлять делеций в любом из поздних генов L1-L5 генома аденовируса. Аналогично, для некоторых задач могут быть полезны делеций в промежуточных генах IX и IVa2. Другие делеций могут быть осуществлены в других структурных или неструктурных генах аденовируса. Указанные выше делеций можно использовать по отдельности, то есть аденовирусная последовательность для применения, как описано здесь, может содержать делеций только в одной области. Альтернативно, делеций целых генов или их частей, эффективно разрушающие биологическую активность, можно использовать в любой комбинации. Например, в одном приведенном в качестве примера векторе последовательность аденовируса может иметь делеций генов E1 и гена E4, или генов E1, E2A и E3, или генов E1 и E3, или генов E1, E2A и E4, с делецией или без делеций E3 и т.д. Любой один или более E генов предпочтительно могут быть заменены E геном (или одной или более открытыми рамками считывания E гена), источником которых является аденовирус другого штамма. Наиболее предпочтительно, осуществляют делецию генов ChAd157 E1 и E3 и ген ChAd157E4 заменяют на E4Ad5orf6. Как обсуждалось выше, для достижения желаемого результата такие делеций и/или замены можно использовать в комбинации с другими мутациями, такими как чувствительные к температуре мутации.

Аденовирусный вектор, лишенный одной или более важных аденовирусных последовательностей (например, E1A, E1B, E2A, E2B, E4 ORF6, L1, L2, L3, L4 и L5), можно культивировать в присутствии продуктов отсутствующих аденовирусных генов, необходимых для инфицирующей способности вируса и размножения частиц аденовируса. Указанные хелперные функции могут обеспечиваться культивированием аденовирусного вектора в присутствии одной или более хелперных конструкций (например, плазмиды или вируса) или пакующей клетки-хозяина.

Комплементация репликативно-некомпетентных векторов.

Для создания рекомбинантных аденовирусов с делециями в любом из генов согласно описанию выше, функцию области гена рекомбинантного вируса, делецию которой произвели, если она существенна для репликации и инфицирующей способности вируса, необходимо восполнить с использованием хелперного вируса или клеточной линии, то есть комплементирующей или пакующей клеточной линии.

Хелперные вирусы.

В зависимости от генов аденовируса, содержащихся в вирусных векторах, использованных как носителей минигена, можно применять хелперный аденовирус или нереплицирующийся фрагмент вируса, чтобы обеспечить достаточно последовательностей гена аденовируса, необходимых для продукции инфекционной частицы рекомбинантного вируса, содержащего миниген. Пригодные хелперные вирусы содержат выбранные последовательности генов аденовируса, отсутствующие в конструкции аденовирусного вектора и/или не экспрессирующиеся пакующей клеточной линией, трансфицированной вектором. В одном воплощении хелперный вирус является дефектным по репликации и содержит гены аденовируса в дополнение, предпочтительно, к одной или более последовательностям по данному описанию. Такой хелперный вирус предпочтительно применяют в комбинации с клеточной линией, экспрессирующей E1 (и возможно дополнительно экспрессирующей E3).

Хелперный вирус может возможно содержать репортерный ген. Ряд таких репортерных генов известен в области техники, а также описан в данном документе. Присутствие репортерного гена в хелперном вирусе, отличающегося от трансгена в аденовирусном векторе, позволяет независимо отслеживать как аденовирусный вектор, так и хелперный вирус. Этот репортер применяют для возможности разделения полученного рекомбинантного вируса и хелперного вируса при очистке.

Линии комплементирующих клеток.

Во многих обстоятельствах для транскомплементации вектора на основе аденовируса шимпанзе можно использовать линию клеток, экспрессирующих один или более отсутствующих генов, существенных для репликации и инфекционной способности вируса, таких как человеческий E1. Это особенно выгодно, поскольку из-за различий между последовательностями аденовируса шимпанзе по изобретению и последовательностями аденовируса человека, обнаруживаемыми в существующих на данный момент пакующих клетках, применение существующих клеток человека, содержащих E1, предупреждает появление репликативно-компетентных аденовирусов в ходе процессов репликации и продукции.

В альтернативном варианте, при желании можно использовать последовательности, приведенные в данном документе, для создания пакующей клетки или линии клеток, экспрессирующей, как минимум, ген E1 из ChAd157 или из другого аденовируса (например, из аденовируса человека, например, E1 из hAd5, или E1 из другого ChAd (аденовируса шимпанзе)) под транскрипционным контролем промотора для экспрессии в выбранной родительской клеточной линии. Для этой задачи можно использовать индуцибельные или конститутивные промоторы. Примеры таких промоторов подробно описаны в других разделах данного документа. Родительскую клетку выбирают для создания новой клеточной линии, экспрессирующей любой желаемый ген ChAd157. Без ограничения, такая родительская клеточная линия

может представлять собой клетки HeLa [номер доступа ATCC CCL 2], A549 [номер доступа ATCC CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [например, Detroit 510, CCL 72] и WI-38 [CCL 75], помимо прочих. Данные клеточные линии можно получить из Американской коллекции типовых культур, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209.

Такие экспрессирующие E1 клеточные являются полезными в создании рекомбинантных аденовирусных векторов с делецией E1. Дополнительно или альтернативно, клеточные линии, которые экспрессируют продукты одного или более генов аденовируса, например E1A, E1B, E2A, E3 и/или E4, могут быть сконструированы с применением, по существу, тех же процедур, которые использовали при создании рекомбинантных вирусных векторов. Такие клеточные линии можно применять для транскомплементации аденовирусных векторов с делецией принципиально значимых генов, кодирующих указанные продукты, или для обеспечения хелперных функций, необходимых для упаковки хелпер-зависимого вируса (например, аденоассоциированного вируса). Получение клетки-хозяина включает такие методики, как сборка отобранных последовательностей ДНК.

В другом альтернативном варианте источниками продуктов принципиально значимых генов аденовируса *in trans* являются аденовирусный вектор и/или вирус-хелпер. В этом случае подходящая клетка-хозяин может быть выбрана из любого биологического организма, включая прокариотические (например, бактериальные) клетки и эукариотические клетки, включая клетки насекомых, клетки дрожжей и клетки млекопитающих.

Клетки-хозяева могут быть выбраны из клеток любых видов млекопитающих, включая, без ограничения, такие клетки, как клетки A549, WENI, 3T3, 10P/2, HEK 293 или Per.C6 (обе из которых экспрессируют функциональный аденовирусный E1) [Fallaux, FJ et al, (1998), Hum Gene Ther, 9:1909-1917], Saos, C2C12, L клетки, HT1080, HepG2 и первичные фибробласты, гепатоциты и миоциты, полученные у млекопитающих, включая человека, обезьяну, мышь, крысу, кролика и хомяка.

Особенно подходящей линией комплементирующих клеток является линия клеток Procell 92. Линия клеток Procell92 получена на основе клеток HEK 293, экспрессирующих гены E1 аденовируса, трансфицированных Tet репрессором под контролем промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK) человека и гена резистентности к G418 (Vitelli et al. PLOS One (2013) 8(e55435):1-9). Procell 92.S адаптирована для роста в суспензии и является полезной в получении аденовирусных векторов, экспрессирующих токсические белки ([www.okairos.com/e/inner.php?m=00084](http://www.okairos.com/e/inner.php?m=00084), последний доступ 13 апреля 2015). Сборка вирусной частицы и трансфекция клеточной линии

Как правило, при доставке вектора, содержащего миниген, путем трансфекции, вектор доставляют в количестве от приблизительно 5 мкг до приблизительно 100 мкг ДНК, и предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 50 мкг ДНК в от приблизительно  $1 \times 10^4$  клеток до приблизительно  $1 \times 10^{13}$  клеток, и предпочтительно в приблизительно  $10^5$  клеток. Однако относительные количества ДНК вектора в клетках-хозяевах можно корректировать с учетом таких факторов, как выбранный вектор, способ доставки и выбранные клетки-хозяева.

Внедрение вектора в клетку-хозяина можно осуществлять любым способом, известным в области техники, включая трансфекцию и инфицирование. Один или более аденовирусных генов могут быть стабильно интегрированы в геном клетки-хозяина, экспрессироваться стабильно в виде эписом или экспрессироваться транзитрно. Все продукты генов могут экспрессироваться транзитрно, в эписоме или стабильно интегрированном виде, или некоторые из продуктов генов могут экспрессироваться стабильно, тогда как другие экспрессируются транзитрно.

Внедрение векторов в клетку-хозяина может также достигаться с использованием методик, известных специалистам. Предпочтительно, применяют стандартные способы трансфекции, например трансфекцию CaPC или электропорацию.

Сборку отобранных последовательностей ДНК аденовируса (а также трансгена и других элементов вектора) в различные промежуточные плазмиды и использование плазмид и векторов для получения рекомбинантной вирусной частицы осуществляют с использованием стандартных методик. Такие методики включают стандартные методики клонирования кДНК, применение перекрывающихся олигонуклеотидных последовательностей геномов аденовирусов, полимеразную цепную реакцию и любые подходящие способы, которые позволяют получить желаемую нуклеотидную последовательность. Используют стандартные методики трансфекции и ко-трансфекции, например методики преципитации CaPC. Другие применяемые стандартные способы включают гомологичную рекомбинацию вирусных геномов, бляшкообразование вирусов в слое агара, способы измерения формируемого сигнала и т.п.

Например, после конструирования и сборки желаемого вирусного вектора, содержащего миниген, вектором трансфицируют *in vitro* паковую клеточную линию в присутствии хелперного вируса. Происходит гомологичная рекомбинация между хелперными и векторными последовательностями, что позволяет последовательностям аденовируса-трансгена в векторе реплицироваться и упаковываться в капсиды вириона, в результате чего образуются частицы рекомбинантного вирусного вектора. Полученные рекомбинантные аденовирусы являются полезными в переносе выбранного трансгена в выбранную клетку. В экспериментах *in vivo* с рекомбинантным вирусом, выращиваемым в пакующих клеточных линиях, рекомбинантные аденовирусные векторы с делецией E1 по изобретению демонстрируют пригодность

для переноса трансгена в клетку млекопитающего, не являющегося обезьяной, предпочтительно, человека.

Трансгены.

Трансген представляет собой нуклеиновокислотную последовательность, гетерологичную по отношению к последовательностям вектора, фланкирующим трансген, кодирующую белок, представляющий интерес. Кодирующая нуклеиновокислотная последовательность функционально связана с регуляторными компонентами таким образом, который позволяет трансгену транскрибироваться, транслироваться и/или экспрессироваться в клетке-хозяине.

Состав последовательности трансгена будет зависеть от применения полученного вектора. Например, трансген может быть терапевтическим трансгеном или иммуногенным трансгеном. Альтернативно, последовательность трансгена может включать репортерную последовательность, которая при экспрессии производит выявляемый сигнал. Такие репортерные последовательности включают, без ограничения, последовательности ДНК, кодирующие  $\beta$ -лактамазу,  $\beta$ -галактозидазу (LacZ), щелочную фосфатазу, тимидин-киназу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), люциферазу, мембраносвязанные белки, включая, например, CD2, CD4, CD8, белок гемагглютинин вируса гриппа и другие хорошо известные в области техники, к которым существуют или могут быть получены стандартными способами высокоаффинные антитела, и слитые белки, содержащие мембрано-связанный белок, надлежащим образом слитый с доменом антигенной метки, помимо прочих, из гемагглютинина или Мус. Эти кодирующие последовательности, будучи ассоциированными с регуляторными элементами, которые направляют их экспрессию, обеспечивают сигналы, выявляемые стандартными способами, включая ферментативный, радиографический, колориметрический, флуоресцентный или иной спектральный анализ, проточную цитометрию и иммунологические анализы, включая иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и иммуногистохимию.

В одном воплощении трансген представляет собой немаркерную последовательность, кодирующую продукт, который является полезным в биологии и медицине, такой как терапевтический трансген или иммуногенный трансген, такой как белки, РНК, ферменты или каталитические РНК. Желательные молекулы РНК включают тРНК (транспортная РНК), днРНК (двунитевая РНК), рибосомальную РНК, каталитические РНК и антисмысловые РНК. Одним примером полезной последовательности РНК является последовательность, которая подавляет экспрессию нуклеиновокислотной последовательности-мишени в животном, получающем лечение.

Трансген можно применять для лечения, например, генетических дефектов, в качестве противоопухолевого средства или вакцины, для индуцирования иммунного ответа и/или для профилактической вакцинации. В данном документе индуцирование иммунного ответа относится к способности белка индуцировать Т-клеточный и/или гуморальный иммунный ответ на белок.

Термин "профилактика" означает получение лекарственного средства заранее, это может быть перед контактом с патогеном (доконтактная профилактика) или перед развитием симптомов заболевания (постконтактная профилактика). Термины "лечение" и "терапия" в данном описании используются взаимозаменяемо и означают введение лекарственного средства во время заболевания.

Под термином "заболевание" понимают нарушение структуры или функции субъекта, в частности, вызывающее специфические симптомы или оказывающее воздействие на определенный участок, и не являющееся просто прямым результатом физического повреждения.

Регуляторные элементы.

В дополнение к трансгену вектор также включает стандартные контрольные элементы, которые функционально связаны с трансгеном таким образом, что обеспечивают его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, полученным по изобретению. В данном документе выражение "функционально связанный" охватывает как контролирующие экспрессию последовательности, которые являются смежными с интересующим геном, так и контролирующие экспрессию последовательности, которые контролируют интересующий ген, действуя *in trans* или на расстоянии.

Контролирующие экспрессию последовательности включают подходящие последовательности инициации и терминации транскрипции, последовательности промотора и энхансера; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (поли А), включая поли А бета-глобина кролика; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (например, консенсусная последовательность Козак); последовательности, усиливающие стабильность белка и, при необходимости, последовательности, усиливающие секрецию кодируемого продукта. Среди прочих последовательностей можно использовать химерные интроны.

В некоторых воплощениях с трансгеном может быть функционально связан посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) (Zuffrey et al. (1999) *J Virol*; 73(4):2886-9). Пример WPRE приведен в SEQ ID NO: 26.

"Промотор" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая позволяет связываться РНК полимеразе и направляет транскрипцию гена. Как правило, промотор расположен в 5' некодирующей

шей области гена, вблизи сайта начала транскрипции гена. Элементы последовательности в составе промоторов, которые функционируют при инициации транскрипции, часто характеризуются консенсусными нуклеотидными последовательностями. Примеры промоторов включают промоторы бактерий, дрожжей, растений, вирусов и млекопитающих (включая человека), но не ограничиваются ими. В области техники известно и может применяться большое количество последовательностей, контролирующих экспрессию, включая промоторы, которые являются внутренними, нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифичными.

Примеры конститутивных промоторов включают промотор ТВГ (тироксинсвязывающий глобулин), промотор LTR (длинные концевые повторы) вируса саркомы Рауса (возможно с энхансером), промотор цитомегаловируса (CMV) (возможно с энхансером CMV, см., например, Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)), промотор CASI, промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β-актина, промотор фосфоглицеролкиназы (PGK) и промотор EF1a (фактор элонгации 1a) (Invitrogen), но не ограничиваются ими.

В некоторых воплощениях промотор представляет собой промотор CASI (см., например, WO2012/115980). Промотор CASI представляет собой синтетический промотор, содержащий часть энхансера CMV, часть промотора бета-актина цыпленка и часть энхансера UBC (убиквитин C). В некоторых воплощениях промотор CASI может включать нуклеиновокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или более SEQ ID NO: 12. В некоторых воплощениях промотор содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12 или состоит из нее.

Индуцибельные промоторы позволяют регулировать экспрессию гена и могут регулироваться посредством экзогенно вносимых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия определенного физиологического состояния, например острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из различных коммерческих источников, включая Invitrogen, Clontech и Ariad, но не ограничиваясь ими. Описаны многие другие системы, которые могут быть легко выбраны специалистом в области техники. Например, индуцибельные промоторы включают цинк-индуцируемый промотор металлотионеина овцы (MT) и дексаметазон (Dex)-индуцируемый промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV). Другие индуцибельные системы включают систему промотора T7-полимеразы (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), тетрациклин-репрессуруемую систему (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen et al, Science, 378:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)). Другие системы включают димер FK506, VP16 или p65, с использованием кастрадиола, дифенол-муристерона, RU486-индуцируемую систему (Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al, Gene Ther, 4:432-441 (1997)) и рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Эффективность некоторых индуцибельных промоторов увеличивается со временем. В таких случаях можно повысить эффективность таких систем путем встраивания нескольких tandemно расположенных репрессоров, например TetR, связанный с TetR посредством IRES (участок внутренней посадки рибосомы).

В некоторых воплощениях промотор представляет собой усиленный промотор hCMV, такой как представленный в SEQ ID NO: 42.

В другом воплощении применяют нативный для трансгена промотор. Нативный промотор может быть предпочтителен, когда желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно применять, когда экспрессия трансгена должна регулироваться временно или в процессе развития, или тканеспецифичным образом, или в ответ на определенные транскрипционные стимулы. В следующем воплощении для имитации нативной экспрессии можно также применять другие нативные контролирующие экспрессию элементы, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак.

Трансген может быть функционально связан с тканеспецифичным промотором. Например, если желательна экспрессия в скелетной мышце, следует использовать промотор, активный в мышце. Они включают промоторы генов, кодирующих скелетный β-актин, легкую цепь 2A миозина, дистрофии, креатинкиназу мышц, а также синтетические промоторы мышц с активностью, превышающей таковую естественных промоторов (см. Li et al, Nat. Biotech., 17:241-245 (1999)). Известны примеры тканеспецифичных промоторов для печени (альбумин Miyatake et al, J. Virol, 71:5124-32 (1997); основной промотор вируса гепатита В, Sandig et al, Gene Ther, 3:1002-9 (1996); альфа-фетопротейн (AFP), Arbutnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), остеокальцин кости (Stein et al, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); сиалопротеин кости (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), лимфоциты (CD2, Hansal et al, J. Immunol, 161:1063-8 (1998); тяжелая цепь иммуноглобулина; цепь T клеточного рецептора), нейрональные, такие как промотор нейрон-специфической енолазы (NSE) (Andersen et al, Cell. Mol. Neurobiol, 13:503-15 (1993)), ген легкой цепи нейрофиламента (Piccioli et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)) и ген

нейрон-специфического vgf (Piccioli et al, Neuron, 15:373-84 (1995)), среди прочих.

Возможно, векторы, несущие трансгены, кодирующие терапевтически полезные или иммуногенные продукты, могут также включать селективные маркеры или репортерные гены, которые могут включать последовательности, обеспечивающие резистентность к генетицину, гиромидину или пуромидину, помимо прочих. Такие селективные репортерные или маркерные гены (предпочтительно расположенные вне вирусного генома, упаковываемого в вирусную частицу) можно применять, чтобы сигнализировать о наличии плазмид в бактериальных клетках, например как в случае резистентности к ампициллину. Другие компоненты вектора могут включать точку начала репликации.

Указанные векторы создают с применением методик и последовательностей, приведенных в данном документе, в сочетании со способами, известными специалистам в области техники. Такие методики включают стандартные методики клонирования кДНК, описанные в публикациях, применение перекрывающихся олигонуклеотидных последовательностей геномов аденовирусов, полимеразную цепную реакцию и любые подходящие способы, которые обеспечивают нужную нуклеотидную последовательность.

Терапия и профилактика.

Рекомбинантные векторы на основе ChAd157 являются полезными для переноса генов человеку или млекопитающему, не являющемуся обезьяной, *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

Рекомбинантные аденовирусные векторы, описанные в данном документе, можно применять в качестве экспрессирующих векторов для получения продуктов, кодируемых гетерологичными трансгенами *in vitro*. Например, рекомбинантным репликативно-некомпетентным аденовирусом, содержащим трансген, может быть трансфицирована линия комплементирующих клеток, как описано выше.

Рекомбинантный аденовирусный вектор на основе ChAd157 обеспечивает эффективное средство переноса генов, которое может доставлять выбранный трансген в выбранную клетку-хозяина *in vivo* или *ex vivo*, даже когда организм имеет нейтрализующие антитела к одному или более серотипам аденовируса. В одном воплощении вектор и клетки смешивают *ex vivo*, инфицированные клетки культивируют с использованием стандартных методик и осуществляют реинфузию трансдуцированных клеток пациенту. Данные методики являются наиболее подходящими для доставки генов в терапевтических целях и для иммунизации, включая индуцирование защитного иммунитета.

Иммуногенные трансгены.

Рекомбинантные векторы на основе ChAd157 также можно вводить в иммуногенных композициях. Иммуногенная композиция, описанная в данном документе, представляет собой композицию, содержащую один и более рекомбинантных векторов ChAd157, способных, после доставки млекопитающему, предпочтительно человеку, индуцировать иммунный ответ, например гуморальный (например, антительный) и/или клеточно-опосредованный (например, цитотоксическими Т-клетками) ответ против трансгенного продукта, доставляемого вектором. Рекомбинантный аденовирус может содержать (предпочтительно, в любой из его делеций гена) ген, кодирующий желательный иммуноген и может, таким образом, применяться в вакцине. Рекомбинантные аденовирусы можно использовать в качестве профилактических или терапевтических вакцин против любого патогена, у которого идентифицирован(ы) антиген(ы), играющий(ие) важнейшую роль для индуцирования иммунного ответа и способные ограничить распространение патогена, и для которых доступна кДНК.

Термин "иммуноген" означает полипептид, способный индуцировать иммунный ответ. Предпочтительно, иммуноген представляет собой антиген, который содержит по меньшей мере один В- или Т-клеточный эпитоп. Индуцированный иммунный ответ может представлять собой антиген-специфичный В-клеточный ответ, который приводит к образованию нейтрализующих антител. Индуцированный иммунный ответ может представлять собой антиген-специфичный Т-клеточный ответ, который может быть системным и/или местным ответом. Антиген-специфичный Т-клеточный ответ может включать CD4+ Т-клеточный ответ, такой как ответ, включающий CD4+ Т-клетки, экспрессирующие множество цитокинов, например, IFN (интерферон) гамма, TNF (фактор некроза опухоли) альфа и/или IL 2 (интерлейкин 2). В качестве альтернативы или дополнительно, антиген-специфичный Т-клеточный ответ включает CD8+ Т-клеточный ответ, такой как ответ, включающий CD8+ Т-клетки, экспрессирующие множество цитокинов, например IFN гамма, TNF альфа и/или IL 2.

Следовательно, термин "иммунизировать" означает введение иммуногена (или полинуклеотида, кодирующего иммуноген, в соответствии с контекстом) для индуцирования иммунного ответа.

Такие вакцины или иные иммуногенные композиции могут быть изготовлены в подходящем для доставки носителе. Как правило, дозы иммуногенных композиций находятся в диапазоне, который указан далее в разделе "Способы доставки и дозы". Для определения необходимости в бустерных введениях можно оценивать уровень иммунитета к выбранному гену. После определения титров антител в сыворотке могут быть желательными возможные бустерные иммунизации.

Возможно, вакцина или иммуногенная композиция по изобретению может быть изготовлена так, чтобы содержать другие компоненты, включая, например, адьюванты, стабилизаторы, регуляторы pH, консерванты и т.п. Примеры подходящих адьювантов приведены ниже в разделе "Адьюванты". Такой адьювант можно вводить с примирующей ДНК-вакциной, кодирующей антиген, для усиления антиген-

специфического иммунного ответа по сравнению с иммунным ответом, развивающимся после первичной вакцинации только ДНК-вакциной, кодирующей антиген. Альтернативно, такой адъювант можно вводить с полипептидным антигеном, который вводят в схеме введения, включающей векторы ChAd157 по изобретению (как описано ниже в разделе "Схемы введения").

Рекомбинантные аденовирусы вводят в иммуногенном количестве, то есть в количестве рекомбинантного аденовируса, которое является эффективным при способе введения для трансфекции желаемых целевых клеток и обеспечения достаточных уровней экспрессии выбранного гена для индуцирования иммунного ответа. При обеспечении защитного иммунитета рекомбинантные аденовирусы считают вакцинными композициями, полезными для предупреждения инфекции и/или рецидивирующего заболевания.

Предполагают, что рекомбинантные векторы, описанные в данном документе, будут в высокой степени эффективными для индуцирования цитолитических Т-клеток и антител, направленных на вставленный гетерологичный антигенный белок, экспрессируемый вектором.

Иммуногены, экспрессируемые векторами по изобретению, которые полезны для иммунизации человека или животного, не являющегося человеком, против других патогенов, включают, например, бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы или многоклеточных паразитов, инфицирующих человека и позвоночных, не являющихся человеком, или иммуногены из опухолевой клетки или раковой клетки. Например, иммуногены могут быть выбраны из ряда вирусных семейств. Примеры вирусных семейств, против которых желателен иммунный ответ, включают лиссавирусы, такие как вирус бешенства, респираторные вирусы, такие как респираторный синцитиальный вирус (RSV) и другие парамиксовирусы, такие как метапневмовирус человека, hMPV, и вирусы парагриппа (PIV).

Подходящие антигены вируса бешенства, которые полезны в качестве иммуногенов для иммунизации человека или животного, не являющегося человеком, могут быть выбраны из: гликопротеина вируса бешенства (G), РНК-полимеразы (L), белка матрикса (M), нуклеопротеина (N) и фосфопротеина (P). Термин "белок G" или "гликопротеин" или "полипептид белка G" или "полипептид гликопротеина" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида гликопротеина вируса бешенства. Термин "белок L" или "белок РНК полимеразы" или "полипептид белка L" или "полипептид белка РНК полимеразы" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида белка РНК полимеразы вируса бешенства. Термин "белок M" или "белок матрикса" или "полипептид белка M" или "полипептид белка матрикса" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида белка матрикса вируса бешенства. Аналогично, термин "белок N" или "нуклеопротеин" или "полипептид белка N" или "полипептид нуклеопротеина" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида нуклеопротеина вируса бешенства. Аналогично, термин "белок P" или "фосфопротеин" или "полипептид белка P" или "полипептид фосфопротеина" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида фосфопротеина вируса бешенства.

Подходящие антигены RSV, которые полезны в качестве иммуногенов для иммунизации человека или животного, не являющегося человеком, могут быть выбраны из: белка слияния (F), белка присоединения (G), белка матрикса (M2) и нуклеопротеина (N). Термин "белок F" или "белок слияния", или "полипептид белка F", или "полипептид белка слияния" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида белка слияния RSV. Аналогично, термин "белок G" или "полипептид белка G" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности полипептида белка присоединения RSV. Термин "белок M" или "белок матрикса", или "полипептид белка M" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности белка матрикса RSV, и может включать либо один, либо оба из генных продуктов M2-1 (который в данном документе может указываться как M2.1) и M2-2. Аналогично, термин "белок N" или "белок нуклеокапсида", или "полипептид белка N" относится к полипептиду или белку, имеющему всю или часть аминокислотной последовательности нуклеопротеина RSV.

Описаны две группы штаммов RSV человека, группы A и B, основанные, главным образом, на различиях антигенности гликопротеина G. В настоящее время выделены различные штаммы RSV, любые из которых являются подходящими, когда речь идет об антигенах иммуногенных комбинаций, описанных в данном документе. Примеры штаммов, обозначенных номерами доступа GenBank и/или EMBL, можно найти в опубликованной заявке на патент US 2010/0203071 (WO2008114149), включенной в данное описание путем ссылки для изложения нуклеотидных и полипептидных последовательностей белков F и G RSV, подходящих для применения в данном изобретении. В воплощении белок F RSV может представлять собой эктодомен белка F RSV (FATM).

Примеры нуклеиновокислотных и белковых последовательностей белков M и N можно найти, например, в опубликованной заявке на патент US 2014/0141042 (WO2012/089833), включенной в данное описание для изложения нуклеотидных и полипептидных последовательностей белков M и N RSV, подходящих для применения в данном изобретении.

Подходящим образом, для применения в данном изобретении нуклеиновая кислота кодирует анти-

ген F RSV и антигены M и N RSV. Более конкретно, нуклеиновая кислота кодирует FATM антиген RSV и M2-1 и N антигены RSV, где сайт саморасщепления находится между FATM антигеном RSV и M2-1 RSV, а гибкий линкер расположен между антигенами M2-1 и N RSV. В одном воплощении подходящая нуклеиновая кислота кодирует полипептид, представленный SEQ ID NO:37.

В одном воплощении иммуноген может иметь происхождение из ретровируса, например лентивируса, такого как вирус иммунодефицита человека (HIV). В таком воплощении иммуногены могут иметь происхождение из HIV-1 или HIV-2.

Геном HIV кодирует ряд различных белков, каждый из которых может быть иммуногенным в целом виде или в виде фрагмента, при экспрессии векторами по данному изобретению. Белки оболочки включают, например, gp120, gp41 и предшественник Env gp160. Белки HIV, не являющиеся белками оболочки, включают, например, внутренние структурные белки, такие как продукты генов gag и pol и другие неструктурные белки, такие как Rev, Nef, Vif и Tat. В воплощении вектор по изобретению кодирует один или более полипептидов, содержащих HIV Gag.

Ген Gag транслируется в виде полипротеина-предшественника, который расщепляется протеазой с образованием продуктов, включающих белок матрикса (p17), капсид (p24), нуклеокапсид (p9), p6 и два соединительных пептида, p2 и p1, все из которых являются примерами фрагментов Gag.

Ген Gag дает начало белку-предшественнику Gag размером 55 килодальтон (кДа), также обозначаемому как p55, который экспрессируется с не прошедшей сплайсинг вирусной мРНК. В ходе трансляции N конец p55 подвергается миристоилрованию, что запускает его ассоциацию с цитоплазматической стороной клеточных мембран. Ассоциированный с мембраной полипротеин Gag захватывает две копии вирусной геномной РНК наряду с другими вирусными и клеточными белками, тем самым запуская процесс отпочковывания вирусной частицы от поверхности инфицированной клетки. После отпочковывания p55 расщепляется протеазой, кодируемой вирусом (продукт гена pol) в ходе процесса созревания вируса, на четыре более мелких белка, обозначаемых как MA (матрикс [p17]), CA (капсид [p24]), NC (нуклеокапсид [p9]) и p6, все из которых являются примерами фрагментов Gag. В одном воплощении векторы по данному изобретению содержат полипептид Gag SEQ ID NO: 16.

#### Адьюванты.

Термин "адьювант" в данном документе относится к композиции, которая усиливает иммунный ответ на иммуноген. Примеры таких адьювантов включают неорганические адьюванты (например, неорганические соли металлов, такие как фосфат алюминия или гидрат окиси алюминия), органические адьюванты (например, сапонины, такие как QS21 или сквален), адьюванты на основе масел (например, полный адьювант Фрейнда и неполный адьювант Фрейнда), цитокины (например, IL-1 $\beta$  (интерлейкин 1 $\beta$ ), IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CSF и INF- $\gamma$  (интерферон  $\gamma$ )), адьюванты в виде частиц (например, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), липосомы или биодеградируемые микросферы), виросомы, бактериальные адьюванты (например, монофосфориллипид А, такой как 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL) или мурамилпептиды), синтетические адьюванты (например, неионные блоксополимеры, аналоги мурамилпептидов или синтетический липид А), синтетические полинуклеотидные адьюванты (например, полиаргинин или полилизин) и иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилированные динуклеотиды CpG ("CpG"), но не ограничиваются ими.

Одним из подходящих адьювантов является монофосфориллипид А (MPL), в частности, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL). Химически он часто поставляется в виде смеси 3-де-О-ацилированного монофосфориллипид А с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. Его можно очистить и получить способами, изложенными в GB 2122204B, где также изложено получение дифосфориллипид А и его 3-О-деацилированных вариантов. Описаны другие очищенные и синтетические липополисахариды (патенты US 6005099 и EP 0 729 473 B1; Hilgers et al., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1):141-6; и EP 0 549 074 B1).

Сапонины также представляют собой подходящие адьюванты (см. Lacaille-Dubois, M and Wagner H, A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386 (1996)). Например, сапонин Quil A (полученный из коры южноамериканского дерева Quillaja Saponaria Molina) и его фракции, описанные в патенте US 5057540 и Kensil, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 1996, 12:1-55; и EP 0 362 279 B1. Очищенные фракции Quil A также известны как иммуностимуляторы, такие как QS21 и QS17; способы их получения описаны в патентах US 5057540 и EP 0 362 279 B1. В указанных источниках также описан QS7 (негемолитическая фракция Quil-A). Применение QS21 также описано Kensil et al. (1991, J. Immunology, 146:431-437). Также известны комбинации QS21 с полисорбатом или циклодекстрином (WO 99/10008). Системы адьювантов в виде частиц, содержащие фракции QuilA, такие как QS21 и QS7, описаны в WO 96/33739 и WO 96/11711.

Другие адьюванты представляют собой иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилированные динуклеотиды CpG ("CpG") (Krieg, Nature 374:546 (1995)). CpG это аббревиатура, обозначающая динуклеотидный мотив цитозин-гуанозин, присутствующий в ДНК. CpG известен как адьювант, вводимый как системно, так и через слизистую (WO 96/02555, EP 468520, Davis et al, J. Immunol, 1998, 160:870-876; McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161:4463-6). CpG, включенный в состав

вакцин, можно вводить в виде свободного раствора вместе со свободным антигеном (WO 96/02555) или ковалентно конъюгированный с антигеном (WO 98/16247), или приготовленный с носителем, таким как гидрат окиси алюминия (Brazolot-Millan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95:15553-8).

Адьюванты, такие как описанные выше, могут быть приготовлены вместе с носителями, такими как липосомы, эмульсии типа "масло в воде" и/или солями металлов (включая соли алюминия, такие как гидрат окиси алюминия). Например, 3D-MPL может быть приготовлен вместе с гидратом окиси алюминия (EP 0 689 454) или эмульсиями масло в воде (WO 95/17210); QS21 может быть приготовлен вместе с липосомами, содержащими холестерин (WO 96/33739), эмульсиями типа "масло в воде" (WO 95/17210) или квасцами (WO 98/15287); CpG может быть приготовлен вместе с квасцами (Brazolot-Millan, см. выше) или другими катионными носителями.

В данном изобретении можно использовать комбинации адьювантов, в частности комбинацию монофосфориллипида А и производного сапонины (см., например, WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241), более конкретно комбинацию QS21 и 3D-MPL, как описано в WO 94/00153, или композицию, где QS21 содержится в липосомах, содержащих холестерин (DQ), как описано в WO 96/33739. Альтернативно, комбинация CpG и сапонины, такого как QS21, представляет собой адьювант, подходящий для применения в данном изобретении. Эффективная адьювантная композиция, включающая QS21, 3D-MPL и токоферол в эмульсии "масло в воде" описана в WO 95/17210 и представляет собой другую композицию для применения в данном изобретении. Сапониновые адьюванты можно готовить в липосомах и комбинировать с иммуностимулирующим олигонуклеотидом. Так, подходящие адьювантные системы включают, например, комбинацию монофосфориллипида А, предпочтительно 3D-MPL, вместе с солью алюминия (например, как описано в WO00/23105). Дополнительные примеры адьювантов включают QS21 и/или MPL и/или CpG. QS21 может сдерживаться в липосомах, содержащих холестерин, как описано в WO 96/33739.

Другие подходящие адьюванты включают алкил-глюкозаминид-фосфаты (AGP), такие, как описанные в WO9850399 или в US 6303347 (также описывает способы получения AGP), или фармацевтически приемлемые соли AGP, как описано в патенте US 6764840. Некоторые AGP представляют собой агонисты TLR4, а некоторые являются антагонистами TLR4. И те, и другие можно применять в качестве адьювантов.

Обнаружили, что слияние инвариантной цепи с антигеном, входящим в состав системы экспрессии, используемой для вакцинации, повышает иммунный ответ на указанный антиген, если его вводят с аденовирусом (WO 2007/062656, опубликованная как US 2011/0293704 и включенная путем ссылки для изложения инвариантных последовательностей цепей). Соответственно, в одном воплощении изобретения иммуногенный трансген может экспрессироваться совместно с инвариантной цепью в составе рекомбинантного вирусного вектора ChAd157.

В другом воплощении изобретения предложено применение капсида ChAd157 (возможно применяют интактную или рекомбинантную вирусную частицу или пустой капсид) для индуцирования ответа - иммуномодулирующего эффекта или для усиления ответа цитотоксических Т-клеток на другой активный агент или выполнения функции адьюванта посредством доставки субъекту капсида ChAd157. Капсид ChAd157 можно доставлять в отдельности или в комбинации с активным агентом для усиления иммунного ответа на него. Предпочтительно, желаемый эффект может достигаться без инфицирования хозяина аденовирусом.

#### Схемы введения.

Главным образом, рекомбинантные векторы на основе аденовируса ChAd157 будут использовать для доставки терапевтических или иммуногенных молекул (таких как белки). Нетрудно понять, что при обоих применениях рекомбинантные аденовирусные векторы по изобретению особенно хорошо подходят для применения в схемах, в которые вовлечено повторное введение рекомбинантных аденовирусных векторов. Такие схемы, как правило, включают доставку серии вирусных векторов, в которых вирусные капсиды сменяют друг друга. Вирусные капсиды можно менять при каждом последующем введении или после определенного числа введений капсида конкретного серотипа (например, одного, двух, трех, четырех или более). Таким образом, схема может включать доставку рекомбинантного аденовируса с первым капсидом, доставку рекомбинантного аденовируса со вторым капсидом и доставку рекомбинантного аденовируса с третьим капсидом. Специалистам в области техники будет очевидно множество других схем, в которых используют аденовирусные капсиды по изобретению в отдельности, в комбинации друг с другом или в комбинации с другими аденовирусами (которые предпочтительно не демонстрируют иммунологической перекрестной реактивности). Возможно такая схема может включать введение рекомбинантного аденовируса с капсидами других аденовирусов приматов, не являющихся человеком, аденовирусов человека или искусственными последовательностями, как описано в данном документе.

Аденовирусные векторы по изобретению особенно хорошо подходят для схем лечения, в которых необходима многократная доставка трансгенов, опосредованная аденовирусами, например в схемах, включающих повторяющуюся доставку того же самого трансгена или в комбинированных схемах, включающих доставку других трансгенов. Такие схемы могут включать введение аденовирусного вектора ChAd157 с последующим повторным введением вектора на основе аденовируса того же самого серотипа.

Наиболее предпочтительные схемы включают введение аденовирусного вектора ChAd157, в котором источник аденовирусных капсидных последовательностей у вектора, доставляемого при первом введении, отличается от источника аденовирусных капсидных последовательностей у вирусного вектора, используемого в одном или более последующих введениях. Например, схема лечения включает введение вектора ChAd157 и повторное введение одного или более аденовирусных векторов того же самого или других серотипов.

В другом примере схема лечения включает введение аденовирусного вектора с последующим повторным введением вектора ChAd157, который имеет капсид, который отличается от источника капсида в аденовирусном векторе, введенном первым, и возможно дополнительное введение другого вектора, который является таким же или, предпочтительно, отличается от источника аденовирусного капсида вектора на предшествующих стадиях введения. Указанные схемы не ограничиваются доставкой аденовирусных векторов, сконструированных с применением последовательностей ChAd157. Скорее, в этих схемах можно легко применять другие аденовирусные последовательности, включая, без ограничения, другие аденовирусные последовательности, включая другие аденовирусные последовательности приматов, не являющихся человеком, или аденовирусные последовательности человека, в комбинации с векторами ChAd157.

В дополнительном примере схема лечения может включать либо одновременную (такую как совместное введение), либо последовательную (такую как прайм-буст) доставку (1) одного или более аденовирусных векторов ChAd157 и (2) дополнительного компонента, такого как векторы, не являющиеся аденовирусными, невирусные векторы и/или ряд других терапевтически полезных соединений или молекул, таких как антигенные белки, возможно вводимые одновременно с адьювантом. Примеры совместного введения включают гомолатеральное совместное введение и контралатеральное совместное введение (более подробно описанные ниже в разделе "Способы доставки и дозы").

Подходящие векторы, не являющиеся аденовирусными, для применения в одновременной или особенно в последовательной доставке (такой как прайм-буст) с одним или более аденовирусными векторами на основе ChAd157 включают один или более поксвирусных векторов. Предпочтительно, поксвирусные векторы принадлежат к подсемейству *chordoroxvirinae*, более предпочтительно к роду в указанном подсемействе, выбранному из группы, состоящей из *orthorox*, *pararox*, *yatarox*, *avirox* (предпочтительно, *canaryrox* (ALVAC) или *fowlrox* (FPV)) и *molluscirox*. Еще более предпочтительно, поксвирусный вектор относится к роду *orthorox* и выбран из группы, состоящей из вируса *vaccinia*, NYVAC (производного штамма *vaccinia Copenhagen*), модифицированного штамма *Vaccinia Ankara* (MVA), вируса коровьей оспы и вируса обезьяньей оспы. Более предпочтительно, поксвирусный вектор представляет собой MVA.

"Одновременное" введение предпочтительно относится к тому же существующему иммунному ответу. Предпочтительно, оба компонента вводят в одно и то же время (например, совместное введение как ДНК, так и белка), однако, один компонент можно вводить в течение нескольких минут (например, в ходе того же посещения медицинского учреждения или визите врача), в течение нескольких часов. Такое введение также обозначают как совместное введение. В некоторых воплощениях совместное введение может относиться к введению аденовирусного вектора, адьюванта и белкового компонента. В других воплощениях совместное введение относится к введению аденовирусного вектора и другого вирусного вектора, например второго аденовирусного вектора или поксвируса, такого как MVA. В других воплощениях совместное введение относится к введению аденовирусного вектора и белкового компонента, к которому возможно добавлен адьювант.

Можно применять схему прайм-буст. Прайм-буст относится к двум отдельным иммунным ответам: (1) первичная стимуляция иммунной системы с последующей (2) вторичной, или бустерной, стимуляцией иммунной системы через несколько недель или месяцев после развития первичного иммунного ответа.

Такая схема может включать введение рекомбинантного вектора ChAd157 для первичной стимуляции иммунной системы и второе бустерное введение обычного антигена, такого как белок (возможно вводимого совместно с адьювантом) или рекомбинантного вируса, несущего последовательности, кодирующие такой антиген (например, WO 00/11140). Альтернативно, схема иммунизации может включать введение рекомбинантного вектора ChAd157 для усиления иммунного ответа на вектор (или вирусный, или на основе ДНК), кодирующий антиген. В другом альтернативном варианте схема иммунизации включает введение белка с последующим бустерным введением рекомбинантного вектора ChAd157, кодирующего антиген. В одном примере схема прайм-буст может обеспечивать защитный иммунный ответ на вирус, бактерию или другой организм, из которого имеет происхождение антиген. В другом воплощении схема прайм-буст обеспечивает терапевтический эффект, который можно измерить с использованием стандартных анализов для выявления наличия состояния, для которого вводят терапию.

Предпочтительно, бустерную композицию вводят через от приблизительно 2 до приблизительно 27 недель после введения субъекту примирующей композиции. Введение бустерной композиции осуществляется с использованием эффективного количества бустерной композиции, содержащей или способной доставлять тот же антиген или другой антиген по сравнению с введенным в составе примирующей вакцины. Бустерная композиция может состоять из рекомбинантного вирусного вектора, имеющего проис-

хождение из того же самого вирусного источника или из другого источника. Альтернативно, бустерная композиция может представлять собой композицию, индуцирующую иммунный ответ у хозяина, содержащую тот же антиген, что и кодируемый примирующей вакциной, но в форме белка. Основные требования к бустерной композиции состоят в том, чтобы антиген композиции представлял собой тот же антиген или антиген, перекрестно-реагирующий с антигеном, кодируемым примирующей композицией.

Низкая перекрестная реактивность между нейтрализующими антителами к ChAd157 и некоторым другим аденовирусным векторам, таким как ChAd155, обладает преимуществами, когда требуются многократные введения векторов. Многократные введения могут осуществляться для отдельной доставки различных трансгенов (например, кодирующих иммуногены, ассоциированные с различными медицинскими показаниями) или доставки одинаковых или похожих трансгенов (например, согласно схеме прайм-буст для усиления иммунного ответа при конкретном медицинском показании).

Следовательно, предложен рекомбинантный аденовирусный вектор по изобретению, кодирующий трансген, для введения субъекту, который ранее был в контакте с рекомбинантным аденовирусным вектором, который не содержит фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе (например, не содержит фибриллу, гексон или пентон ChAd157, как описано в данном документе, таким как рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155, в частности рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и пентон ChAd155). В частности, предложен рекомбинантный аденовирусный вектор по изобретению, кодирующий трансген, для введения субъекту, которому ранее вводили рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе (например, не содержит фибриллу, гексон или пентон ChAd157, как описано в данном документе, таким как рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155, в частности рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и пентон ChAd155). Предпочтительно, рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157, обладает низкой перекрестной реактивностью с ChAd157. В одном воплощении рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157, кодирует трансген, направленный на иное медицинское показание или показания, нежели трансген рекомбинантного аденовирусного вектора по изобретению. В другом воплощении рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157, кодирует трансген, направленный на то же медицинское показание или показания, что и трансген рекомбинантного аденовирусного вектора по изобретению (например, тот же самый трансген).

Также предложен рекомбинантный аденовирусный вектор по изобретению, кодирующий трансген, для введения субъекту, который может (то есть который намерен или ожидаемо будет) впоследствии оказаться в контакте с рекомбинантным аденовирусным вектором, который не содержит фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе (например, не содержит фибриллу, гексон или пентон ChAd157, как описано в данном документе, таким как рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155, в частности, с рекомбинантным аденовирусным вектором, содержащим фибриллу, гексон и пентон ChAd155). В частности, предложен рекомбинантный аденовирусный вектор по изобретению, кодирующий трансген, для введения субъекту, которому впоследствии могут вводить рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе (например, не содержит фибриллу, гексон или пентон ChAd157, как описано в данном документе, таким как рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155, в частности рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и пентон ChAd155). Предпочтительно, рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157, обладающий низкой перекрестной реактивностью с ChAd157. В одном воплощении рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157, кодирует трансген, направленный на иное медицинское показание или показания, нежели трансген рекомбинантного аденовирусного вектора по изобретению. В другом воплощении рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157, кодирует трансген, направленный на то же медицинское показание или показания, что и трансген рекомбинантного аденовирусного вектора по изобретению (например, тот же самый трансген).

Таким образом, в данном изобретении предложен способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, включающий:

(а) введение субъекту рекомбинантного аденовирусного вектора по изобретению, кодирующего первый трансген, и

(б) введение субъекту рекомбинантного аденовирусного вектора, который не содержит фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе, где вектор кодирует второй трансген;

где стадии (а) и (б) можно осуществлять в любом порядке и первый и второй трансгены могут быть одинаковыми или различными.

Первый и второй трансгены обычно кодируют иммуногены, которые являются полезными для им-

мунизации человека или животного, не являющегося человеком, против патогена, такого как бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы или многоклеточные паразиты, инфицирующие человека и позвоночных, не являющихся человеком, или против раковой клетки или опухолевой клетки. Первый и второй трансгены могут кодировать одинаковые или различные иммуногены. Когда кодируемые иммуногены различаются, они могут быть направлены на одинаковые или разные патогены или раковые клетки или опухолевые клетки.

Следовательно, также предложен способ профилактики или лечения субъекта, включающий:

(а) введение субъекту рекомбинантного аденовирусного вектора по изобретению, кодирующего первый трансген, кодирующий иммуноген, который полезен для иммунизации человека или животного, не являющегося человеком, против патогена, такого как бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы или многоклеточные паразиты, инфицирующие человека и позвоночных, не являющихся человеком, или против раковой клетки или опухолевой клетки; и

(б) введение субъекту рекомбинантного аденовирусного вектора, не содержащего фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе, где вектор кодирует второй трансген, кодирующий иммуноген, который полезен для иммунизации человека или животного, не являющегося человеком, против иного патогена, такого как бактерии, грибы, паразитические микроорганизмы или многоклеточные паразиты, инфицирующие человека и позвоночных, не являющихся человеком, или против раковой клетки или опухолевой клетки;

где стадии (а) и (б) можно осуществлять в любом порядке.

Рекомбинантный аденовирусный вектор, не содержащий фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе, предпочтительно не содержащий фибриллу ChAd157, гексон ChAd157 или фибриллу ChAd157, такой как не содержащий фибриллу ChAd157, гексон ChAd157 или фибриллу ChAd157 или ее функциональные производные, имеющие по меньшей мере 98% идентичности с ней.

Рекомбинантный аденовирусный вектор, который не содержит фибриллу ChAd157 или ее функциональное производное, как описано в данном документе, может представлять собой рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155, в частности рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и пентон ChAd155.

Как упоминалось, рекомбинантный аденовирусный вектор по изобретению можно применять для доставки терапевтических или иммуногенных молекул вместе с рекомбинантным аденовирусным вектором, содержащим фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155. Рекомбинантный аденовирусный вектор, содержащий фибриллу, гексон и/или пентон ChAd155, будет содержать фибриллу, пентон и/или гексон в соответствии с SEQ ID NO: 7, 9 и 11, в частности фибриллу, пентон и гексон в соответствии с SEQ ID NO: 7, 9 и 11.

Термин "низкая перекрестная реактивность" означает, что иммунизация первым вектором не индуцирует значимого ответа, представляющего собой выработку нейтрализующих антител на второй вектор, то есть существенно не влияют на иммунологическую эффективность второго вектора. Ответ, представляющий собой выработку нейтрализующих антител, можно определять способами, аналогичными приведенным в Примере 7 в настоящем документе. Желательно, двукратная иммунизация первым вектором вызывает нейтрализующий титр, который в среднем составляет менее 50% от уровня, развивающегося после иммунизации вторым вектором, например менее 75%, предпочтительно менее 90%.

Термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, и в частности человека.

Способы доставки и дозы.

Вектор может быть подготовлен для введения посредством суспендирования или растворения в фармацевтически или физиологически приемлемом носителе, таком как изотонический физиологический раствор; изотонический солевой раствор или другие композиции будут очевидны специалистам в области техники. Подходящий носитель будет очевиден специалистам в области техники и будет зависеть по большей части от способа введения. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить млекопитающему в композиции с замедленным высвобождением, с применением биodeградируемого биосовместимого полимера или посредством местной доставки с применением мицелл, гелей и липосом.

В некоторых воплощениях рекомбинантный аденовирус по изобретению вводят субъекту путем внутримышечной инъекции, интравагинальной инъекции, внутривенной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, подкожной инъекции, нанесения на кожу, внутривокального введения, назального введения или перорального введения. Сублингвальное введение также может представлять интерес.

Если схема терапии включает совместное введение одного или более векторов на основе аденовируса ChAd157 и дополнительного компонента, каждый из которых входит в разные композиции, их предпочтительно вводить близко в один и тот же участок или вблизи одного и того же участка. Например, компоненты можно вводить (например, способом введения, выбранным из внутримышечного, чрескожного, внутривокального, подкожного) на той же стороне или в ту же конечность ("ко-латеральное" введение) или на противоположной стороне или в противоположную конечность ("контра-латеральное" введение).

Дозы вирусных векторов будут зависеть преимущественно от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, возраст, масса тела и здоровье пациента, и, следовательно, могут варьировать у паци-

ентов. Например, терапевтически эффективная доза вирусного вектора для взрослого человека или терапевтически эффективная ветеринарная доза обычно содержит от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^{15}$  вирусных частиц, например от  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{12}$  (например,  $1 \times 10^8$ ,  $2,5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1,5 \times 10^9$ ,  $2,5 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1,5 \times 10^{10}$ ,  $2,5 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1,5 \times 10^{11}$ ,  $2,5 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  частиц). Альтернативно, вирусный вектор можно вводить в дозе, которая обычно составляет от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^{10}$  бляшкообразующих единиц (PFU), например  $1 \times 10^5$  PFU,  $2,5 \times 10^5$  PFU,  $5 \times 10^5$  PFU,  $1 \times 10^6$  PFU,  $2,5 \times 10^6$  PFU,  $5 \times 10^6$  PFU,  $1 \times 10^7$  PFU,  $2,5 \times 10^7$  PFU,  $5 \times 10^7$  PFU,  $1 \times 10^8$  PFU,  $2,5 \times 10^8$  PFU,  $5 \times 10^8$  PFU,  $1 \times 10^9$  PFU,  $2,5 \times 10^9$  PFU,  $5 \times 10^9$  PFU или  $1 \times 10^{10}$  PFU. Дозы будут варьировать в зависимости от размера животного и способа введения. Например, подходящая доза для человека или ветеринарная доза (для животного массой приблизительно 80 кг) для внутримышечной инъекции находится в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^9$  до приблизительно  $5 \times 10^{12}$  на мл для одного участка. Возможно, можно использовать несколько участков введения. В другом примере подходящая доза для человека или ветеринарная доза может находиться в диапазоне от приблизительно  $1 \times 10^{11}$  до приблизительно  $1 \times 10^{15}$  частиц для пероральной композиции.

Количественное определение вирусного вектора можно осуществлять анализом посредством количественной PCR (полимеразной цепной реакции) (Q-PCR), например, с праймерами и зондом, сконструированными для области промотора CMV, используя в качестве стандартной кривой серию разведений плазмидной ДНК, содержащей геном вектора с экспрессионной кассетой, содержащей промотор HCMV. Число копий в исследуемом образце определяют методом анализа параллельных линий. Альтернативными способами количественного определения частиц вектора могут быть аналитическая HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография) или спектрофотометрический метод, основанный на поглощении при 260 нм ( $A_{260}$ ).

Иммунологически эффективное количество нуклеиновой кислоты может предпочтительно составлять от 1 нг до 100 мг. Например, подходящее количество может составлять от 1 мкг до 100 мг. Специалисты в области техники могут легко установить подходящее количество конкретной нуклеиновой кислоты (например, вектора). Примеры эффективных количеств нуклеиновокислотного компонента могут составлять от 1 нг до 100 мкг, например от 1 нг до 1 мкг (например, 100 нг-1 мкг) или от 1 до 100 мкг, например 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750 нг или 1 мкг. Эффективные количества нуклеиновой кислоты могут также включать от 1 до 500 мкг, например от 1 до 200 мкг, например от 10 до 100 мкг, например 1, 2, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 150 или 200 мкг. Альтернативно, приведенное в качестве примера эффективное количество нуклеиновой кислоты может составлять от 100 мкг до 1 мг, например от 100 до 500 мкг, например 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 мкг или 1 мг.

Как правило, доза для человека будет находиться в объеме от 0,1 до 2 мл. Таким образом, описанная в данном документе композиция может быть приготовлена в объеме, например, 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 или 2,0 мл человеческой дозы для каждого из иммуногенных компонентов в отдельности или для их комбинации.

Специалист в области техники может скорректировать указанные дозы в зависимости от способа введения и терапевтического или вакцинного применения, при котором используют рекомбинантный вектор. Для определения частоты введения доз можно отслеживать уровни экспрессии трансгена или, для адьюванта, уровень циркулирующего антитела.

Если применяют одну или более стадий первичной и/или бустерной иммунизации, данная стадия может включать однократную дозу, которую вводят ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно. Например, млекопитающие могут получать одну или две дозы, содержащие от приблизительно 10 мкг до приблизительно 50 мкг плазмиды в носителе. Количество или участок доставки желателно выбирать, основываясь на особенностях и состоянии млекопитающего.

Для определения необходимости в бустерных введениях, если таковая возникнет, можно оценивать терапевтические уровни или уровень иммунного ответа против белка, кодируемого заданным трансгеном. После оценки ответа CD8+ Т клеток или возможно титра антител в сыворотке, могут быть желательны возможные бустерные иммунизации. Возможно, рекомбинантные векторы ChAd155 могут быть доставлены в виде однократного введения или в различных комбинированных схемах, например в комбинации со схемой или курсом лечения, включающей(им) другие активные ингредиенты или в составе схемы прайм-буст.

Далее изобретение будет описано более подробно посредством примеров, которые не являются исчерпывающими.

#### **Описание примеров осуществления изобретения**

Пример 1. Выделение ChAd157 и конструирование вектора.

29 различных аденовирусов шимпанзе дикого типа выделяли у здоровых молодых шимпанзе, которых содержали в различных вивариях Европы, используя стандартные процедуры, как описано Colloca et al. *Sci Transl Med.* 2012 Jan 4; 4(115):115ra2 и в WO2010/086189, содержание которых включено путем ссылки в целях описания выделения аденовируса и способов характеристики.

Затем 29 вирусов дикого типа пулировали; вирусный геном пула клонировали посредством гомологичной рекомбинации в клетки *E. coli* BJ5183 с использованием челнока ВАС для создания минибиблио-

теки векторов, несущих делецию области E1. Минибиблиотекой векторов ΔE1 трансфицировали клетки линии Procell 92; регенерированные векторы последовательно пассировали в течение 16 пассажей. На 16 пассаже из амплифицированного вектора получали ДНК вируса и клонировали посредством гомологичной рекомбинации в клетки *E. coli* BJ5183 с использованием челночной плазмиды. Преобладающий вид вектора идентифицировали как вектор ChAd157ΔE1 и затем модифицировали для включения в остов вектора следующих дополнительных модификаций:

- а) делеция области E4 вируса ΔE1 (от 34413 п.н. до 37127 п.н.);
- б) вставка E4orf6, имеющей происхождение из человеческого Ad5.

#### 1.1) Создание минибиблиотеки ΔF1.

Для получения пулированного вирусного генома использовали пул 29 вирусов дикого типа. Пулированный вирусный геном клонировали в вектор ВАС посредством гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* штамма BJ5183, ко-трансформированных пулированной вирусной ДНК и челночным вектором ВАС Subgroup С (#1365) (SEQ ID NO: 14). Как показано на схеме на фиг. 2, челночный вектор ВАС Subgroup С представляет собой вектор ВАС, предназначенный для клонирования ChAd, относящихся к виду С, и, следовательно, содержит ген рIX и фрагменты ДНК, имеющие происхождение из правых и левых концов (включая правые и левые ITR) вирусов ChAd вида С.

Челночная ВАС вида С также содержит кассету RpsL-Kana, встроенную между левым концом и геном рIX. Кроме того, между геном рIX и правым концом вирусного генома находится селекционная кассета Amp-LacZ-SacB, фланкированная сайтами рестрикции ISceI. В частности, челночный вектор ВАС имеет следующие характеристики: Левый ITR: от 27 до 139 п.н., кассета hCMV(tetO) RpsL-Kana: от 493 до 3396 п.н., ген рIX: от 3508 до 3972 п.н., сайты рестрикции ISceI: 3990 и 7481 п.н., селекционная кассета Amp-LacZ-SacB: от 4000 до 7471 п.н., правый ITR: от 7805 до 7917 п.н.. hCMV(tetO) представлен в SEQ ID NO: 37.

Клетки BJ5183 ко-трансформировали путем электропорации пулом очищенных вирусных ДНК и челночным вектором Subgroup С ВАС, разрезанным рестрикционным ферментом ISceI и затем выделенным из геля. Гомологичная рекомбинация, происходящая между геном рIX и последовательностями правого ITR (находящимися на концах линейаризованной ДНК челночного вектора Species С ВАС) и гомологичными последовательностями, присутствующими в пулированной вирусной ДНК, приводила к встраиванию различных вирусных геномных ДНК в челночный вектор ВАС. В то же время вирусные области E1 были делетированы и замещены кассетой RpsL-Kana, с образованием ВАС/минибиблиотека ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kana.

#### 1.2) Амплификация минибиблиотеки ΔE1 в клетках линии Procell 92 и клонирование вектора ChAd157ΔE1.

Минибиблиотеку ΔE1 разрезали посредством PmeI и использовали для трансфекции пакующей клеточной линии Procell 92, чтобы сберечь библиотеку различных вирусов в совокупности. Через 10 суток после трансфекции клетки собирали и клеточный лизат подвергали трем циклам замораживания (-70°C) и оттаивания (+37°C), просветляли центрифугированием при 2000 об/мин и использовали для инфицирования свежих клеток. Для отбора видов вируса по эффективности размножения в клетках Procell 92 проводили 16 последовательных пассажей амплификации вируса. Вирус(ы) на 16 пассаже очищали посредством двух центрифугирований в градиенте CsCl и выделяли вирусную ДНК и клонировали посредством гомологичной рекомбинации в клетки *E. coli* BJ5183 с применением челночной плазмиды. Подробнее, клетки BJ5183 ко-трансформировали очищенной вирусной ДНК и челночной плазмидой Subgroup С (SEQ ID NO: 38). Как показано на схеме на фиг. 3, челночная плазида Subgroup С представляет собой плазмидный вектор, предназначенный для клонирования ChAd, относящихся к виду С, и, следовательно, содержит фрагменты ДНК, имеющие происхождение из правых и левых концов (включая правые и левые ITR) вирусов ChAd вида С.

Гомологичная рекомбинация между последовательностями правых и левых ITR, присутствующих на концах линейаризованной челночной плазмиды Subgroup С (разрезанной PshAI/NdeI/XbaI), и вирусными геномными ДНК позволяла встроить их в плазмидный вектор. Амплифицировали 30 различных клонов, проанализировали с помощью рестрикционного анализа и идентифицировали 9 различных видов. 19/30 клонов демонстрировали одинаковые паттерны рестрикции и представляли преобладающие виды; отобрали один из этих клонов и обозначили его pChAd157ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 (SEQ ID NO: 15).

#### 1.3) Конструирование ChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557.

Кассету GAG (полинуклеотидная последовательность GAG SEQ ID NO: 16) клонировали в линейаризованный преадео акцепторный вектор между последовательностями промотора HCMV и BGH polyA (SEQ ID NO: 39) посредством гомологичной рекомбинации в *E. coli*, основанной на существующей гомологии.

Плазмиду pARS CV32TetOhCMV GAG расщепляли посредством SpeI и SphI чтобы вырезать фрагмент 2,44 кб, содержащий промотор HCMV с tetO, HIV-GAG и последовательностью BGH polyA.

Фрагмент HIV-GAG 2.44 кб клонировали посредством гомологичной рекомбинации в акцепторный вектор pChAd157 ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kana (#1551) (разрезанный посредством SnaBI), несущий селек-

ционную кассету RpsL-Kana под контролем HCMV и BGHpa. Полученную конструкцию обозначали как вектор pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557 (SEQ ID NO: 17).

Структура плазмиды, несущей ChAd157 GAG, показана на фиг. 4.

1.4) Конструирование ChAd157 ΔE1E4 Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594.

Затем вектор ChAd157ΔE1 модифицировали, чтобы его остов имел следующие модификации:

а) делеция области E4 вируса ΔE1 (от 34413 п.н. до 37127 п.н.);

б) вставка E4orf6, имеющей происхождение из человеческого Ad5.

Осуществляли делецию области E4, расположенную между нуклеотидами 34413-37127 (координаты последовательности вектора ΔE1) путем замещения нативной области E4 последовательностью, кодирующей Ad5 E4orf6, применяя стратегию, включающую несколько стадий клонирования и гомологичной рекомбинации в *E. coli*. Осуществили делецию всей кодирующей области E4, при этом нативный промотор E4 и сигнал полиадезилации сохранили. Для этого сконструировали челночный вектор, позволяющий осуществить вставку Ad5orf6 путем замены нативной области E4 ChAd157 в результате гомологичной рекомбинации в *E. coli* BJ5183, как подробно описано ниже.

Конструирование pARS SpeciesC Ad5E4orf6-1.

Фрагмент ДНК, содержащий Ad5orf6, получили с помощью PCR, используя ДНК Ad5 в качестве матрицы и олигонуклеотиды: 5'-ATACGGACTAGTGGAGAAGTACTCGCCTACATG-3' (SEQ ID NO: 18) и 5'-ATACGGAAGATСТААGACTTCAGGAAATATGACTAC-3' (SEQ ID NO: 19). Фрагмент PCR разрезали посредством BgIII и SpeI и клонировали в челночный вектор pARS Species C RLD-EGFP, разрезанный посредством BgIII и SpeI, с получением плазмиды pARS Species C Ad5orf6-1.

Конструирование pARS SpeciesC Ad5E4orf6-2.

Фрагмент ДНК 144 п.н., содержащий Fiber-E4 polyA (от 34269 п.н. до 34412 п.н. вектора ChAd157ΔE1) амплифицировали при помощи PCR с использованием плазмиды pChAd157 ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kana (#1551) в качестве матрицы со следующими олигонуклеотидами: 5'-ATTCAAGTGTACAGGCGCGCCAAAGCATGACACTGATGTTTCATTTTC-3' (SEQ ID NO: 20) и 5'-ACTAGGACTAGTTATAAGCTAGAATGGGGCTTTGC-3' (SEQ ID NO: 21). PCR-фрагмент разрезали посредством BsrGI и SpeI и клонировали в pARS SubGroupC Ad5orf6-1, разрезанный посредством BsrGI и SpeI, с получением плазмиды pARS SpeciesC Ad5orf6-2 (SEQ ID NO: 40).

Полученную плазмиду pARS SpeciesC Ad5orf6-2 затем использовали для замещения области E4 в составе остова ChAd157 на Ad5orf6. Для этого плазмиду pChAd157 ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 разрезали посредством Pad и ко-трансформировали клетки BJ5183 плазмидой pARS SpeciesC Ad5orf6-2, разрезанной посредством BamHI/AscI, для получения преадено плазмиды pChAd157 ΔE1E4\_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana (#1594) (SEQ ID NO: 22).

1.5) Конструирование ChAd157 ΔE1E4 Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559.

Кассету, экспрессирующую гликопротеин вируса бешенства (RG) (полинуклеотидная последовательность гликопротеина вируса бешенства SEQ ID NO: 23) клонировали в линейаризованный преадено акцепторный вектор между последовательностями промотора HCMV и BGH polyA посредством гомологичной рекомбинации в *E. coli*, основанной на существующей гомологии.

Плазмиду rvjTetOhCMV-bgh polyA RG расщепляли посредством SpeI и AsiSI, чтобы вырезать фрагмент 2,59 кб, содержащий промотор HCMV с tetO, RG и последовательностью BGH polyA.

Полученный фрагмент RG 2,59 т.п.н. клонировали посредством гомологичной рекомбинации в акцепторный вектор pChAd157 ΔE1E4\_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana (#1594), несущий селекционную кассету RpsL-Kana под контролем HCMV и BGHpa. Акцепторную пре-адено плазмиду линейаризовали с помощью рестрикционной эндонуклеазы SnaBI. Полученную конструкцию обозначали как вектор pChAd157 ΔE1E4\_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559 (SEQ ID NO: 24).

Структура плазмиды, несущей ChAd157 RG, показана на фиг. 6.

Пример 2. Получение вектора.

Продуктивность в отношении ChAd157 оценивали в сравнении с ChAd19 и ChAd155 в клетках линии Procell 92.

2.1) Получение векторов, содержащих трансген HIV Gag ChAd157/GAG, ChAd19/GAG, ChAd155/GAG (векторы ChAd157, ChAd19 и ChAd155, экспрессирующие трансген HIV Gag) регенерировали и амплифицировали в Procell92; лизаты использовали для инфицирования каждым вектором клеток Procell 92, культивируемых в виде монослоя в 1 флаконе T25. Использовали множественность заражения (MOI) 300 вч/клетку (вирусных частицах на клетку) и осуществляли заражение в присутствии тетрациклина, поскольку у ChAd19/GAG отсутствовал транскрипционный контроль, опосредованный вставкой оператора TetO в промотор hCMV. Инфицированные клетки собирали, когда становился очевидным полный цитопатогенный эффект (через 48 часов после инфицирования ChAd157/GAG и ChAd155/GAG и через 5 суток после инфицирования ChAd19/GAG); для высвобождения вирусов из инфицированных клеток осуществляли 3 цикла замораживания/оттаивания (от -70° до 37°C), после чего лизат просветляли путем центрифугирования. Проводили количественный анализ просветленных лизатов при помощи количественной PCR с праймерами и зондом, комплементарными области промотора CMV.

Последовательности олигонуклеотидов были следующими: CMVfor 5'-CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA-3' (SEQ ID NO: 25), CMVrev 5'-GACTTGGAAATCCCCGTGAGT-3' (SEQ ID NO: 26), зонд CMVFAM-TAMRA 5'-ACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTT-3' (SEQ ID NO: 41) (QPCR выполняли с использованием прибора ABI Prism 7900 Sequence detector - Applied Biosystem).

Итоговые титры, выраженные как количество вирусных частиц на единицу объема (вч/мл), которые определяли в просветленных лизатах, и специфическая продуктивность, выраженная как количество вирусных частиц на клетку (вч/клетку), представлены в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Продуктивность вектора GAG

Вектор	Продуктивность на единицу объема (вч/мл)	Всего вирусных частиц	Специфическая продуктивность (вч/клетку)
ChAd157/GAG	4,61E+09	2,30E+10	7,68E+03
ChAd155/GAG	5,42E+09	2,71E+10	9,04E+03
ChAd19/GAG	4,80E+08	2,40E+09	8,00E+02

### 2.2) Получение векторов, содержащих трансген RG.

Для оценки продуктивности вакцинных векторов RG в клетках Procell 92, культивируемых в суспензии, провели другой ряд экспериментов. В эксперименте проводили параллельное сравнение ChAd157/RG и ChAd155/RG путем инфицирования Procell 92 при плотности клеток  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Использовали множественность заражения (MOI) 300 вч/клетку. Инфицированные клетки собирали через 4 дня после инфицирования; для высвобождения вируса из инфицированных клеток осуществляли 3 цикла замораживания/оттаивания и просветляли лизат путем центрифугирования. Затем проводили количественный анализ просветленных лизатов при помощи количественной PCR, как описано выше.

В табл. 2 ниже представлена продуктивность на единицу объема и специфическая продуктивность на клетку.

Таблица 2. Продуктивность вектора RG

Вектор	Продуктивность на единицу объема (вч/мл)	Всего вирусных частиц	Специфическая продуктивность (вч/клетку)
ChAd157/RG	9,39E+09	4,69E+11	1,88E+04
ChAd155/RG	1,41E+10	7,04E+11	2,81E+04

### Пример 3. Уровни экспрессии трансгенов.

#### 3.1) Уровень экспрессии трансгена HIV Gag.

Уровни экспрессии сравнивали в параллельных экспериментах путем инфицирования клеток HeLa векторами ChAd19, ChAd155 и ChAd157, содержащими трансген HIV Gag.

Клетки HeLa высевали в 35 мм чашки и инфицировали очищенными вирусами ChAd19/GAG, ChAd157/GAG и ChAd155/GAG, используя MOI, составляющую 250 вч/клетку. Супернатанты инфицированных клеток HeLa собирали через 48 часов после инфицирования и определяли количество секретированного белка HIV GAG с использованием коммерческого набора для ELISA (HIV-1 p24 ELISA Kit, PerkinElmer Life Science). Количественное определение проводили в соответствии с инструкциями производителя, используя стандартную кривую антигена HIV-1 p24.

Результаты, выраженные в пг/мл белка GAG, представлены на фиг. 7.

#### 3.2) Уровень экспрессии трансгена RG.

Также проводили анализ методом вестерн-блоттинг для оценки экспрессии гликопротеина вируса бешенства, обеспечиваемой вектором ChAd157/RG, в сравнении с вектором ChAd155/RG. Для этого клетки HeLa высевали в 35 мм чашки и инфицировали очищенными вирусами ChAd157/RG и ChAd155/RG, используя MOI, составляющую 250 вч/клетку. Клеточные лизаты собирали через 48 часов после инфицирования и оценивали уровень экспрессии трансгена при помощи SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) в восстанавливающих условиях, после чего проводили анализ вестерн-блот.

В гель вносили эквивалентное количество белковых экстрактов; после электрофоретического разделения в присутствии SDS в восстанавливающих условиях белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану для инкубации с поликлональным антителом кролика к GP (кат. номер: RBVGP11-S  $\alpha$ Diagnostic, в разведении 1:1000). После инкубации с первичным антителом мембрану отмывали и затем инкубировали со вторичным антителом к иммуноглобулинам кролика, конъюгированным с пероксида-

зой хрена (HRP). В конце анализа применяли стандартный электрохемилюминесцентный метод (реагент для выявления ECL (W3252282 PIERCE)). Результаты вестерн-блота показаны на фиг. 8.

Полоса приблизительно 57 кДа, указанная стрелкой, была выявлена с помощью поликлонального антитела к GP, что соответствовало ожидаемой массе гликопротеина вируса бешенства.

Результат свидетельствует, что уровень экспрессии, обеспечиваемый вектором ChAd157, сопоставим с таковым для вектора ChAd155.

Пример 4. Оценка иммуногенности в экспериментах с иммунизацией мышей.

#### 4.1) Иммуногенность векторов, содержащих трансген HIV Gag.

Иммуногенность вектора ChAd157/GAG оценивали параллельно с ChAd155/GAG и ChAd19/GAG на мышах BALB/c (по 6 в группе). Для проведения эксперимента осуществляли внутримышечные инъекции  $10^7$  вирусных частиц. Т-клеточный ответ оценивали через 3 недели после иммунизации *ex vivo*, используя иммуноферментный спот-анализ интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (ELISpot) с использованием эпитопа GAG для CD8+ Т клеток, картированного у мышей BALB/c. Полученные результаты, выраженные как количество IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток, образующих пятна (SFC), на миллион спленоцитов, показаны на фиг. 9.

Каждый кружок соответствует ответу одной мыши, а линия соответствует среднему геометрическому значению для каждой дозовой группы. Доля мышей, положительных в отношении CD8-иммунодоминантного пептида, показана на оси x.

#### 4.2) Иммуногенность векторов, содержащих трансген RG.

Иммуногенность векторов ChAd157/RG и ChAd155/RG оценивали на мышах BALB/c. Осуществляли внутримышечные инъекции обоих векторов в дозах  $10^7$  и  $10^6$  вч. Через семь недель после вакцинации выделяли спленоциты иммунизированных мышей и анализировали методом IFN $\gamma$  ELISpot (фиг. 10), используя в качестве антигена пулы пептидов RG.

Как и ожидалось, с уменьшением дозы уровни иммунного ответа снижались. Более того, вектор ChAd155RG индуцировал более выраженный Т-клеточный ответ по сравнению с ChAd157RG, хотя различие не было статистически достоверным (фиг. 10).

Пример 5. Оценка инфекционности.

#### 5.1) Инфекционность векторов, содержащих трансген HIV Gag.

Инфекционность вирусов оценивали в адгезированных клетках Procell 92, используя антитело против белка гексон аденовируса для визуализации инфицированных клеток при помощи иммуноцитохимического окрашивания. Антитело к белку гексону распознает все серотипы аденовируса. Для этого клетки Procell 92 высевали в 24-луночный планшет при плотности  $2 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл и инфицировали в двойной повторности векторами ChAd157/GAG и ChAd155/GAG и ChAd19/GAG, используя MOI, составляющую 1 вч/клетку, 0,5 вч/клетку и 0,25 вч/клетку. Через 48 часов после инфицирования инфицированные клетки фиксировали холодным метанолом и затем метили антителом к гексону. Излишек антитела удаляли. Затем меченные клетки инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена и выявляли с использованием в качестве субстрата коммерческого набора VECTOR NOVARED (SK-4800). Выявление основано на реакции ферментной метки, пероксидазы хрена, с субстратом DAB, в результате чего образуется темно-коричневый продукт. Затем проводили количественное определение меченных темно-коричневых клеток при помощи световой микроскопии и рассчитывали инфекционный титр. Результаты представлены в таблице, приведенной ниже.

Вирус	Вирусных частиц/мл	Инфекционных единиц/мл	R (вч/инф. ед.)
ChAd155 GAG	1,32E+11	1,58E+09	84
ChAd157 GAG	1,17E+11	1,23E+09	95
ChAd19 GAG	4,46E+10	3,86E+08	116

Результаты свидетельствуют, что инфекционность вирусов ChAd155 и ChAd157 сопоставима и превышает таковую для ChAd19.

#### 5.2) Инфекционность векторов, содержащих трансген RG.

Инфекционность очищенных вирусов ChAd157/RG и ChAd155/RG оценивали в адгезированных клетках Procell 92 при помощи иммуноцитохимического окрашивания, как описано выше. Результаты представлены в таблице, приведенной ниже.

Вирус	Вирусных частиц/мл	Инфекционных единиц/мл	R (вч/инф. ед.)
-------	--------------------	------------------------	-----------------

<b>ChAd155/RG</b>	4,23E+11	4,06E+09	<b>104</b>
<b>ChAd157/RG</b>	1,97E+11	1,46E+09	<b>133</b>

Результаты свидетельствуют, что инфекционность вирусов ChAd155 и ChAd157 сопоставима.

Пример 6. Оценка перекрестной нейтрализации между векторами ChAd155 и ChAd157.

6.1) Исследование *in vivo* того, имеют ли векторы ChAd155 и ChAd157 разные серотипы.

Перекрестную нейтрализацию между векторами ChAd155 и ChAd157 оценивали на мышах BALB/c (6 на группу). Мышей дважды предварительно иммунизировали на 0 и 3 неделе  $10^9$  вч ChAd155 или ChAd157, экспрессирующими RG, или ложно вакцинировали забуференным физиологическим раствором. Три недели спустя всех мышей иммунизировали однократно  $10^9$  вч ChAd157, кодирующим HIV gag.

Группы	n	Двукратная преиммунизация на 0 неделе и 3 неделе	доза (вч)	Иммунизация 6 неделя	доза (вч)
1	6	PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор)	-	ChAd157-GAG	$10^9$
2	6	ChAd155-RG	$10^9$	ChAd157-GAG	$10^9$
3	6	ChAd157-RG	$10^9$	ChAd157-GAG	$10^9$

На 5 неделе (через 2 недели после второй инъекции) в сыворотках определяли нейтрализующие титры к векторам, использованным для предварительной иммунизации, при помощи теста нейтрализации *in vitro* (Фиг. 11). Наконец, через 3 недели после иммунизации оценивали Т-клеточный ответ против gag на спленоцитах при помощи IFN- $\gamma$  ELISpot с использованием эпитопа GAG для CD8+ Т клеток, картированного у мышей BALB/c (фиг. 12). Дозы векторов, использованные для предварительной иммунизации, были способны вызывать хорошую нейтрализующую активность против двух Ad(аденовирусных)-векторов, несмотря на наличие некоторой вариабельности. Нейтрализующие антитела к ChAd155 не реагируют перекрестно с ChAd157 и наоборот (фиг. 11). Более того, предсуществующий иммунитет к ChAd155 не влиял на ChAd157-Gag Т-клеточный ответ, подтверждая отсутствие перекрестной нейтрализации (фиг. 12).

Взятые вместе, эти данные позволяют предположить, что ChAd155 и ChAd157 представляют собой аденовирусы разных серотипов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом, содержащий полинуклеотид, кодирующий:

(а) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99,8% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и

(б) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, или функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, где полинуклеотид дополнительно кодирует гетерологичный полипептид, и полинуклеотид, кодирующий гетерологичный полипептид, функционально связан с одной или более чем одной последовательностью, направляющей экспрессию гетерологичного полипептида.

2. Иммуногенная композиция, содержащая рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

3. Клетка, содержащая рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1.

4. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где полинуклеотид содержит:

а) полинуклеотид с SEQ ID NO: 2 и

б) полинуклеотид с SEQ ID NO: 4.

5. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, дополнительно содержащий полинуклеотид, кодирующий:

(а) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; или

(б) функциональное производное полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, где функциональное производное имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60% идентична на всем своем протяжении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

6. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где полинуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO: 6.

7. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где полинуклеотид содержит по меньшей мере одно из следующего:

(а) аденовирусный 5'-инвертированный концевой повтор;

(б) аденовирусную область E1A или ее фрагмент, выбранный из областей E1A\_280R и E1A\_243R;

(в) аденовирусную область E1B или IX или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из областей E1B\_19K, E1B\_55K или IX;

(г) аденовирусную область E2B или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из областей E2B\_pTP, E2B\_полимераза и E2B\_IVa2;

(д) аденовирусную область L1 или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L1\_13.6k, L1\_52k и белка L1\_IIIa;

(е) аденовирусную область L2 или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L2\_пентон, L2\_pVII, L2\_V и белка L2\_pX;

(ж) аденовирусную область L3 или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L3\_pVI, белка L3\_гексон и L3\_протеазы;

(з) аденовирусную область E2A;

(и) аденовирусную область L4 или ее фрагмент, где указанный фрагмент кодирует аденовирусный белок, выбранный из группы, состоящей из белка L4\_100k, белка L4\_33k и белка L4\_VIII;

(к) аденовирусную область E3 или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из E3 ORF1, E3 ORF2, E3 ORF3, E3 ORF4, E3 ORF5, E3 ORF6, E3 ORF7, E3 ORF8 и E3 ORF9;

(л) аденовирусную область L5 или ее фрагмент, кодирующий белок фибриллы L5\_фибрилла;

(м) аденовирусную область E4 или ее фрагмент, выбранный из группы, состоящей из E4 ORF7, E4 ORF6, E4 ORF4, E4 ORF3, E4 ORF2 и E4 ORF1;

(н) аденовирусный 3'-инвертированный концевой повтор; и/или

(о) аденовирусную область VAI или VAII PНК из аденовируса, отличного от ChAd157.

8. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где полинуклеотид содержит полинуклеотид, который идентичен по меньшей мере на 95% на всем своем протяжении эталонной последовательности, по существу, состоящей из SEQ ID NO: 15 или 22.

9. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.8, где полинуклеотид содержит или состоит из полинуклеотида, который идентичен по меньшей мере на 99,5% на всем своем протяжении эталонной последовательности.

10. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.9, где полинуклеотид содержит или состоит из полинуклеотида, который идентичен на всем своем протяжении эталонной последовательности.

11. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где аденовирусный вектор является репликативно-компетентным.

12. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где аденовирусный вектор является репликативно-некомпетентным.

13. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.12, где аденовирусный вектор содержит функциональную инактивацию.

14. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.13, где функциональная инактивация представляет собой делецию.

15. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.13, где функциональная инактивация содержит мутацию или делецию, которая делает нефункциональным по меньшей мере один ген в области генома, выбранной из группы, состоящей из E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4.

16. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где гетерологичный полипептид представляет собой антигенный белок или его фрагмент.

17. Рекомбинантный обезьяний аденовирусный вектор с выделенным полинуклеотидом по п.1, где одна или более чем одна последовательность, направляющая экспрессию гетерологичного полипептида, выбрана из одной или более последовательностей из группы, состоящей из: последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, последовательности промотора и последовательности энхансера.

18. Иммуногенная композиция по п.2, дополнительно содержащая адъювант.

19. Клетка по п.3, где клетка представляет собой клетку-хозяина, которая экспрессирует по меньшей мере один аденовирусный ген, выбранный из группы, состоящей из E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 и L5.



```

          330      340      350      360      370      380      390      400
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
12_ChAd157  ...KTSGLDYDINGAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
01_ChAd3    ...KTSGLDYDINGAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
02_PanAd3   ...KTSGLDYDINGAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
03_ChAd17   ...KTSGLDYDINGAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
04_ChAd19   ...KTSGLDYDINGAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
05_ChAd24   ...KTSGLDYDINGAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
06_ChAd155  ...NKTAKGLIYDDTAIAINAGDGLQFGSGSDTNPLKTKGGLDYDSNRAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
07_ChAd11   ...NKTAKGLIYDDTAIAINAGDGLQFGSGSDTNPLKTKGGLDYDSNRAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
08_ChAd20   ...NKTAKGLIYDDTAIAINAGDGLQFGSGSDTNPLKTKGGLDYDSNRAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
09_ChAd31   ...NKTAKGLIYDDTAIAINAGDGLQFGSGSDTNPLKTKGGLDYDSNRAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
10_PanAd1   ...NKTAKGLIYDDTAIAINAGDGLQFGSGSDTNPLKTKGGLDYDSNRAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
11_PanAd2   ...NKTAKGLIYDDTAIAINAGDGLQFGSGSDTNPLKTKGGLDYDSNRAIIKLG TGLSFDNTGAI TVGNTDDKLLTWT
    
```

```

          410      420      430      440      450      460      470      480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
12_ChAd157  TPDPSPNCRIHSKDKKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
01_ChAd3    TPDPSPNCRIHSKDKKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
02_PanAd3   TPDPSPNCRIHSKDKKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
03_ChAd17   TPDPSPNCRIHSKDKKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
04_ChAd19   TPDPSPNCRIHSKDKKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
05_ChAd24   TPDPSPNCRIHSKDKKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
06_ChAd155  TPDPSPNCRIHSKDKAKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
07_ChAd11   TPDPSPNCRIHSKDKAKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
08_ChAd20   TPDPSPNCRIHSKDKAKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
09_ChAd31   TPDPSPNCRIHSKDKAKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
10_PanAd1   TPDPSPNCRIHSKDKAKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
11_PanAd2   TPDPSPNCRIHSKDKAKFTLVLTCKGGSQILASVVALEVSGGLAIIIGTVTSIIIFLRFDNGVLENSSSLDPQYWNPRNG
    
```

Фиг. 1В

```

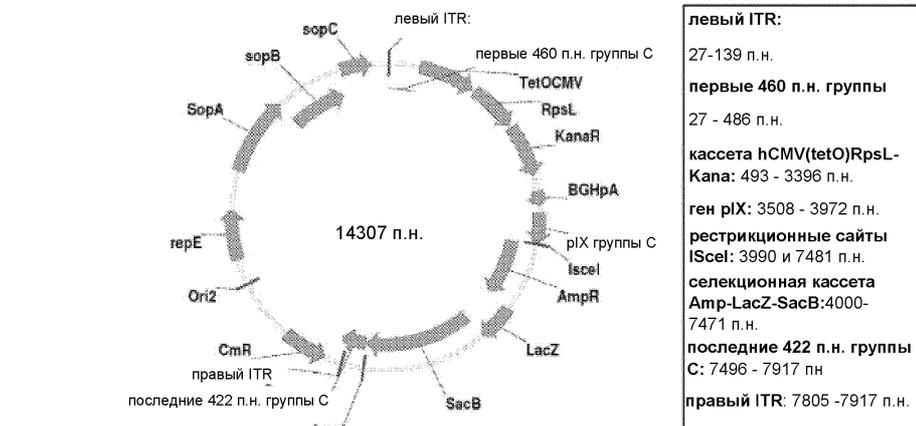
          490      500      510      520      530      540      550      560
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
12_ChAd157  STTAAAYTNNAVGFMPNLAAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSSTQVSYYSMSFPMWNSDCK
01_ChAd3    STTAAAYTNNAVGFMPNLAAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSSTQVSYYSMSFPMWNSDCK
02_PanAd3   STTAAAYTNNAVGFMPNLAAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSSTQVSYYSMSFPMWNSDCK
03_ChAd17   STTAAAYTNNAVGFMPNLAAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSSTQVSYYSMSFPMWNSDCK
04_ChAd19   STTAAAYTNNAVGFMPNLAAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSSTQVSYYSMSFPMWNSDCK
05_ChAd24   STTAAAYTNNAVGFMPNLAAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSSTQVSYYSMSFPMWNSDCK
06_ChAd155  STTECTAYTNNAVGFMPNLTAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSDQATVSYYSMSFPMWNSDCK
07_ChAd11   STTECTAYTNNAVGFMPNLTAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSDQATVSYYSMSFPMWNSDCK
08_ChAd20   STTECTAYTNNAVGFMPNLTAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSDQATVSYYSMSFPMWNSDCK
09_ChAd31   STTECTAYTNNAVGFMPNLTAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSDQATVSYYSMSFPMWNSDCK
10_PanAd1   STTECTAYTNNAVGFMPNLTAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSDQATVSYYSMSFPMWNSDCK
11_PanAd2   STTECTAYTNNAVGFMPNLTAYPKTQSQTAKNIVSQVYVYLNQDCKSKPMTLTIITLNGTNESSDQATVSYYSMSFPMWNSDCK
    
```

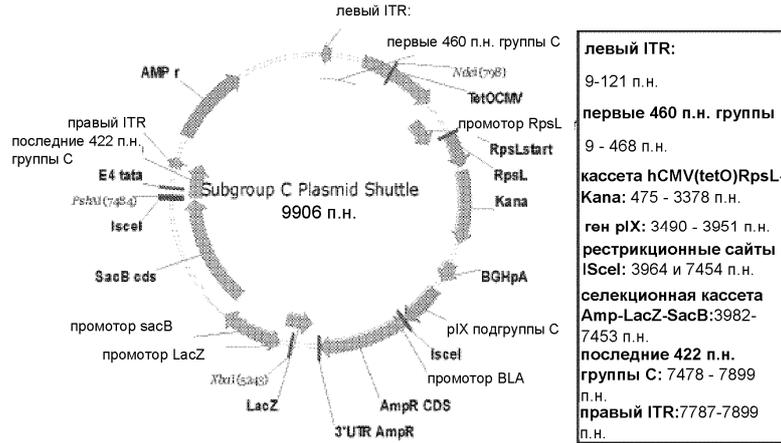
```

          570
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
12_ChAd157  YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
01_ChAd3    YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
02_PanAd3   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
03_ChAd17   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
04_ChAd19   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
05_ChAd24   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
06_ChAd155  YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
07_ChAd11   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
08_ChAd20   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
09_ChAd31   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
10_PanAd1   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
11_PanAd2   YATTEFTTNSFTFSYIAEQ
    
```

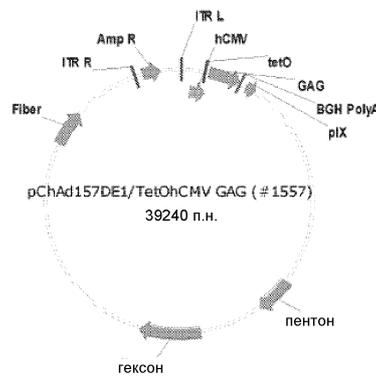
Фиг. 1Г



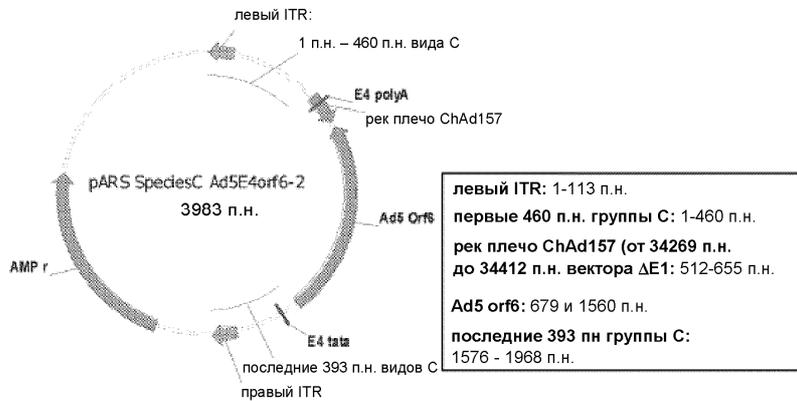
Фиг. 2



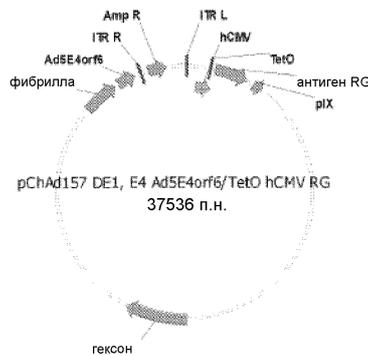
Фиг. 3



Фиг. 4

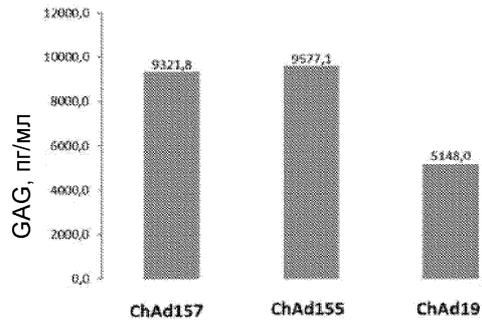


Фиг. 5

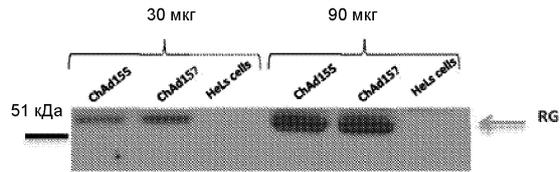


Фиг. 6

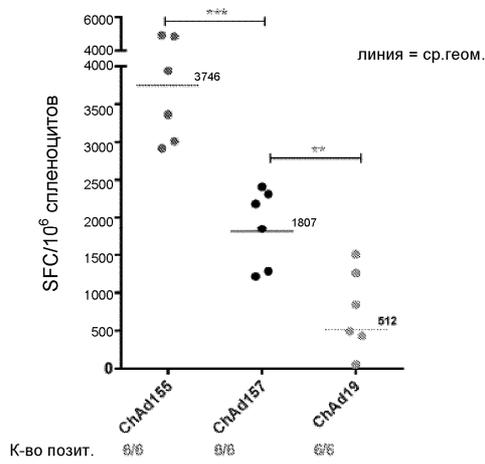
042571



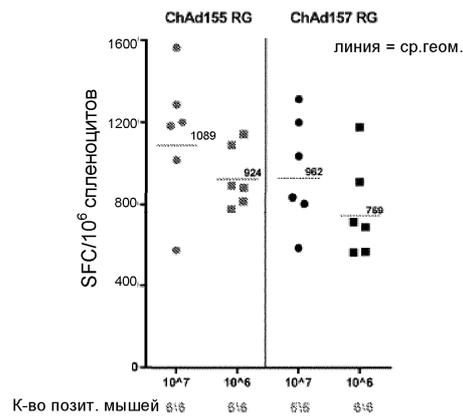
Фиг. 7



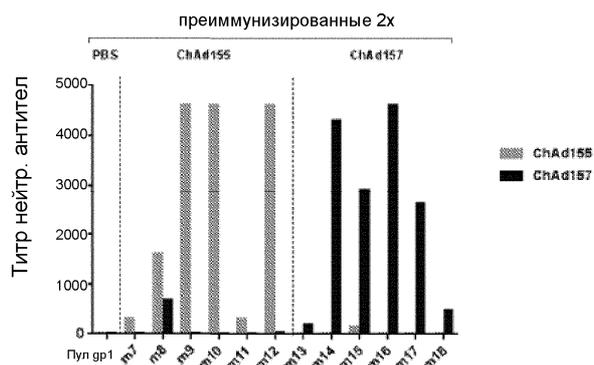
Фиг. 8



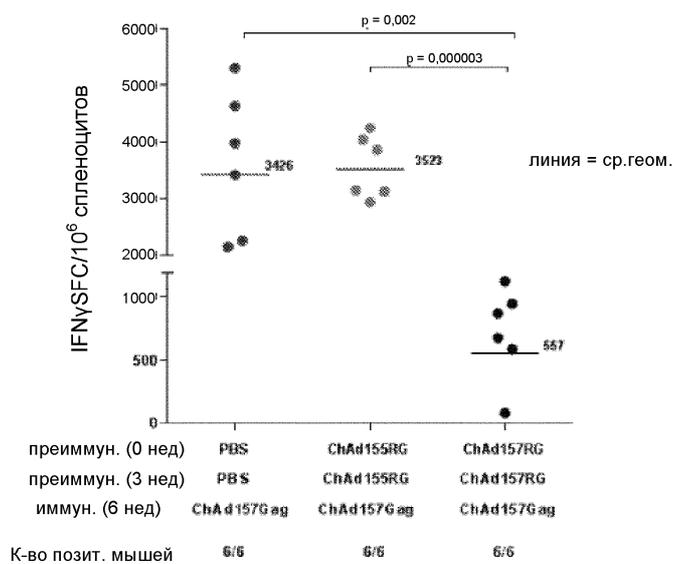
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

