

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045436**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.24

(21) Номер заявки
202091039

(22) Дата подачи заявки
2018.10.30

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(54) АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 17199350.4

(32) 2017.10.31

(33) EP

(43) 2020.08.10

(86) PCT/EP2018/079719

(87) WO 2019/086461 2019.05.09

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

(72) Изобретатель:
**Эйл Тако Жилль, Рой Соумитра,
Веллингга Йорт, Кан Селина, Кюстерс
Жером Х.Х.В. (NL)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,
Соколов Р.А. (RU)**

(56) WO-A2-2007104792

D. WEVERS ET AL.: "Novel Adenoviruses in Wild Primates: a High Level of Genetic Diversity and Evidence of Zoonotic Transmissions", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 85, no. 20, 15 October 2011 (2011-10-15), pages 10774-10784, XP055048541, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00810-11, cited in the application, figures 1, 2; table 4

ROBERTS DIANE M. ET AL.: "Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity", NATURE, vol. 441, no. 7090, 11 May 2006 (2006-05-11), pages 239-243, XP002385300, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE04721, cited in the application, the whole document, figure 1

JULIO ALONSO-PADILLA ET AL.: "Development of Novel Adenoviral Vectors to Overcome Challenges Observed With HAdV-5-based Constructs", MOLECULAR THERAPY, vol. 24, no. 1, 24 November 2015 (2015-11-24), pages 6-16, XP055348714, US, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2015.194, the whole document

JIANGTAO M.A. ET AL.: "Manipulating Adenovirus Hexon Hypervariable Loops Dictates Immune Neutralisation and Coagulation Factor X-dependent Cell Interaction In Vitro and In Vivo", PLOS PATHOGENS, vol. 11, no. 2, 6 February 2015 (2015-02-06), page e1004673, XP055422282, DOI: 10.1371/journal.ppat.1004673, abstract

WO-A2-2006040330

(57) Изобретение относится к химерным аденовирусным векторам. Химерные аденовирусные векторы по изобретению можно использовать для индукции защитного иммунного ответа у субъекта.

045436 B1

045436 B1

Область техники, к которой относится изобретение

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

Предпосылки изобретения

Векторы на основе рекомбинантных аденовирусов широко используются в связанных с генной терапией областях применения и для вакцин. Было показано, что вакцины на основе вектора AdV-5 вызывают эффективные и защитные иммунные ответы в ряде различных животных моделей (см., например, WO 2001/02607; WO 2002/22080; Shiver et al., Nature, 415:331 (2002); Letvin et al., Ann. Rev. Immunol. 20:73 (2002); Shiver and Emini, Ann. Rev. Med. 55:355 (2004)). Тем не менее применимость вакцин на основе рекомбинантного вектора AdV-5, вероятно, будет ограничена высокой серопревалентностью AdV-5-специфических нейтрализующих антител (NAb) в популяциях людей. В исследованиях на мышах, макаках-резусах и людях было показано, что существование иммунитета против AdV-5 существенно подавляет иммуногенность вакцин на основе AdV-5.

Одна перспективная стратегия, позволяющая обойти наличие предсуществующего иммунитета у индивидуумов, ранее инфицированных или получавших лечение наиболее распространенным аденовирусом человека, например AdV-5, предусматривает разработку рекомбинантных векторов на основе серотипов аденовирусов, которые не подвергаются воздействию таких предсуществующих механизмов иммунной защиты. Одна из таких стратегий основана на применении химерных аденовирусов, предусматривающих замену нативных последовательностей капсидных белков (например, последовательностей белков гексона и/или фибры) на последовательности капсидных белков (например, последовательности белков гексона и/или фибры) от аденовирусов с низкой (или отсутствующей) серопревалентностью.

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

Краткое описание изобретения

Настоящим изобретением предусмотрены аденовирусные векторы. Аденовирусный вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор может содержать полипептидную последовательность гексона, предусматривающую SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор дополнительно предусматривает делецию E1. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор дополнительно предусматривает делецию E3. Аденовирусный вектор может дополнительно содержатьorf6 E4 аденовируса-5 человека (HAdV-5). Аденовирусный вектор может, например, содержать последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор дополнительно содержит по меньшей мере один трансген. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один трансген расположен в области делеции E1, в области делеции E3 и/или в участке, прилегающем к правому инвертированному концевому повтору (rITR).

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты из аденовируса-26 человека (Ad26).

Настоящим изобретением также предусмотрены рекомбинантные клетки, содержащие описанные в данном документе аденовирусные векторы. Настоящим изобретением также предусмотрены способы получения аденовирусных векторов. Способы включают (а) выращивание раскрытых в данном документе рекомбинантных клеток в условиях, обеспечивающих продуцирование аденовирусного вектора; и (b) выделение аденовирусного вектора из рекомбинантной клетки.

Настоящим изобретением также предусмотрены иммуногенные композиции, содержащие описанные в данном документе аденовирусные векторы и фармацевтически приемлемый носитель. Также настоящим изобретением предусмотрены способы индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Способы предусматривают введение субъекту описанных в данном документе иммуногенных композиций. Настоящим изобретением также предусмотрены способы получения иммуногенных композиций, при этом способы предусматривают объединение описанных в данном документе аденовирусных векторов с фармацевтически приемлемым носителем.

Краткое описание графических материалов

Вышеизложенное краткое описание, а также нижеследующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Следует понимать, однако, что настоящее изобре-

тение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На фиг. 1 показана схема замен в последовательности гексона для описанных в данном документе содержащих химерный гексон векторов.

На фиг. 1А показана схема, демонстрирующая местоположения в гене, кодирующем полноразмерный гексон HAdV-26 (незаштрихованная полоска), пяти сегментов гена гексона (серые полоски) и семи коротких гипервариабельных областей (HVR) (черные полоски), которые предварительно были заменены с гексонов HAdV-5 на гексоны HAdV-48 с получением содержащего химерный гексон HAdV-5 вектора Ad5HVR48(1-7) (Roberts et al., Nature, 441:239-43 (2006)).

На фиг. 1В показаны результаты частичного выравнивания полипептидных последовательностей гексонов HAdV-26, PtroAdV-1, PtroAdV-12 и PtroAdV-13. Серые полоски соответствуют пяти сегментам гена гексона, которые согласно настоящему документу были заменены с HAdV-26 на PtroAdV-1, PtroAdV-12 или PtroAdV-13. Черными полосками указаны последовательности, соответствующие вышеупомянутым ранее обозначенным HVR, которые были заменены с HAdV-5 на HAdV-48.

На фиг. 2 показана схема химерных векторов pAd26.

На фиг. 2А показана схема общих элементов pAd26.HVRPtr12.luc (SEQ ID NO: 21).

На фиг. 2В показана схема общих элементов pAd26.HVRPtr13.luc (SEQ ID NO: 22).

На фиг. 3 показана схема общих элементов pAd26.ApoA1.RSVF-2A-GLuc (SEQ ID NO: 29).

На фиг. 4 показана схема стратегии гомологичной рекомбинации, которая была использована для создания аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc (в E1-дополняющих клетках).

На фиг. 5 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc.

На фиг. 5А показана схема эксперимента.

На фиг. 5В показан график иммунного ответа, индуцированного Ad26.FLuc, Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc против кодируемого вектором антигена (т.е. Fluc, люциферазы светлячка), как определено с помощью анализа ELISPOT с применением интерферона гамма (IFN- γ). По оси у показано количество пятнообразующих единиц (SFU) на 10 спленоцитов, а пунктирной линией обозначено значение 95% процентиля для средовых стимуляторов.

На фиг. 6 показаны клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc.

На фиг. 6А показана схема эксперимента.

На фиг. 6В показаны результаты анализа нейтрализации вируса RSV A2 (VNA), проведенного через восемь недель после иммунизации посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc, Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc.

На фиг. 6С показан клеточный иммунный ответ, индуцированный посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc, Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc, против кодируемого вектором антигена RSV F, как определено с помощью анализа ELISPOT с применением IFN- γ . По оси у показано количество пятнообразующих единиц (SFU) на 10 спленоцитов, а пунктирной линией обозначено значение 95% процентиля для средовых стимуляторов.

На фиг. 6D показан график RSVF-специфических связывающих антител IgG, индуцированных Ad26.RSVF-2A-GLuc, Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc в сыворотке крови иммунизированных мышей через 8 недель после иммунизации. На графике изображены титры по результатам ELISA с IgG, рассчитанные как конечные показатели титра (\log_{10}).

На фиг. 7 показаны титры нейтрализации гомологичных и гетерологичных аденовирусов, индуцированные у мышей, иммунизированных аденовирусными векторами Ad35, Ad26, Ad5, Ad4, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13.

На фиг. 8 показана серопревалентность для Ad26, Ad5, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 в образцах сыворотки крови, полученных от группы из 200 взрослых человек в возрасте от 18 до 55 лет, проживающих в Соединенных Штатах (США) и Европейском союзе (ЕС). Титры нейтрализации, измеренные в данных образцах сыворотки крови для каждого вектора, были разделены на четыре категории (<16 (нейтрализация отсутствовала), от 16 до 300, от 300 до 1000, от 1000 до 4000 и >4000), представленные в указанных диаграммах.

На фиг. 9 показана продуктивность в отношении новых содержащих химерный капсид векторов AdHVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc в линии клеток-продуцентов sPER.C6.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере отчасти, на создании химерных аденовирусных векторов, содержащих остов аденовируса человека и по меньшей мере одну из полипептидных последовательностей химерных гексона или фибры. Аденовирусные векторы способны вызывать иммунный ответ, при этом сохраняя низкую серопревалентность. Аденовирусные векторы можно составлять для получения вакцин и применять для индуцирования защитного иммунитета против конкретных представ-

ляющих интерес антигенов.

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

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

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

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

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалистам в данной области будет известно, или же они смогут установить с помощью постановки стандартного эксперимента многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления описанного в данном документе настоящего изобретения. Такие эквиваленты подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением.

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

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

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

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

В данном контексте "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, которого будут вакцинировать или которое было вакцинировано согласно способу в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. В данном контексте термин "млекопитающее" охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают без ограни-

чения коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. д., более предпочтительно человека.

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

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

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

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

Оптимальное выравнивание последовательностей для их сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологичного выравнивания Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства по Пирсону-Липману, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном комплексе Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Сайенс-Драйв 575, Мэдисон, Висконсин) или с помощью визуального изучения (см., в целом, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschuel et al. (1977), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является общедоступным посредством Национального центра биотехнологической информации. Данный алгоритм предусматривает первоначальную идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) путем идентификации коротких слов с длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторой положительной пороговой оценке T при выравнивании со словом той же длины в последовательности из базы данных. T называют порогом показателя сходства соседних слов (Altschul et al. выше). Данные начальные совпадения соседних слов выполняют роль запусков для начала поисков с целью выявления более длинных HSP, которые их содержат. Совпадения слов затем продлевают в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько можно увеличить совокупный показатель выравнивания.

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

Помимо расчета процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)). Одним из показателей сходства, который выдается алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота считается схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

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

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

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

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

Используемый в данном документе термин "химерный" означает ген, нуклеиновую кислоту, белок, пептид или полипептид, который содержит два или более генов, нуклеиновых кислот, белков, пептидов или полипептидов, которые в обычных условиях не связаны друг с другом. "Химерный" ген, нуклеиновая кислота или белок могут представлять собой слитую молекулу из двух или более неродственных последовательностей (например, двух или более различных нуклеиновых кислот, которые кодируют два или более различных белков). "Химерные" ген, нуклеиновая кислота или белок могут представлять собой слитую молекулу из двух или более родственных последовательностей (например, нуклеиновых кислот, которые кодируют один и тот же белок, однако при этом нуклеиновые кислоты получены из различного исходного материала, т.е. одна нуклеиновая кислота происходит от человека, а другая нуклеиновая кислота происходит от представителя обезьянообразных).

Аденовирусные векторы.

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

"Капсидный белок" относится к белку на капсиде аденовируса или его функциональному фрагменту или производному, который задействуют при определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. К капсидным белкам, как правило, относятся белки фибры, пентона и/или гексона. В определенных вариантах осуществления капсидный белок представляет собой весь или полноразмерный капсидный белок аденовируса. В других вариантах осуществления капсидный белок представляет собой

фрагмент или производное полноразмерного капсидного белка аденовируса. В определенных вариантах осуществления гексон, пентон и фибра, кодируемые аденовирусным вектором по настоящему изобретению, происходят от одного и того же или различных аденовирусов.

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

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

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

Гипервариабельные области (HVR) гексона представляют собой области полипептида гексона, характеризующиеся наибольшей вариабельностью среди различных аденовирусных серотипов. Как правило, считается, что эти HVR соответствуют контактирующим с растворителем поверхностям тримера белка гексона (в контексте интактной вирусной частицы), и, соответственно, ожидается, что они будут выступать в роли важных детерминант антитело-опосредованной нейтрализации аденовируса (Roberts et al., *Nature*, 441:239-43 (2006)). Поэтому замена HVR гексона данного аденовирусного вектора на HVR гексона аденовируса с низкой (или отсутствующей) серопревалентностью у людей представляет собой возможное средство для преодоления преобладающего противовекторного гуморального иммунитета в целевых популяциях людей. Соответственно, было проведено множество исследований, посвященных изучению идеи химерных гексонов, в основном затрагивающих замену последовательностей гексона в векторах на основе HAdV-5 (Roy et al., *J. Virol.* 72:6875-9 (1998); Gall et al., *J. Virol.* 72:10260-4 (1998); Youil et al., *Hum. Gene Ther.* 13:311-20 (2002); Wu et al. *J. Virol.* 76:12775-82 (2002); Roy et al., *Virology.* 333:207-14 (2005); Roberts et al., *Nature*, 441:239-43 (2006); Bradley et al., *J. Virol.* 86:1267-72 (2012); Yu et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 421:170-6 (2012); Bruder et al., *PLoS One*, 7(4):e33920 (2012)).

Второй мишенью нейтрализующих антител к аденовирусам является белок фибры. Замена белка фибры на последовательности фибры от редких аденовирусов, которые имеют происхождение от отличного от человека животного, более предпочтительно замена переменных последовательностей в белке фибры, также может позволять конструировать аденовирусные векторы, которые будут менее восприимчивы к нейтрализации антителами, обычно встречающимися у людей. Сочетание описанных выше замен фибр с заменами гексонов может придать дополнительную устойчивость к нейтрализации антителами, обычно присутствующими в популяциях людей.

Настоящим изобретением предусмотрены химерные аденовирусные векторы, содержащие трансгены и последовательности нуклеиновых кислот химерных гексонов. Аденовирусные векторы могут, например, содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах осуществления полипептидная последовательность гексона предусматривает SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. Аденовирусный вектор может, например, содержать одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты из аденовируса-4 человека, аденовируса-5 человека, аденовируса-26 человека или аденовируса-35 человека. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

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

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

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

Преимущества аденовирусных векторов при применении в качестве вакцин включают легкость использования, хорошую технологичность производства в широком масштабе и превосходные показатели безопасности, основанные на многолетнем опыте исследований, разработки, производства и клиниче-

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

В более предпочтительном варианте осуществления вектор на основе аденовируса шимпанзе из второй композиции представляет собой ChAdV3. Рекомбинантный аденовирус шимпанзе серотипа 3 (ChAd3 или cAd3) представляет собой аденовирус подгруппы С со свойствами, сходными со свойствами аденовируса человека серотипа 5 (Ad5). В исследованиях на людях, в которых оценивали кандидатные вакцины к вирусу гепатита С (HCV), было показано, что ChAd3 является безопасным и иммуногенным (Barnes E, et al., 2012, *Science translational medicine*, 4:115ra1). Сообщалось, что вакцины на основе ChAd3 были способны индуцировать иммунный ответ, сравнимый с вакциной, предусматривающей вектор на основе Ad5 человека. См., например, Peruzzi D., et al., 2009, *Vaccine*, 27:1293-300 и Quinn K.M., et al., 2013, *J. Immunol.* 190: 2720-35; WO 2005/071093; WO 2011/0130627 и т.д.

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

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

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

В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой химерный

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

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

При необходимости последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гексон или фибру в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, и/или трансген, можно подвергать оптимизации в отношении кодонов для обеспечения надлежащей экспрессии у подвергаемого обработке хозяина (например, у человека). Оптимизация кодонов представляет собой технологию, широко применяемую в данной области техники.

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

В предпочтительных вариантах осуществления аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Иммуногенные композиции.

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

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

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

К другим адъювантам, которые можно вводить, относятся лектины, факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (gCSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (gMCSF), фактор некроза опухоли (TNF), эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12 или кодирующие их нуклеиновые кислоты.

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

Способ индуцирования защитного иммунитета.

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном иллюстративном режиме аденовирусный вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме от приблизительно 100 мкл до приблизительно 10 мл, содержащем концентрации приблизительно от 10^4 до 10^{12} вирусных частиц/мл. Предпочтительно аденовирусный вектор вводят в объеме от 0,1 до 2,0 мл. Например, аденовирусный вектор можно вводить в объеме 100 мкл, 500 мкл, 1 мл, 2 мл. Более предпочтительно аденовирусный вектор вводят в объеме 0,5 мл. Необязательно, аденовирусный вектор можно вводить в концентрации приблизительно 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} или 10^{12} в.ч./мл. Как правило, аденовирусный вектор вводят в количестве от приблизительно 10^9 до приблизительно 10^{12} вирусных частиц (в.ч.) субъекту-человеку за одно введение, более типично в количестве от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{12} в.ч. После начальной вакцинации идет бустерная инъекция, как описано выше.

После начальной вакцинации может идти бустерная или вторичная инъекция вакцины/композиции,

содержащей тот же аденовирусный вектор, кодирующий представляющий интерес антиген, или вакцины/композиции, содержащей другой аденовирусный вектор, кодирующий тот же представляющий интерес антиген.

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

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

Варианты осуществления

Вариант осуществления 1 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид гексона, предусматривающий полипептид, охватывающий гипервариабельные области гексона, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 2 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 1, где полипептидная последовательность гексона предусматривает SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 3 представляет собой аденовирусный вектор по варианту осуществления 1 или 2, где аденовирусный вектор дополнительно предусматривает делецию E1.

Вариант осуществления 4 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-3, где аденовирусный вектор дополнительно предусматривает делецию E3.

Вариант осуществления 5 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-4, где аденовирусный вектор дополнительно содержитorf6 E4 аденовируса-5 человека (HAdV-5).

Вариант осуществления 6 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-5, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 7 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-6, где аденовирусный вектор дополнительно содержит по меньшей мере один трансген.

Вариант осуществления 8 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-7, где трансген расположен в области делеции E1, в области делеции E3 и/или в участке, прилегающем к правому инвертированному концевому повтору (rITR).

Вариант осуществления 9 представляет собой аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-8, где аденовирусный вектор содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты из аденовируса-26 (Ad26) человека.

Вариант осуществления 10 представляет собой рекомбинантную клетку, содержащую вектор по любому из вариантов осуществления 1-9.

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

Вариант осуществления 12 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую аденовирусный вектор по любому из вариантов осуществления 1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ индуцирования иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту иммуногенной композиции по варианту осуществления 12.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ получения иммуногенной композиции, при этом способ включает объединение аденовирусного вектора по любому из вариантов осуществления 1-9 с фармацевтически приемлемым носителем.

Примеры

Пример 1. Разработка содержащих химерный гексон аденовирусных векторов Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13.

В данном примере описаны схемы Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, которые являются новыми векторами на основе HAdV-26, несущими определенные замены в последовательности гексона, на последовательности, полученные из аденовирусов шимпанзе. Данные содержащие химерный гексон аденовирусные вектора разрабатывали с целью создания возможных новых основанных на аденовирусах (вакцинных) векторов, которые являются технологичными, серологически отличными от HAdV-26 и против которых имеет место низкий (или вовсе отсутствует) предрасполагающий иммунитет в популяциях людей.

Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, содержащие последовательности генома аденовирусного вектора под SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно, разрабатывали в виде

содержащих химерный гексон версий описанного ранее рекомбинантного вектора HAdV-26 (WO 2007/104792 A2; Abbink et al., 2007). Таким образом, данные векторы разрабатывали таким образом, чтобы они несли одну и ту же делецию E1, делецию E3 и замену *orf6* E4 (на таковую от HAdV-5), как указано ранее (WO 2007/104792 A2; Abbink et al., 2007).

Конкретными вариантами созданных и исследованных в данном примере содержащих химерный гексон векторов, которые описаны в последующих примерах, являются Ad26HVRPtr1.Fluc, Ad26HVRPtr12.Fluc, Ad26HVRPtr13.Fluc, Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc, которые содержат вирусные геномные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 соответственно. Как указано в названиях их векторов, данные векторы были получены таким образом, чтобы они несли в местоположении своей делеции E1 управляемую промотором CMV кассету экспрессии, кодирующую либо люциферазу светлячка (FLuc), либо химерный белок "RSV-Fa2-2A-GLuc" (RSVF-2A-GLuc), который представляет собой слитую молекулу на основе фузогенного гликопротеина респираторно-синцитиального вируса штамма A2 (RSV-F_{2A}), пептида 2A вируса ящура и люциферазы Gaussia (GLuc). Обе кассеты экспрессии FLuc и RSVF-2A-GLuc находятся под управлением промотора CMV и несут сигнал полиаденилирования SV40. Кассета для RSVF-2A-GLuc дополнительно содержит в своей 5'-нетранслируемой области последовательность, предусматривающую интрон 2 гена аполипопротеина A1 (ApoA1) человека.

Аденовирусные векторы Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 (содержащие SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно) разрабатывали как содержащие химерный гексон в том смысле, что определенные сегменты гена гексона в их геномах на основе HAdV-26 заменяли соответствующими сегментами гена гексона других аденовирусов. Вирусами, которые служили донорами последовательности гексона для Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 являлись PtroAdV-1, PtroAdV-12 и PtroAdV-13 соответственно. Данные вирусы были выявлены в образцах фекалий диких шимпанзе и были отнесены к аденовирусам человека вида E (HAdV-E) (Wevers et al., J. Virol. 85(20):10774-84 (2011)). Частичные последовательности кодирующих гексон генов из этих вирусов были предоставлены в открытый доступ под номерами доступа GenBank JN163971, JN163982 и JN163983 соответственно. Учитывая, что акцепторный вектор для последовательностей гексона основан на HAdV-26, т.е. представителе аденовирусов человека вида D (HAdV-D), тогда как три донорных по последовательностям гексона вируса принадлежат к HAdV-E, полученные согласно данному документу векторы представляют собой межвидовые аденовирусные содержащие химерный гексон векторы.

Сегменты гена гексона HAdV-26, которые согласно данному документу были заменены для получения содержащих химерный гексон векторов Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 (и их сконструированные согласно данному документу производные, содержащие трансгенные кассеты экспрессии), соответствовали нуклеотидам 18178-18357, 18379-18438, 18556-18633, 18685-18723 и 19027-19158 полного генома HAdV-26 диконого типа, депонированного под регистрационным номером Genbank EF153474 (версия 1). Эти пять сегментов гена гексона HAdV-26 и их соответствующие заменяющие сегменты, полученные из PtroAdV-1, PtroAdV-12 или PtroAdV-13, в значительной степени, но не полностью, соответствовали последовательностям, кодирующим гипервариабельные области (HVR). Это показано на фиг. 1A, где местоположения пяти сегментов, а также местоположения ранее обозначенных HVR указаны на схематическом представлении гена гексона HAdV-26. Более того, более подробно это проиллюстрировано с помощью результатов выравнивания аминокислот, произведенном с использованием (частичных) полипептидных последовательностей гексона HAdV-26, PtroAdV-1, PtroAdV-12 и PtroAdV-13, где конкретные сегменты, которые в соответствии с данным документом были заменены, специально выделены параллельно с ранее обозначенными HVR (фиг. 1B).

Следует отметить, что пять сегментов гена гексона HAdV-26, которые были в соответствии с данным документом заменены для создания Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, не полностью соответствовали последовательностям, предусматривающим HVR гексона, которые были заменены в предыдущих публикациях, в которых описаны содержащие химерный гексон векторы на основе HAdV-5 (Roberts et al., Nature, 441:239-43 (2006); Bradley et al., J. Virol. 86:1267-72 (2012); Yu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 421:170-6 (2012); Bruder et al., PLoS One. 7(4):e33920 (2012)).

Например, как проиллюстрировано на фиг. 1A и 1B, пять сегментов гена гексона не полностью соответствовали семи аминокислотным участкам, которые ранее заменяли для создания Ad5HVR48(1-7), содержащего химерный гексон вектора на основе HAdV-5 и содержащего HVR гексона из HAdV-48 (Roberts et al., Nature, 441:239-43 (2006)).

Полные нуклеотидные последовательности кодирующих химерные гексоны генов аденовирусных векторов Ad26HVRPtr1 Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 приведены под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 соответственно. Полные полипептидные последовательности химерных гексонов для этих векторов приведены под SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно.

Пример 2. Молекулярное конструирование плазмид, несущих полные геномы аденовирусных векторов Ad26HVRPtr1.Fluc, Ad26HVRPtr12.Fluc и Ad26HVRPtr13.Fluc.

Содержащие геном вектора Ad26HVRPtr1, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 плазмиды, несущие управляемую промотором кассету экспрессии FLuc в аденовирусной области E1, конструировали с по-

мощью тех же способов и той же стратегии, которые описаны ранее для создания содержащего химерный гексон кодирующего Fluc вектора "Ad26.HVR5C" (Ma et al., *J. Cane. Res. Clin. Oncol.* 141(3):419-29 (2015), добавочная фиг. 4). Вкратце, требуемые изменения в кодирующем гексон гене сначала вводили в контексте промежуточной "переносимой ген гексона челночной" плазмиды pHex26-Shuttle.BamHI. Это выполняли с помощью стандартных процедур синтеза и субклонирования генов (проводимых посредством GeneArt (LifeTechnologies, Карлсбад, Калифорния)) и в результате получали модифицированные, переносимые ген гексона челночные плазмиды, несущие вышеупомянутые последовательности кодирующих химерные гексоны генов, указанные под SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15. Затем путем гомологичной рекомбинации в *E.coli* BJ5183 (Stratagene/Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) кодирующие химерные гексоны гены переносили из переносимых ген гексона челночных плазмид в pAd26.luc.dH, плазмиду, которая несет между двумя сайтами рестрикции PacI геном рекомбинантного вектора на основе HAdV-26 с делецией гена гексона, снабженный в местоположении выполненной в нем делеции E1 управляемой промотором CMV касетой экспрессии, кодирующей Fluc. Вышеупомянутые процедуры молекулярного клонирования привели к созданию плазмид pAd26.HVRPtr1.luc (SEQ ID NO: 20), pAd26.HVRPtr12.luc (SEQ ID NO: 21; фиг. 2A) и pAd26.HVRPtr13.luc (SEQ ID NO: 22; фиг. 2B).

Также три плазмиды, кодирующие совпадающие аденовирусные векторы, содержащие химерный гексон, конструировали точно так же, как описано выше. В данных трех плаزمидях, имевших названия pAd26.HVR5.luc (SEQ ID NO: 17), pAd26.HVR35.luc (SEQ ID NO: 18) и pAd26.HVR52.luc (SEQ ID NO: 19), вышеупомянутый набор из пяти сегментов гена гексона HAdV-26 заменяли на соответствующие наборы сегментов от HAdV-5, HAdV-35 и HAdV-52 соответственно. Эти плазмиды содержали нуклеотидные последовательности генов химерного гексона, изложенные под SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25 соответственно. Эти гены гексонов кодируют полипептидные последовательности химерных гексонов, изложенные под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 соответственно.

Пример 3. Первоначальная оценка жизнеспособности, эффективности роста и продуктивности аденовирусных векторов Ad26HVRPtr1.Fluc, Ad26HVRPtr12.Fluc и Ad26HVRPtr13.Fluc.

В предшествующих исследованиях было показано, что химерные аденовирусные векторы, предусматривающие межвидовые аденовирусные замены в последовательности гексонов, зачастую являются нежизнеспособными или могут проявлять замедленную кинетику роста и обеспечивать более низкие выходы (Youil et al., *Hum. Gene Ther.* 13:311-20 (2002); Wu et al., *J. Virol.* 76:12775-82 (2002); Bradley et al., *J. Virol.* 86:1267-72 (2012); Bruder et al., *PLoS One.* 7(4):e33920 (2012)). Поэтому новые содержащие химерный гексон химерные аденовирусные (вакцинные) векторы необходимо подвергать тестированию на основные свойства роста, выход при продуцировании и качество частиц.

Разработанные и сконструированные в соответствии с данным документом содержащие химерный гексон аденовирусные векторы оценивали в отношении их жизнеспособности, эффективности роста, продуктивности и инфекционности частиц, проводя их сравнение с их родительским вектором на основе HAdV-26. С этой целью создавали аденовирусные векторы Ad26HVRPtr1.Fluc, Ad26HVRPtr12.Fluc и Ad26HVRPtr13.Fluc, а также векторы сравнения Ad26HVR5.Fluc, Ad26HVR35.Fluc и Ad26HVR52.Fluc путем трансфекции в соответствии со стандартными процедурами с применением облегчающего трансфекцию реагента липофектамина (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), соответствующими несущими геном вектора Ad плазмидами, которые описаны в примере 2 (т.е. pAd26.HVRPtr1.luc, pAd26.HVRPtr12.luc, pAd26.HVRPtr13.luc, pAd26.HVR5, pAd26.HVR35 и pAd26.HVR52 соответственно), E1-дополняющих клеток PER.55K (Vogels et al., *J. Virol.* 77:8263-71 (2003)), которые культивировали в колбах T25. Перед трансфекциями плазмиды, несущие геном вектора Ad, расщепляли с помощью PacI, высвобождая из плазмиды соответствующие геномы аденовирусных векторов. Культуры трансфицированных клеток ежедневно отслеживали для регистрации дня начала формирования первой вирусной бляшки, а также дня, на который достигался общий цитопатический эффект (CPE) (см. таблицу). При полном CPE собирали инфицированные клетки и среду и высвобождали вирус с помощью трех циклов замораживания-оттаивания. После сбора "спасенных" путем трансфекции вирусов их дополнительно размножали с помощью нескольких последовательных раундов инфицирования в культурах E1-дополняющих клеток. Затем из неочищенной вирусной биомассы выделяли вирусы (с помощью двухстадийной процедуры ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl)), а затем определяли титры вирусных частиц (в.ч.) и инфекционных единиц (ИЕ/мл), все проводили с помощью стандартных способов, которые были описаны ранее (Alba R., Baker A.H., Nicklin S.A. *Vector systems for prenatal gene therapy: principles of adenovirus design and production. Methods Mol. Biol.* 2012; 891:55-84).

Показатели эффективности "спасения", конечных выходов при
продуцировании и отношения в.ч./ИЕ, наблюдаемые для содержащих
химерный гексон аденовирусных векторов

Вектор	Виды HAdV, являющ иеся донором HVR	Эффективность "спасения"			Характеристика очищенной партии	
		Образо вавши хся вирусу ых бляше к	1-я вирусная бляшка (дней п. т.)	Общее количество о СРЕ (дней п. т.)	Общий выход для 25 колб T150 (в. ч.)	Отнош ение в. ч. к ИЕ
Ad26.FLuc	п.а.	Да	3-5	7-8	$1,10 \times 10^{13}$	337
Ad26HVR5.FLuc	С	Да	5	11	$1,05 \times 10^{11}$	4000
Ad26HVR35.FLuc	В	Да	5	12	$1,75 \times 10^{12}$	829
Ad26HVR52.FLuc	G	Нет	-	-	-	-
Ad26HVRPtr1.FLuc	Е	Да	3	9	$3,78 \times 10^{11}$	1029
Ad26HVRPtr12.FLuc	Е	Да	4	8	$2,16 \times 10^{12}$	272
Ad26HVRPtr13.FLuc	Е	Да	3	7	$1,07 \times 10^{13}$	150

п.а. - не применимо;

п.т. - после трансфекции.

Из шести протестированных химерных векторов только Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc давали результаты, свидетельствующие о том, что модификации их капсида не оказывали отрицательного влияния на продуктивность и инфекционность вектора (см. таблицу). Показатели эффективности вирусного "спасения" и роста для этих двух векторов, выраженные посредством времени начала образования бляшек и времени, необходимого для достижения полного СРЕ (после трансфекции вирусной ДНК E1-дополняющих клеток), находились в диапазоне значений, который наблюдали для родительского вектора Ad26.FLuc. Этого не наблюдали в случае остальных протестированных химерных векторов, за исключением Ad26HVRPtr1.FLuc. Более того, из всех протестированных векторов Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc обеспечивали наиболее высокие выходы вирусных частиц (в. ч.) при крупномасштабном продуцировании и очистке. Наконец, хотя все остальные химерные векторы проявляли более высокие показатели отношения в.ч.:ИЕ, чем у родительских Ad26.FLuc, было обнаружено, что для Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc отношение в.ч.:ИЕ изменению не подвергалось.

Четыре остальных химерных вектора, т.е. Ad26HVR5.FLuc, Ad26HVR35.FLuc, Ad26HVR52.FLuc и Ad26HVRPtr1.FLuc, демонстрировали различные степени сниженной производительности и/или инфекционности. Ad26HVR52.FLuc вовсе не был жизнеспособным (т.е. вирусные бляшки нельзя было обнаружить после трансфекции вирусной ДНК), тогда как остальные три вектора успешно подвергались "спасению". Из этих трех Ad26HVR5.FLuc и Ad26HVR35.FLuc явно демонстрировали замедленную кинетику "спасения" и роста, тогда как Ad26HVRPtr1.FLuc, судя по всему, характеризовался приблизительно такой же эффективностью в отношении "спасения" и роста, как родительский вектор. Характеристика очищенных партий векторов позволяла выявить, что физические выходы вирусных частиц были особенно затронуты в случае Ad26HVR5.FLuc и Ad26HVRPtr1.FLuc, тогда как инфекционность частиц оказалась сильно сниженной у всех трех из них (на что указывало более высокое отношение в. ч.:ИЕ, наблюдаемое для этих векторов).

В заключение необходимо отметить, что Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, которые являются содержащими химерный гексон векторами, предусматривающими межвидовые аденовирусные замены в последовательности гексонов, демонстрировали хорошие свойства роста и продуцирования, и поэтому их рассматривают в качестве перспективных кандидатов на роль новых вакцинных векторов (с точки зрения технологичности). Четыре остальных содержащих химерный гексон вектора, которые были созданы с применением той же схемы химерного гексона, но с применением других аденовирусов в качестве донора последовательности гексона, демонстрировали менее благоприятные свойства.

Пример 4. Создание аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc.

В этом примере описано создание содержащих химерный гексон кодирующих Fluc аденовирусных векторов, применяемых в экспериментах по иммуногенности, серопревалентности, перекрестной нейтрализации и технологичности, описанных в примерах 6, 8 и 9.

Аденовирусные векторы Ad26HVRPtr12.FLuc (также обозначаемый Ad26C4NVT005) и Ad26HVRPtr13.FLuc (также обозначаемый Ad26C3NVT005), которые содержали последовательности генома аденовирусного вектора SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 соответственно, получали путем трансфекции соответствующими плазмидами с геномом Ad-вектора (т.е. pAd26.HVRPtr12.luc и pAd26.HVRPtr13.luc соответственно) E1-дополняющих клеток PER.C6. Перед трансфекцией клеток PER.C6, которые выращивали в качестве адгезивных культур клеток на модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 10 мМ MgCl₂, плазмиды с геномом Ad-вектора расщепляли с помощью PacI для высвобождения соответствующих геномов аденовирусных векторов из плазмиды. Трансфекции выполняли в соответствии со стандартными процедурами с применением реагента для трансфекции липофектамина (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния). После сбора вирусов, "спасенных" путем трансфекции, вирусы дополнительно размножали с помощью

нескольких последовательных циклов инфицирования на культурах клеток PER.C6. Вирусы очищали из собранной неочищенной вирусной биомассы с помощью двухстадийной процедуры ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl), как описано ранее (Havenga et al., "Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells", *J. Gen. Virol.* 87(8):2135-43 (2006)). Титры вирусных частиц (в.ч.) измеряли с помощью ранее описанной спектрофотометрической процедуры (Maizel et al., "The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12", *Virology*, 36(1):115-25 (1968)).

Пример 5. Создание аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc.

В этом примере описано создание содержащих химерный гексон кодирующих RSVF-2A-GLuc аденовирусных векторов, применяемых в экспериментах по иммуногенности, описанных в примере 7.

Создание аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемого Ad26C4NVT001) и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc (также обозначаемого Ad26C3NVT001), которые содержали последовательности генома аденовирусного вектора SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 соответственно, предусматривало применение вышеупомянутых плазмид pAd26.HVRPtr12.luc (SEQ ID NO: 21; фиг. 2A) и pAd26.HVRPtr13.luc (SEQ ID NO: 22; фиг. 2B) соответственно, а также плазмиды pAdApt26.ApoAI.RSVF-2A-GLuc (SEQ ID NO: 29; фиг. 3).

pAdApt26.ApoAI.RSVF-2A-GLuc представляет собой плазмиду, несущую фрагмент левого края генома из несущего делецию E1 вектора на основе HAdV-26, который был описан ранее (WO 2007/104792 A2; Abbink et al., 2007), которая в местоположении аденовирусной делеции E1 дополнительно содержит вышеупомянутую трансгенную кассету экспрессии, кодирующую "RSV-Fa2-2A-GLuc" (RSVF-2A-GLuc). pAdApt26.ApoAI.RSVF-2A-GLuc конструировали за несколько стадий стандартного генного синтеза и молекулярного клонирования, которые совместно приводили к созданию указанной кассеты RSVF-2A-GLuc и ее вставки в pAdApt26, ранее описанной плазмиды, несущей указанный фрагмент левого края генома Ad-вектора (WO 2007/104792 A2; Abbink et al., 2007).

Аденовирусные векторы Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc создавали так, как описано далее. Плазмиды pAd26.HVRPtr12.luc и pAd26.HVRPtr13.luc расщепляли рестрикционными ферментами PacI и PsiI с целью высвобождения из этих плазмид определенного делетированного по левому краю фрагмента генома аденовирусного вектора размером 28 т. п. о., содержащего последовательность химерного гексона. Каждым из полученных соответствующих продуктов расщепления по отдельности совместно с расщепленной посредством PacI pAdApt26.ApoAI.RSVF-2A-GLuc трансфицировали E1-дополняющие клетки PER.C6 для обеспечения возможности "спасения" соответствующих содержащих химерный гексон вирусов, кодирующих RSVF-2A-GLuc, посредством гомологичной рекомбинации между перекрывающимися рестрикционными фрагментами генома вектора, как показано на фиг. 4. Согласно данной стратегии гомологичная рекомбинация происходит в области размером 2,7 т. п. о., представляющей собой перекрытие между фрагментом рестрикции Pad-Pad размером 6,7 т. п. о. в pAdApt26.ApoAI.RSVF-2A-GLuc (фиг. 4, верхняя часть) и фрагментом рестрикции PsiI-PacI размером 28 т. п. о. в pAd26.HVRPtr12.luc или pAd26.HVRPtr13.luc (фиг. 4, нижняя часть). Трансфекции выполняли в соответствии со стандартными процедурами с применением реагента для трансфекции липофектамина (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния). Отдельные выделенные бляшки, обусловленные двумя "спасенными" вирусами Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc, дополнительно размножали на клетках PER.C6, а затем очищали и титровали так, как описано в данном документе для векторов Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc в примере 4.

Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные новым аденовирусным вектором.

В примерах 6 и 7 описаны эксперименты, проведенные для оценки иммуногенности новых аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, полученных в соответствии с данным документом. В этих экспериментах новые векторы оценивали в отношении их способности индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы к кодируемому вектором (модельным) антигенам у мышей после внутримышечной иммунизации. Векторы тестировали с помощью двух разных антигенов: люциферазы светлячка (FLuc) и RSV-F_{A2}-2A-GLuc (RSVF-2A-GLuc). RSVF-2A-GLuc представляет собой химерный белок, состоящий из фузогенного гликопротеина респираторно-синцитиального вируса штамма A2, пептида 2A вируса ящура и люциферазы Gaussia (GLuc). Каждый вектор сравнивали параллельно с эталонным вектором на основе аденовируса человека типа 26 (HAdV-26, также называемого в данном документе Ad26), несущем ту же самую кодирующую антиген трансгенную кассету. Иммунные ответы на соответствующие антигены измеряли с помощью хорошо известных иммунологических анализов, таких как иммуноферментный спот-анализ (ELISPOT), иммуноферментный анализ (ELISA) и, в случае антигена RSVF-2A-GLuc, анализ нейтрализации респираторно-синцитиального вируса (VNA).

Пример 6. Клеточные иммунные ответы, индуцированные Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc.

Для оценки клеточной иммуногенности новых аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 мышей Balb/C иммунизировали внутримышечно посредством векторов Ad26.FLuc (положительный контроль), Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, экспрессирующих FLuc

(т.е. Ad26HVRPtr12.FLuc и Ad26HVRPtr13.FLuc) или посредством аденовектора, который не кодировал FLuc, т.е. пустого Ad26. Экспрессирующие FLuc векторы тестировали в количестве 10^9 и 10^{10} вирусных частиц (в.ч.) на мышь, а пустой вектор Ad26 вводили в количестве 10^{10} в.ч. Через две недели после иммунизации мышей умерщвляли и выделяли спленоциты (фиг. 5А). Клеточные иммунные ответы определяли анализом ELISPOT ex-vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток после стимуляции спленоцитов в течение ночи с помощью пула 15-мерных перекрывающихся пептидов FLuc (фиг. 5В). Из результатов было видно, что при иммунизации в более высоких дозах (10^{10}) клеточные иммунные ответы, индуцированные векторами Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, находились в том же диапазоне значений или превышали уровень ответа, наблюдаемый в случае Ad26.FLuc.

В целом, клеточные иммунные ответы, индуцированные экспрессирующим FLuc рекомбинантными аденовирусными векторами Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 по настоящему изобретению, четко указывали на сильную иммуногенность этих векторов у мышей.

Пример 7. Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc.

Иммуногенность новых аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 дополнительно оценивали с использованием RSV-Fa2-2A-GLuc (RSVF-2A-GLuc) в качестве кодируемого вектором (модельного) вакцинного антигена. Мышей Balb/C иммунизировали внутримышечно посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc (положительный контроль), Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc или Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc в трех различных концентрациях (в количестве каждого из них, составляющем 10^8 , 10^9 или 10^{10} в.ч. на мыш) или посредством Ad26.FLuc, Ad26HVRPtr12.FLuc или Ad26HVRPtr13.FLuc в количестве 10^{10} в.ч. на мыш). Через восемь недель после иммунизации мышей умерщвляли и собирали образцы крови и спленоциты (фиг. 6А). Оценивали различные иммунные параметры так, как описано ниже.

Проводили анализ нейтрализации вируса (VNA) для оценки способности Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc индуцировать выработку нейтрализующих респираторно-синцитиальный вирус антител. На фиг. 6В показаны титры VNA для респираторно-синцитиального вируса штамма A2 (RSV A2), измеренные для образцов сыворотки крови, собранных через восемь недель после иммунизации. Каждая точка обозначает одну мыш; столбцы обозначают среднее по группе, а пунктирная линия соответствует нижнему пределу количественного определения (LLOQ=6,88; средний конечный титр линейных образцов). Из результатов видно, что иммунизации дозой 10^{10} в.ч. Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc приводили к титрам нейтрализации RSV A2, схожим с титрами, которые определяли для эталонного вектора Ad26, кодирующего тот же антиген. Титры, индуцированные всеми тремя векторами, Ad26, Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, кодирующими RSVF-2A-GLuc, обнаруживали преимущественно при наиболее высокой дозе, использованной для иммунизации, составляющей 10^{10} в.ч. Как и ожидалось, не было обнаружено специфических к RSV A2 ответов на соответствующие аденовекторы, кодирующие люциферазу светлячка.

Индукцию клеточного иммунитета к кодируемому вектором антигену оценивали с помощью анализа ELISPOT, специфичного в отношении RSV-F_{A2}. С этой целью через восемь недель после иммунизации выделяли спленоциты от иммунизированных мышей и стимулировали их в течение ночи 15-мерными перекрывающимися пептидами, охватывающими белок RSV-F_{A2}, и клеточные иммунные ответы определяли с помощью анализа ELISPOT ex vivo, измеряя относительное количество секретирующих IFN- γ клеток. Из данных видно, что антигенспецифические клеточные иммунные ответы, вызванные новыми векторами Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, кодирующим RSVF-2A-GLuc, имели дозозависимый характер и для каждой дозы соответственно были выше и схожи по величине с ответами, индуцированными эталонным вектором Ad26.RSVF-2A-GLuc (фиг. 6С). Как и ожидалось, в результате измерений не было обнаружено специфических к RSVF-F_{A2} ответов среди спленоцитов мышей, иммунизированных аденовекторами, кодирующими люциферазу светлячка.

Способность экспрессирующих RSVF-2A-GLuc векторов вызывать выработку специфических к RSV-F_{A2} антител IgG оценивали с помощью ELISA. Сыворотку крови, собранную спустя 8 недель после иммунизации у мышей, иммунизированных Ad26 (положительный контроль), Ad26HVRPtr12, Ad26HVRPtr13, экспрессирующими трансген RSVF-2A-GLuc или люциферазу светлячка (контроль), тестировали посредством ELISA в отношении IgG к RSV-F_{A2}. В частности, с помощью данного анализа ELISA обнаруживали антитела IgG, способные связываться с рекомбинантным стабильным белком RSV-F RSV-F_{A2} в конформации "до слияния" (pre-RSV-F). Из результатов видно, что Ad26HVRPtr12.RSVF-2A-GLuc и Ad26HVRPtr13.RSVF-2A-GLuc дозозависимым образом вызывали выработку титров специфических к pre-RSV-F антител IgG, схожих с титрами, выработка которых была индуцирована посредством Ad26.RSVF-2A-GLuc (фиг. 6D). Как и ожидалось, титры антител, специфичных к RSV-F_{A2}, в сыворотке крови мышей, иммунизированных векторами, кодирующими только люциферазу светлячка, обнаружены не были. На графике изображены титры по результатам ELISA с IgG, рассчитанные как конечные показатели титра (\log_{10}). Каждая точка обозначает одну мыш; столбцы обозначают среднее по группе, а пунктирная линия означает нижний предел количественного определения

(LLOQ), рассчитанный как $\log_{10} 1,36$.

В целом, из данных видно, что новые аденовирусные векторы Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 индуцировали сильные клеточный и гуморальный иммунные ответы на кодируемые антигены, которые были схожи по величине или характеризовались более высоким уровнем, чем ответы, которые индуцировались эталонным вектором на основе HAdV-26. Эти иммунные ответы четко указывали на сильную иммуногенность аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 у мышей.

Пример 8. Оценка серологической перекрестной нейтрализации среди новых и существующих аденовирусных векторов.

Для обеспечения своей потенциальной применимости в качестве новых аденовирусных вакцинных векторов новые аденовирусные векторы Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, созданные в соответствии с настоящим документом, предпочтительно будут серологически отличаться от существующих аденовирусных векторов, которые в настоящее время уже находятся в разработке в качестве вакцинных векторов, таких как векторы на основе аденовируса человека серотипов HAdV-5 и HAdV-35. Поэтому проводили тесты перекрестной нейтрализации среди новых аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 и нескольких существующих векторов на основе HAdV-4, HAdV-5, HAdV-26 и HAdV-35. С этой целью антисыворотку мышей, каждая из которых была индуцирована в ответ на один из этих аденовирусных векторов, тестировали в отношении каждого из данных различных векторов в анализе нейтрализации аденовируса. Антисыворотку мышей, применяемую для этого анализа, собирали у мышей Balb/C через две или восемь недель после их иммунизации посредством 10^{10} векторных частиц на мышь. Анализ нейтрализации аденовируса проводили так, как описано ранее (Spangers et al., 2003. J. Clin. Microbiol. 41:5046-5052). Вкратце, начиная с разведения 1:16, сыворотку крови серийно разводили в 2 раза, затем предварительно смешивали с аденовирусными векторами, экспрессирующими люциферазу светлячка (FLuc), а затем инкубировали в течение ночи с клетками A549 (при множественности инфицирования, составляющей 500 вирусных частиц на клетку). Уровни активности люциферазы в лизатах инфицированных клеток, измеренные через 24 ч после инфицирования, представляли собой эффективность инфицирования вектором. Титры нейтрализации к данному вектору определяли как наибольшее разведение сыворотки, способное понижать эффективность инфицирования вектором на 90%. Титры нейтрализации условно разделяли на следующие категории: <16 (нейтрализация отсутствовала), 16-200, 200-2000 и >2000.

Результаты демонстрировали отсутствие или наличие очень низкого уровня перекрестной нейтрализации среди протестированных векторов (фиг. 7). Незначительную перекрестную нейтрализацию наблюдали у Ad26HVRPtr12 с векторами Ad26 и Ad26HVRPtr13 и у Ad26HVRPtr13 с векторами Ad26 и Ad26HVRPtr12. Титры реципрокной перекрестной нейтрализации, наблюдаемые для этих векторов, были значительно ниже, чем соответствующие титры гомологичной нейтрализации, полученные для этих же векторов. Важно отметить, что новые векторы Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 не демонстрировали перекрестной нейтрализации с векторами на основе аденовируса человека, включенными в тестируемую панель, т.е. Ad35, Ad5 и Ad4, за исключением Ad26, у которого перекрестную нейтрализацию наблюдали на очень низком уровне. Следовательно, каждый из новых аденовирусных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 потенциально можно применять в сочетании с одним или несколькими из этих или других отдельных аденовирусных векторов при последовательных иммунизациях, например, в контексте режима гетерологичной "прайм-буст" вакцинации или, альтернативно или дополнительно, в контексте серии двух или более последовательных режимов вакцинации против различных заболеваний или антигенов.

Пример 9. Серопревалентность новых аденовирусных векторов в популяциях людей.

Важным для их потенциального применения в качестве эффективных вакцинных векторов является то, что описанные в данном документе новые аденовирусные векторы не сдерживаются высокими уровнями предсуществующего противовекторного гуморального иммунитета в целевых для вакцины популяциях. По этой причине каждый из векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 оценивали на его серопревалентность в образцах сыворотки крови, полученных от группы из 200 взрослых человек в возрасте от 18 до 55 лет, проживающих в Соединенных Штатах (США) и Европейском союзе (ЕС). Векторы тестировали в отношении нейтрализации образцами сыворотки крови человека, проводя стандартный анализ нейтрализации аденовируса, который проводили в примере 7 и который был описан ранее (Spangers et al., 2003. J. Clin. Microbiol. 41:5046-5052). Вкратце, начиная с разведения 1:16, сыворотку крови серийно разводили в 2 раза, затем предварительно смешивали с аденовирусными векторами, экспрессирующими люциферазу светлячка (FLuc), а затем инкубировали в течение ночи с клетками A549 (при множественности инфицирования, составляющей 500 вирусных частиц на клетку). Уровни активности люциферазы в лизатах инфицированных клеток, измеренные через 24 ч после инфицирования, представляли собой эффективность инфицирования вектором. Титры нейтрализации к данному вектору определяли как наибольшее разведение сыворотки, способное понижать эффективность инфицирования вектором на 90%. Титры нейтрализации условно разделяли на следующие категории: <16 (нейтрализация отсутствовала), 16-300, 300-1000, 1000-4000 и >4000.

Из результатов видно, что аденовирусные векторы Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 характеризо-

вался значительно меньшей серопревалентностью у исследованных субъектов-людей, чем контрольный вектор Ad5, и схожей с эталонным вектором Ad26 серопревалентностью у этих субъектов (фиг. 8). Более того, положительные титры нейтрализации, которые наблюдали в отношении новых векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13, были, в целом, довольно низкими, в основном не выше 300. Напротив, большинство обнаруженных положительных титров нейтрализации как в отношении Ad26, так и в отношении Ad5 превышали 300.

В целом, приведенные выше данные указывали на то, что предсуществующий гуморальный противовекторный иммунитет к векторам Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 можно считать низким в оцененных целевых для вакцины популяциях, что позволяло предположить, что эти векторы потенциально могут являться эффективными вакцинными векторами в этих популяциях.

Пример 10. Продуктивность аденовирусного вектора в суспензии клеток PER.C6.

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

В качестве первоначальной оценки того, будут ли описанные в данном документе новые векторы подходить для способов производства на основе клеток SPER.C6, проводили мелкомасштабные эксперименты по изучению продуктивности вектора на клетках SPER.C6, культивируемых в шейкерных колбах. Такие эксперименты по изучению продуктивности проводили с помощью кодирующих Fluc версий новых химерных векторов Ad26HVRPtr12 и Ad26HVRPtr13 (описанных в примере 4). В качестве эталонного контроля использовали вектор Ad26.Fluc на основе HAdV-26. Суспензию культур клеток PER.C6, высеванных в шейкерные колбы с плотностью 1×10^6 клеток/мл в общем объеме 10 мл среды PERMEXCIS® (доступной от Lonza) с добавлением 4 мМ L-глутамин (Lonza), инфицировали различными векторами с различными отношениями вирусных частиц (в.ч.) на клетку, а затем инкубировали в течение 4 дней. Различные отношения в.ч. на клетку, применяемые для инфицирования, составляли 70, 150 и 900. Каждый день собирали образцы инфицированных культур клеток и определяли титры в.ч. в этих образцах с помощью протокола на основе количественной ПЦР (qPCR), который предусматривал использование праймеров и зонда, специфичных к промотору CMV (который присутствовал во всех протестированных векторах). Этот протокол предусматривал обработку ДНКазой тестируемых образцов перед проведением qPCR для удаления любой свободной векторной ДНК (т.е. векторных геномов, которые не были упакованы в вирусные частицы).

Результаты в отношении продуктивности, полученные для химерных векторов Ad26HVRPtr12.Fluc и Ad26HVRPtr13.Fluc, показаны на фиг. 9. Два химерных вектора обеспечивали титры в.ч., которые являлись эквивалентными титрам, полученным для родительского эталонного вектора Ad26.Fluc. Эти результаты демонстрировали хорошую продуктивность для каждого из новых химерных векторов в модели бессывороточной суспензионной культуры на основе SPER.C6.

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

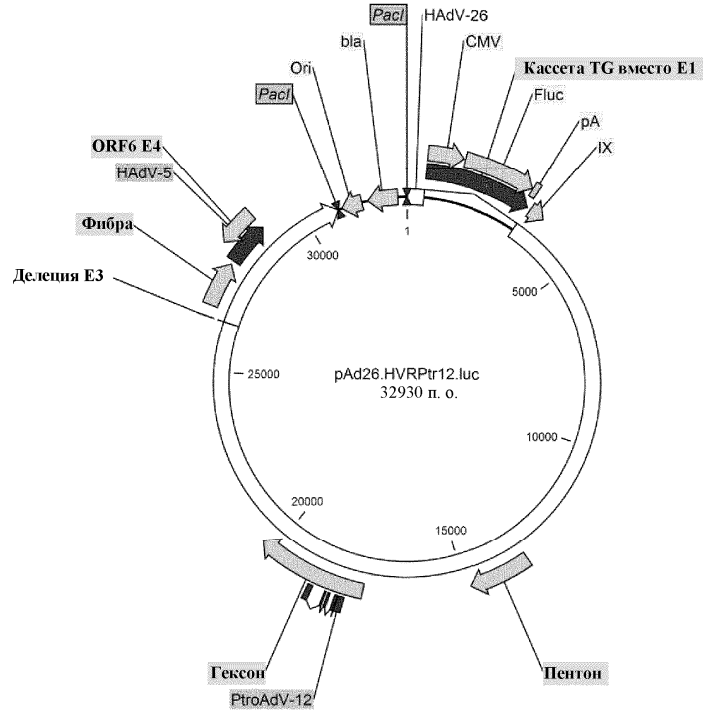
1. Аденовирусный вектор HAdV-26, включающий:
 - а) делецию E1 и E3;
 - б) замену на E4orf6 аденовируса-5 человека (HAdV-5);
 - в) последовательность, кодирующую гипервариабельную область гексона, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, или гексон, состоящий из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
2. Аденовирусный вектор по п.1, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.
3. Аденовирусный вектор по любому из пп.1, 2, где аденовирусный вектор дополнительно содержит по меньшей мере один трансген.
4. Аденовирусный вектор по любому из пп.1-3, где трансген расположен в области делеции E1, в области делеции E3 и/или на участке, прилегающем к правому инвертированному концевому повтору (rITR).
5. Рекомбинантная клетка, содержащая аденовирусный вектор по любому из пп.1-4.
6. Способ получения аденовирусного вектора, включающий:
 - (а) выращивание рекомбинантной клетки по п.5 в условиях, обеспечивающих продуцирование аденовирусного вектора; и
 - (б) выделение аденовирусного вектора из рекомбинантной клетки.
7. Иммуногенная композиция, содержащая аденовирусный вектор по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.
8. Способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по п.7.
9. Способ получения иммуногенной композиции, включающий комбинирование аденовирусного вектора по любому из пп.1-4 с фармацевтически приемлемым носителем.



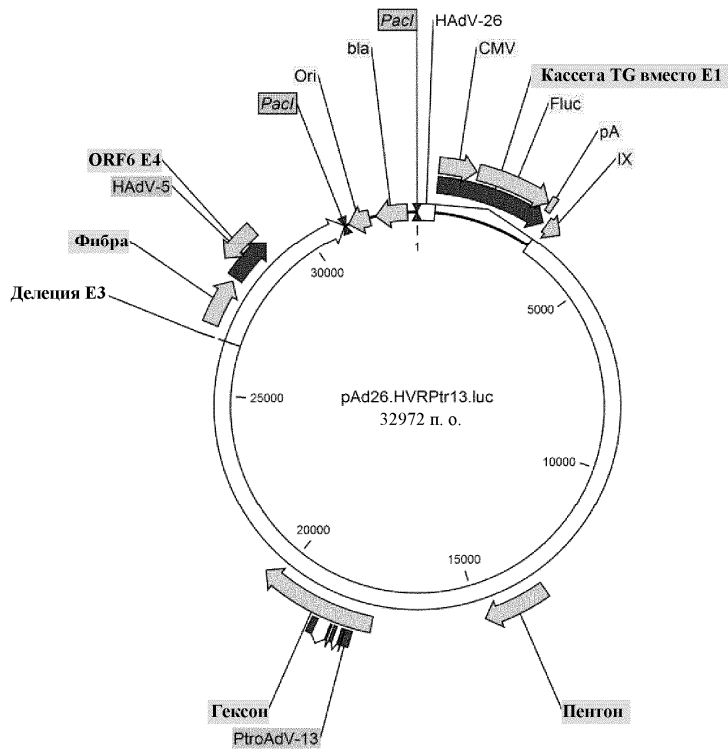
Фиг. 1А

HAdV-26	TYFDIRGVLDLRGSPFKPYSGTAYNSLAPKGA	PSQWETKEKQSTTGGVQKQKDVTKTEGVAATGGINLTNQGLLGGTQETAENSKKQIYAQKTFQPE	98
ProAdV-1 A .. A ..	ETSTDA .. TT HS L MK D SD QI A SGCE P ..	LY .. 90
ProAdV-12	QNETN .. NK .. H M MK EA QKN QI A DQD P ..	87
ProAdV-13 S ..	QARKGN TME .. H Y PM E KD QI A DGN P ..	91
HAdV-26	POVGEENWQENEAF .. YGGRALKKDKTKMKPCYGSFARPTNEKGGQAKFKPVNEGEQPKDLDIDFAYFDVPPGSP	PPAGGSGEEYKADITTYTENVNLE	193
ProAdV-1 S ..	TDTGTYNEK .. V .. S .. K .. N .. Q A T T TVEY V MNP .. RDA AN .. FTPEVV .. A .. D ..	179
ProAdV-12 D ..	IDKAD .. K .. V .. TTRTKAD .. TTEP .. MNP PT .. TI .. N .. TP VV .. A .. Q ..	170
ProAdV-13 T ..	S .. N .. Y .. L VGDD VPT EF .. F Y TV .. NGQD .. VM .. AY ..	183
HAdV-26	TPDTHVYKPGTSDNSSEINLVQOSMPNRPNYIGFRDNFVGLMYNSTGNMGVLAGQASQLNAVVDLQDRNTELSYQLL	LDSLGDRTYFSMWNVAVD	291
ProAdV-1 I ..	V HV G A ..	Q .. 277
ProAdV-12 I ..	A D V A A ..	Q .. 268
ProAdV-13	KE A ..	Q .. 281
HAdV-26	SYOPDVR I IENHGVDELPNYCFPLNGTGTASTYGGVKT .. TNGNQGAESEWEKDDATSRONGTCKGHVYAMEINLQANLWKSFLYSNVALYLPDSY	387	
ProAdV-1 I ..	DAV I TK I TO QI TI TSV TA E G I NI .. I .. RN .. A ..	369
ProAdV-12	D V TA VKT I ETVYEF G DI .. I .. RN .. A ..	361
ProAdV-13	D S AA VK E DI N TVAAR I .. R ..	377

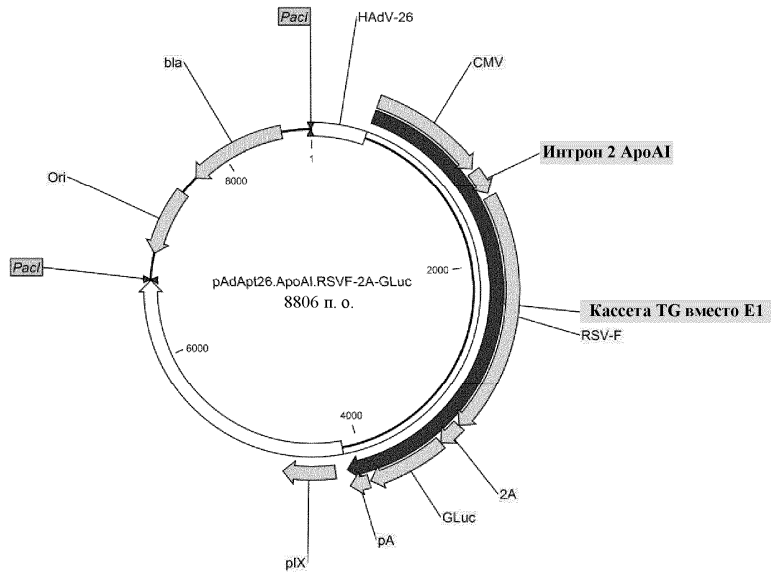
Фиг. 1В



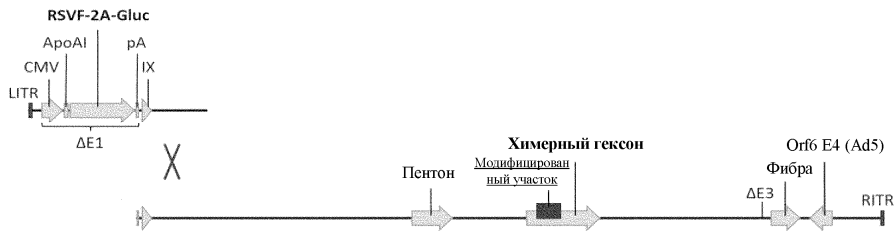
Фиг. 2А



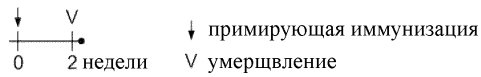
Фиг. 2В



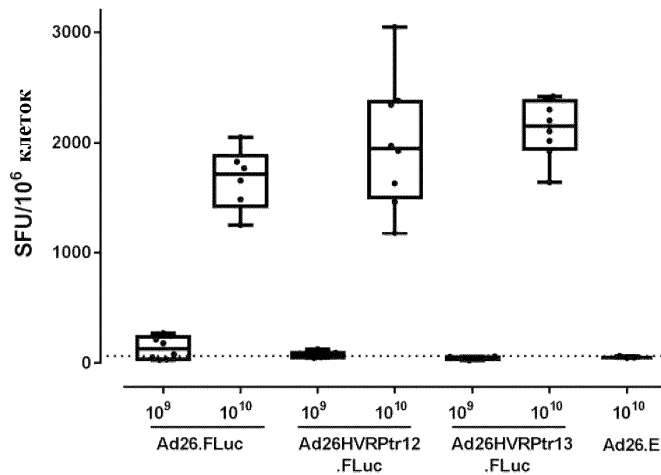
Фиг. 3



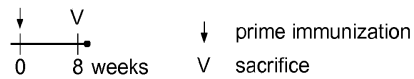
Фиг. 4



Фиг. 5А

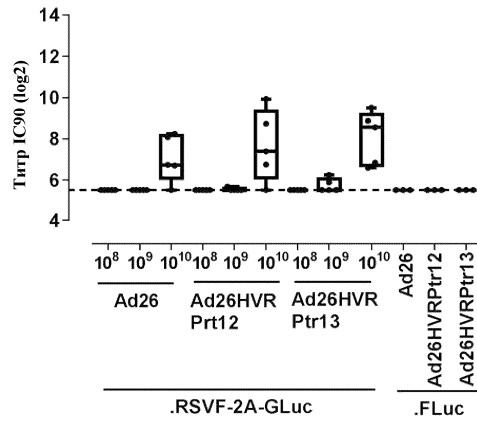


Фиг. 5В



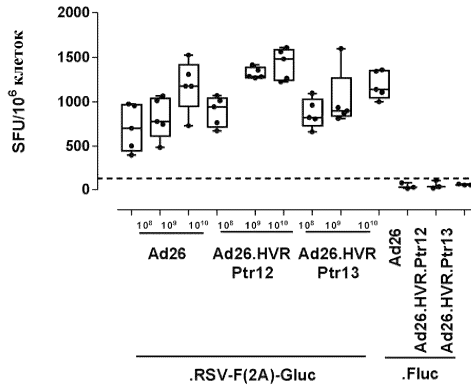
Фиг. 6А

VNA RSV A2



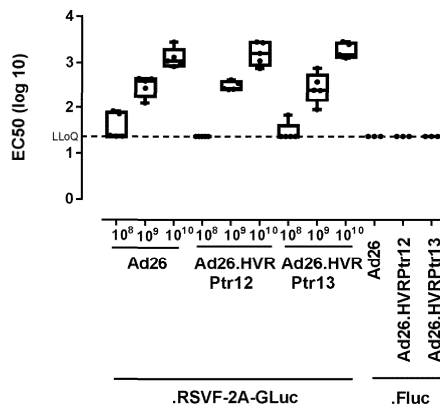
Фиг. 6B

RSV-F_{A2}-специфический ответ



Фиг. 6C

Титры pre-RSV-F-специфических антител IgG



Фиг. 6D

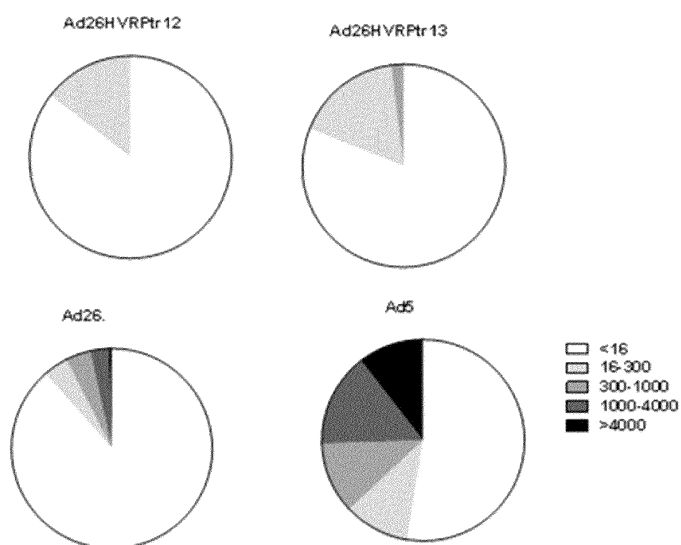
		Аденовирусные векторы					
		Ad35 (B)	Ad26 (D)	Ad5 (C)	Ad4 (E)	Ad26HVR Ptr12 (D)	Ad26HVR Ptr13 (D)
Образцы сыворотки крови*	Ad35 (B)	13384	<16	<16	<16	<16	<16
	Ad26 (D)	<16	2786	<16	<16	39,8	31,6
	Ad5 (C)	<16	<16	6007	<16	<16	<16
	Ad4 (E)	<16	<16	<16	1914	<16	<16
	Ad26HVRPtr12(D)	<16	31,6	<16	<16	501,2	79,4
	Ad26HVRPtr13(D)	<16	25,1	<16	<16	50,1	794,3

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

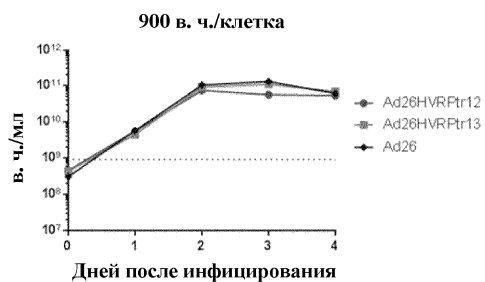
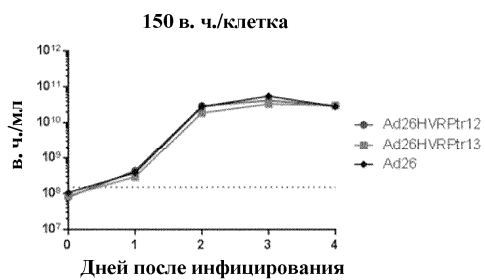
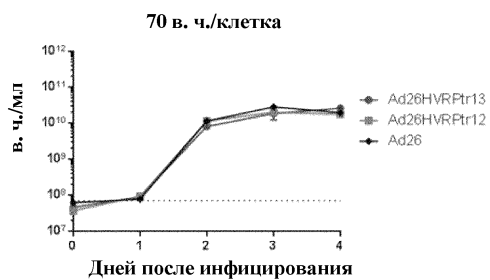
Значения

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

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

