

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047117**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.03

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

(21) Номер заявки
202291026

(22) Дата подачи заявки
2020.10.02

(54) **АДЕНОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/909,853**

(32) **2019.10.03**

(33) **US**

(43) **2022.07.13**

(86) **PCT/IB2020/059289**

(87) **WO 2021/064688 2021.04.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В.; БАТАВИА
БАЙОСАЙЕНСЕЗ Б.В. (NL); ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ КОРТ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ЭДИНБУРГ
(GB); НИКЛАС АРНБЕРГ КОНСУЛТ
АБ (SE)**

(56) **WO-A1-2017174753**

ADRIANA E. KAJON ET AL.: "Identification of a novel intertypic recombinant species D human adenovirus in a pediatric stem cell transplant recipient", JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, vol. 61, no. 4, 1 December 2014 (2014-12-01), pages 496-502, XP55761405, NL, ISSN: 1386-6532, DOI:10.1016/j.jcv.2014.09.009, the whole document

GLEN R. NEMEROW ET AL.: "Structure of human adenovirus", CURRENT OPINION IN VIROLOGY, vol. 2, no. 2, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 115-121, XP55761410, United Kingdom, ISSN: 1879-6257, DOI:10.1016/j.coviro.2011.12.008, the whole document

(72) Изобретатель:
**Кюстерс Йером Хюбертина Хенрикус
Виктор, Хавенга Мензо Янс Эмко,
Баллманн Моника, Лемкерт Ангелик
Алида Корина (NL), Бэйкер Эндрю
(GB), Ариберг Никлас (SE), Кайан
Дьозо (HU)**

(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)**

(57) Изобретение относится к химерным аденовирусным векторам. Представленные химерные аденовирусные векторы можно использовать для индукции защитного иммунного ответа и/или экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта.

B1

047117

**047117
B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США 62/909853, поданной 3 октября 2019 г., содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биотехнологии. Более конкретно, к области и применению аденовирусных векторов, таких как дефектные по репликации аденовирусные векторы, для доставки антигенов и вызова иммунного ответа у хозяев.

Ссылка на список последовательностей, поданный в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, представляющий собой поданный в электронной форме через EFS-Web список последовательностей в формате ASCII с наименованием файла "004852.120WO1 Sequence Listing" и датой создания 13 августа 2020 г., и имеющий размер 262 Кб. Список последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью заявки, и его полное содержание включено в настоящее описание посредством ссылки.

Уровень техники для изобретения

Рекомбинантные аденовирусные векторы широко используют для генотерапевтических применений и вакцин. Показано, что вакцины на основе вектора AdV-5 вызывают сильные и защитные иммунные ответы во множестве моделей на животных (см., например, WO2001/02607; WO2002/22080; Shiver et al., Nature 415:331 (2002); Letvin et al., Ann. Rev. Immunol. 20:73 (2002); Shiver and Emini, Ann. Rev. Med. 55:355 (2004)). Однако, полезность вакцин на основе рекомбинантного вектора AdV-5, вероятно, может быть ограничена высокой серораспространенностью специфических для AdV-5 нейтрализующих антител (NAb) в человеческих популяциях. Показано, что существование иммунитета против AdV-5 значительно супрессирует иммуногенность вакцин на основе AdV-5 в исследованиях у мышей, макаков-резус и человека.

Один многообещающий способ преодоления наличия предсуществующего иммунитета у индивидуумов, ранее подвергавшихся инфекции или лечению наиболее распространенным человеческим аденовирусом, например, AdV-5, включает разработку рекомбинантных векторов из серотипов аденовируса, которые не встречались в таком предсуществующем иммунитете. Один такой способ основан на использовании химерных аденовирусов, содержащих замену природных последовательностей капсидных белков (например, последовательностей капсидных белков гексона и/или фибера) на последовательности капсидных белков (например, последовательности капсидных белков гексона и/или фибера) из аденовирусов с низкой (или отсутствующей) серораспространенностью.

Таким образом, в данной области существует необходимость альтернативных аденовирусных векторов, которые можно получать в больших количествах, которые не встречались в предсуществующем иммунитете у хозяина, но которые все еще являются иммуногенными и способными индуцировать сильный иммунный ответ против антигенов, кодируемых гетерологичными нуклеиновыми кислотами, вставленными в вектор.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное. Химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное может, например, содержать полипептид фибера, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере с 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:11, полипептид гексон, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:12, и полипептид пентон, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:13. В конкретных вариантах осуществления, последовательность полипептида фибера содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11. В конкретных вариантах осуществления, последовательность полипептида гексона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:12. В конкретных вариантах осуществления, полипептид пентон содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:13.

Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, вектор представляет собой аденовирусный вектор.

В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E1. В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E3. В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей аденовирусной нуклеиновой кислоты из по меньшей мере одного из человеческого аденовируса-4, человеческого аденовируса-5, человеческого аденовируса-26 или человеческого аденовируса-35. Аденовирусный вектор может, например, содержатьorf6 E4 человеческого аденовируса-5 (HAdV-5). В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор может, например, содержать последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор дополнительно содержит по меньшей мере один трансген. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере один трансген локализован в делеции E1, в делеции E3, и/или по соседству с правым инвертированным концевым повтором (ITR).

Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным клеткам, содержащим аденовирусные векторы, описанные в настоящем описании. Настоящее изобретение относится также к способам получения аденовирусных векторов. Способы включают: (а) выращивание рекомбинантных клеток, описанных в настоящем описании, в условиях для продукции аденовирусного вектора; и (b) выделение аденовирусного вектора из рекомбинантных клеток.

Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, содержащим аденовирусные векторы, описанные в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение субъекту фармацевтических композиций, описанных в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится также к способам получения фармацевтических композиций, включающим комбинирование аденовирусных векторов, описанных в настоящем описании, с фармацевтически приемлемым носителем.

Настоящее изобретение относится также к способам экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают: (а) идентификацию субъекта, нуждающегося в экспрессированном трансгене; (b) приведение субъекта в контакт с аденовирусным вектором, содержащим трансген, описанный в настоящем описании; и (с) экспрессию трансгена у субъекта. В конкретных вариантах осуществления, экспрессия трансгена у нуждающегося в этом субъекта лечит или предотвращает заболевание или нарушение. В конкретных вариантах осуществления, приведение субъекта в контакт с вектором может, например, включать выделение клетки от субъекта и приведение клетки в контакт с вектором. Субъект может, например, представлять собой субъекта-человека.

Краткое описание чертежей

Приведенное выше описание, так же как следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, можно лучше понять при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, однако, что изобретение не является ограниченным точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1 показана полная карта генома вируса Ad20-42-42 дикого типа (SEQ ID NO:1).

На фиг. 2 показана схема конструирования генома аденовирусного вектора.

На фиг. 3 показана схема участка множественного клонирования (MCS) в адаптерной плазмиде.

На фиг. 4 показана схема адаптерной плазмиды: pAdApt20-42-42.Empty.

На фиг. 5 показана схема промежуточной плазмиды: pBR.Ad20-42-42.SbfI final interm.

На фиг. 6 показана схема плазмиды правого конца: pBrAd20-42-42 Srfl-ITR.dE3.5orf6.

На фиг. 7A, 7B показаны клеточные иммунные ответы, индуцированные посредством Ad20-42-42.FLuc. На фиг. 7A показана схема способа иммунизации. На фиг. 7B показан график, показывающий клеточные иммунные ответы, индуцированные посредством Ad20-42-42.FLuc.

На фиг. 8 показано, что не наблюдали значительной перекрестной нейтрализации между векторами Ad20-42-42 и Ad26.

На фиг. 9 показан график, показывающий результаты для серораспространенности различных аденовирусных конструкций у субъектов-людей.

На фиг. 10 показан график, показывающий потенциал трансдукции для векторов Ad20-42-42, HAd5 и HAd35. Экспрессия люциферазы представлена как относительные световые единицы (RLU) на миллиграмм (мг) белка.

На фиг. 11 показано репрезентативное окрашивание LacZ для клеток, трансдуцированных с использованием Ad5LacZ и Ad20-42-42LacZ. Трансдукцию проводили с использованием трех доз вектора: 10000; 5000 и 1000 вирусных частиц (ВЧ) на клетку с добавлением FX.

На фиг. 12A, 12B показаны графики, показывающие трансдукцию с использованием HAdV5 и Ad20-42-42 клеток CHO экспрессирующих или лишенных CAR или сиаловой кислоты, и клеток TC1, экспрессирующих или лишенных десмоглеина 2 (DSG2).

На фиг. 12C-12D показаны графики, показывающие трансдукцию с использованием HAdV5 и Ad20-42-42 клеток CHO лишенных (отрицательных) или экспрессирующих различные изоформы (BC1, BC2, C1, C2) CD46.

На фиг. 13 показано распределение *in vivo* кодирующих люциферазу HAdV5 и Ad20-42-42 у мышей. Мышей подвергали предварительной обработке в присутствии (CL-; верхняя и нижняя правая панель) или в отсутствие (CL+; верхняя и нижняя левая панель) обработки клондронатом и инъецировали внутривенно каждый вектор. Контрольным животным инъецировали фосфатно-солевой буфер (PBS). Экспрессия люциферазы простирается от низкой до высокой.

На фиг. 14A-D показана количественная оценка AdV векторов (HAdV-5 и Ad20-42-42 соответственно). Показаны количества копий ДНК после внутривенной трансдукции мышей, в отсутствие (CL-; фиг. 14A и 14C) или в присутствии (CL+; фиг. 14B и 14D) клондроната. Геномы вектора количественно оценивали посредством q-ПЦР.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на выделении химерных аденовирусных векторов, содержащих химерный капсидный полипептид или его функциональное производное, где химерный капсидный полипептид содержит полипептид фибер и гексон из первого аденовируса (например, человеческого аденовируса-42) и полипептид пентон из второго аденовируса (например, человеческого аденовируса-20). Аденовирусные векторы являются способными вызывать иммунный ответ, в то же время сохраняя низкую серораспространенность. Аденовирусные векторы можно составлять для вакцин и использовать для индукции защитного иммунитета против специфических представляющих интерес антигенов. Аденовирусные векторы можно также конструировать для экспрессии представляющего интерес трансгена у нуждающегося в этом субъекта.

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе уровень техники и на протяжении описания; полное содержание каждой из этих ссылок включено в настоящее описание посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое включено в настоящее описание, приведено с целью предоставления контекста по изобретению. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все из этих объектов составляют часть предшествующего уровня техники, применительно к любым описанным или заявленным изобретениям.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В ином случае, конкретные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, как указано в описании.

Следует отметить, что, как используют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем описании, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает 0,9 мг/мл - 1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентраций 1% - 10% мас./об. включает 0,9% мас./об. - 11% мас./об.. В рамках изобретения, использование числового диапазона явно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если контекст явно не указывает на иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий сериям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в сериях. Специалисту в данной области известно, или он является способным определить с использованием не более, чем общепринятых экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения в изобретение.

В рамках изобретения, термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", или любые другие их варианты, понимают как подразумевающие включение указанного целого или группы целых, но не как исключение любого другого целого или группы целых, и они предназначены, чтобы является неисключительными или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые включают список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или не присущие таким композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано обратное, "или" относится к включительному или, а не к исключительному или. Например, условие А или В удовлетворено посредством любого из следующего: А является истинным (или присутствует) и В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует) и В является истинным (или присутствует), и А и В оба являются истинными (или присутствуют).

В рамках изобретения, соединительный термин "и/или" между множеством перечисленных элементов понимают как включающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены посредством "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента в отсутствие второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента в отсутствие первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как включенный в значение, и таким образом, удовлетворяющий требованию термина "и/или", в рамках изобретения. Одновременную применимость более одного из вариантов также понимают как включенную в значение, и таким образом, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

В рамках изобретения, термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, однако на то, что никакие дополнительные целое или группа целых не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В рамках изобретения, термин "в основном "состоит из" или варианты, такие как "в основном

состоят из" или "в основном состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, и необязательное включение любого из указанного целого или группы целых, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции; см. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В рамках изобретения, "субъект" обозначает любое животное, предпочтительно, млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", в рамках изобретения, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно, человека.

Следует также понимать, что термины "приблизительно", "около", "как правило", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящем описании, применительно к измерению или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанное измерение/характеристика не являются точной границей или параметром, и не исключают незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или сходными, как понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, включают отклонения, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округления, ошибок измерения или других систематических ошибок, технологических допусков и т.д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, полипептидов гексона и фибера и кодирующих их полинуклеотидов), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или посредством визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности(последовательностей), относительно эталонной последовательности, на основании назначенных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), посредством компьютеризированных воплощений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или посредством визуальной проверки (см., в общем, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместный проект между Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP), посредством идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T обозначает пороговую оценку сходства соседних слов (Altschul et al., выше). Эти исходные попадания в соседнее слово действуют в качестве затравок для инициации поисков с целью найти более длинные HSP, содержащие их. Попадания в слова затем расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться.

Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (показатель вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей, оценочную матрицу используют для расчета кумулятивного показателя. Расширение попадания в слова в каждом направлении прекращают, когда: кумулятивный показатель выравнивания уменьшается на значение X от его максимально достигнутого значения; кумулятивный показатель стремится к нулю или ниже, из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или

достигнут конец какой-либо из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, M=5, N=4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова (W) 3 и ожидание (E) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним из измерений сходства, предоставленных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей (P(N)), которая указывает на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может происходить случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей 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 указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реакционной способностью по отношению к антителам, образованным против полипептида, закодированного второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях.

В рамках изобретения, термин "полинуклеотид", синонимично обозначенный как "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", обозначает любой полирибонуклеотид или полидезоксирибонуклеотид, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничения, одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, представляющую собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечную РНК, и РНК, представляющую собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут являться одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотид" относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, или обе РНК и ДНК. Термин полинуклеотид также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или с другой целью. "Модифицированные" основания включают, например, триптированные основания и необычные основания, такие как инозин. Множество модификаций может быть внесено в ДНК и РНК; таким образом, "полинуклеотид" охватывает химически, ферментно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, как обычно обнаружено в природе, так же как химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. "Полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто обозначаемые как олигонуклеотиды.

В рамках изобретения, термин "вектор" представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой фрагмент нуклеиновой кислоты, так чтобы вызвать репликацию или экспрессию этого фрагмента.

В рамках изобретения, термин "клетка-хозяин" относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. "Клетка-хозяин" может представлять собой любой тип клетки, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из линии клеток. В одном варианте осуществления, "клетка-хозяин" представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления, "клетка-хозяин" представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может являться или может не являться идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или влияний внешней среды, которые могут возникать в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин "экспрессия", в рамках изобретения, относится к биосинтезу продукта гена. Термин включает транскрипцию гена в РНК. Термин включает также трансляцию РНК в один или несколько полипептидов, и кроме того, включает все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированный полипептид может находиться внутри цитоплазмы клетки-хозяина, во внеклеточном окружении, таком как среда для роста культуры клеток или являться заякоренным в клеточной мембране.

В рамках изобретения, термины "пептид", "полипептид" или "белок" могут обозначать молекулу, состоящую из аминокислот, и могут быть известны в качестве белка специалисту в данной области. Общепринятый однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков используют в настоящем описании. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" могут быть использованы

взаимозаменяемо в настоящем описании для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может являться линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также включают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или посредством вмешательства; например, посредством образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования, или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с метящим компонентом. Также включены в определение, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), так же как другие модификации, известные в данной области.

Пептидные последовательности, описанные в настоящем описании, записаны в соответствии с обычным соглашением, согласно которому N-концевая область пептида находится слева, и C-концевая область находится справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена L-форма аминокислоты, если явно не указано иное.

В рамках изобретения, термин "защитный иммунитет" или "защитный иммунный ответ" означает, что вакцинированный субъект является способным контролировать инфекцию патогенным агентом, против которого проведена вакцинация. Патогенный агент может, например, представлять собой антигенный продукт гена или антигенный белок, или его фрагмент. Обычно, у субъекта, имеющего развитый "защитный иммунный ответ", развиваются клинические симптомы только от мягких до умеренных, или вообще не развиваются симптомы. Обычно, субъект, имеющий "защитный иммунный ответ" или "защитный иммунитет" против конкретного агента, не умирает в результате инфекции указанным агентом.

Термин "адъювант" определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В этом контексте, адъювант используют для усиления иммунного ответа на аденовирусные векторы по изобретению.

В рамках изобретения, термин "антигенный продукт гена или его фрагмент" или "антигенный белок" может включать белок бактерий, вирусов, паразитов или грибов, или его фрагмент. Предпочтительно, антигенный белок или антигенный продукт гена является способным вызывать защитный иммунный ответ у хозяина, например, индукцию иммунного ответа против заболевания или инфекции (например, бактериальных, вирусных, паразитарных или грибковых заболевания или инфекции), и/или вызывать у субъекта иммунитет (т.е. вакцинацию) против заболевания или инфекции, который защищает субъекта против заболевания или инфекции.

В рамках изобретения, термин "химерный" обозначает ген, нуклеиновую кислоту, белок, пептид или полипептид, содержащий два или более генов, нуклеиновых кислот, белков, пептидов или полипептидов, в норме не ассоциированных вместе. "Химерный" ген, нуклеиновая кислота или белок могут являться слитыми между двумя или более неродственными последовательностями (например, двумя или более отдельными нуклеиновыми кислотами, кодирующими два или более отдельных белка). "Химерный" ген, нуклеиновая кислота, или белок могут являться слитыми между двумя или более родственными последовательностями (например, нуклеиновые кислоты кодируют одинаковый белок, однако, нуклеиновые кислоты происходят из различного материала источника, т.е. одна нуклеиновая кислота происходит из одного человеческого аденовируса, и другая нуклеиновая кислота происходит из второго неродственного человеческого аденовируса).

Аденовирусные векторы.

Воздействие определенных аденовирусов приводило к иммунным ответам против определенных аденовирусных серотипов, которые могут влиять на эффективность аденовирусных векторов. Поскольку инфекции человеческими аденовирусами являются распространенными у человека, распространенность нейтрализующих антител против человеческих аденовирусов в человеческих популяциях является высокой. Можно ожидать, что присутствие таких нейтрализующих антител у индивидуумов уменьшает эффективность вектора для переноса генов на основе человеческого аденовирусного остова. Одним способом преодоления уменьшения эффективности является замена эпитопов на аденовирусных капсидных белках, которые являются мишенями для нейтрализующих антител. Последовательности-мишени на капсидных белках можно заменять на белковые последовательности из других аденовирусов (например, химерные аденовирусы из множества человеческих аденовирусов), которые имеют низкую распространенность и, таким образом, нейтрализующие антитела, против которых являются редкими в человеческих популяциях.

"Капсидный белок" обозначает белок на капсиде аденовируса (например, AD20 и/или AD42), или его функциональный фрагмент или производное, участвующий в определении серотипа и/или тропизма аденовируса. Капсидные белки, как правило, включают белки фибер, пентон и/или гексон. В конкретных вариантах осуществления, капсидный белок представляет собой целый или полноразмерный капсидный белок аденовируса. В других вариантах осуществления, капсидный белок представляет собой фрагмент или производное полноразмерного капсидного белка аденовируса. В конкретных вариантах осуществления, гексон, пентон и фибер, кодируемые аденовирусным вектором по изобретению, происходят из различного аденовирусного фона.

"Химерный аденовирусный капсид", в рамках изобретения, относится к капсиду из аденовирусного источника, который содержит полипептид фибер, пентон и/или гексон, где полипептид фибер, пентон, и/или гексон происходят из различных аденовирусных источников (например, полипептид фибер и гексон Ad42, и полипептид пентон Ad20).

"Полипептид гексон" относится к аденовирусным белкам оболочки гексонам, их функциональным фрагментам и производным.

"Полипептид фибер" относится к аденовирусным белкам фибера, их функциональным фрагментам и производным.

"Полипептид пентон" относится к аденовирусным белкам пентона, их функциональным фрагментам и производным.

Одной мишенью нейтрализующих антител против аденовирусов является главный белок оболочки, белок гексон. Замена белка гексона или переменных последовательностей в пределах белка гексона, которые определяют серотип и связываются с нейтрализующими антителами, на белок гексон или переменные последовательности в пределах белка гексона из аденовирусов, которые являются редкими в человеческой популяции, может позволять конструирование аденовирусных векторов, которые могут являться менее чувствительными к нейтрализации антителами, обычно обнаруживаемыми у человека.

Гипервариабельные области гексона (HVR) представляют собой области полипептида гексона, представляющие собой наивысшую вариабельность среди различных аденовирусных серотипов. Как правило, считают, что эти HVR соответствуют экспонированным для растворителя поверхностям тримера белка гексона (в контексте интактной вирусной частицы) и, вместе с этим, ожидают, что они являются важными детерминантами опосредованной антителами нейтрализации аденовируса (Roberts et al., *Nature* 441:239-43 (2006)). Замена HVR гексонов данного аденовирусного вектора на HVR гексонов аденовируса с низкой (или отсутствующей) серораспространенностью у человека, таким образом, представляет собой возможные способы для преодоления предсуществующего гуморального иммунитета против вектора в целевых человеческих популяциях. Следовательно, существовало множество исследований, изучающих концепцию химеризма гексона, по большей части включающей замены последовательности 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 против аденовирусов является белок фибера. Замена белка фибера на последовательности фибера из редких аденовирусов человеческого происхождения, более предпочтительно, замена переменных последовательностей в пределах белка фибера, может также позволять конструирование аденовирусных векторов, которые могут являться менее чувствительными к нейтрализации антителами, обычно обнаруживаемыми у человека. Комбинация замены фибера с заменами гексона, описанными выше, может придавать дополнительную устойчивость к нейтрализации антителами, обычно присутствующими в человеческих популяциях.

Третьей мишенью нейтрализующих антител против аденовирусов является белок пентона. Замена белка пентона на последовательности пентона из редких аденовирусов человеческого происхождения может также позволять конструирование аденовирусных векторов, которые могут являться менее чувствительными к нейтрализации антителами, обычно обнаруживаемыми у человека. Комбинация замен гексона, замен фибера и замен пентона, описанных выше, может придавать дополнительную устойчивость к нейтрализации антителами, обычно присутствующими в человеческих популяциях.

Настоящее изобретение относится к выделенным последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующей химерные аденовирусные капсиды или их функциональные производные. Химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное может, например, содержать полипептид фибера, полипептид гексона и полипептид пентона. Полипептид фибера и гексон могут, например, происходить из первого аденовируса (например, человеческого аденовируса-42), и полипептид пентон может, например, происходить из второго аденовируса (например, человеческого аденовируса-20).

"Функциональное производное" полипептида соответствующим образом обозначает модифицированный вариант полипептида, например, где одна или несколько аминокислот из полипептида могут быть делетированы, вставлены, модифицированы и/или замещены. Производное немодифицированного аденовирусного капсидного белка считают функциональным если, например, (a) аденовирус, содержащий производное капсидного белка в своем капсиде, сохраняет по существу такую же или более низкую серораспространенность, по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный капсидный белок; и/или, (b) аденовирус, содержащий производное капсидного белка в своем капсиде, сохраняет по существу такую же или более высокую инфекционность для клетки-хозяина, по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный капсидный белок; и/или (c) аденовирус, содержащий производное капсидного белка в своем капсиде, сохраняет по существу такую же или более высокую иммуногенность, по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный капсидный белок; и/или (d) аденовирус, содержащий производное капсидного

белка в своем капсиде, сохраняет по существу такой же или более высокий уровень продуктивности трансгена, по сравнению с аденовирусом, содержащим немодифицированный капсидный белок.

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

В предпочтительных вариантах осуществления, химерный аденовирусный капсид может, например, содержать полипептид фибера, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:11; полипептид гексона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:12; и полипептид пентона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:13. В конкретных вариантах осуществления, последовательность полипептида фибера содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11. В конкретных вариантах осуществления, последовательность полипептида гексона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:12. В конкретных вариантах осуществления, полипептид пентона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:13.

В предпочтительных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к векторам, предпочтительно, аденовирусным векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем описании. Аденовирусные векторы содержат выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное, где химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное содержит полипептид фибера, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:11, полипептид гексона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:12, и полипептид пентона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:13.

Как правило, аденовирусный вектор по изобретению содержит целый рекомбинантный аденовирусный геном, например, в плазмиде, космиде или бакуловирусном векторе. Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут находиться в форме РНК или в форме ДНК, полученной посредством клонирования или полученной синтетически. ДНК может являться двухцепочечной или одноцепочечной.

Специалисту в данной области известно, что элементы, происходящие из множества серотипов, можно комбинировать в одном аденовирусном векторе, например, человеческом или обезьяньем аденовирусе. Таким образом, можно получать химерный аденовирусный вектор, комбинирующий желательные свойства из различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, химерный аденовирусный вектор по изобретению может комбинировать отсутствие предсуществующего иммунитета для химерных последовательностей полипептида гексона и/или фибера с высоким уровнем доставки антигена и/или трансгена и способностью к представлению существующего аденовирусного вектора, такого как гAd4, гAd5, гAd26 или гAd35.

Преимущества аденовирусных векторов для использования в качестве вакцин и/или в качестве носителя для экспрессии трансгена могут включать, но без ограничения, простоту манипуляции, хорошую способность к крупномасштабному изготовлению, и отличные показатели безопасности на основании многих лет опыта в исследовании, разработке, изготовлении и клинических исследованиях для множества аденовирусных векторов, которые были опубликованы. Аденовирусные векторы, используемые в качестве вакцин, как правило, обеспечивают хороший иммунный ответ на кодируемый трансгеном белок или кодируемый трансгеном антигенный продукт гена, включая клеточный иммунный ответ. Аденовирусный вектор по настоящему изобретению может быть основан на любом типе аденовируса, и в конкретных вариантах осуществления, представляет собой человеческий аденовирус, который может принадлежать к любой группе или серотипу. В предпочтительных вариантах осуществления, рекомбинантный аденовирус основан на человеческом аденовирусе из группы А, В, С, D, Е, F или G. В других предпочтительных вариантах осуществления, рекомбинантный аденовирус основан на человеческом аденовирусе серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49 или 50. В других вариантах осуществления, он представляет собой обезьяньи аденовирус, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы, который может принадлежать к любому серотипу. В конкретных вариантах осуществления, 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, аденовирусный вектор шимпанзе из второй

композиции представляет собой ChAdV3. Рекомбинантный аденовирус серотипа 3 шимпанзе (ChAd3 или cAd3) представляет собой аденовирус подгруппы С со свойствами, сходными со свойствами человеческого аденовируса серотипа 5 (Ad5). Показано, что ChAd3 являлся безопасным и иммуногенным в исследованиях для человека, оценивающих вакцины-кандидаты для вируса гепатита С (HCV) (Barnes E., et al. 2012 *Science translational medicine* 4: 115ra1). Опубликовано, что вакцины на основе ChAd3 являлись способными индуцировать иммунный ответ, сравнимый с векторной вакциной на основе человеческого Ad5; 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; WO2011/0130627 и т.д.

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо известны в данной области и описаны, например, в патентах США No. 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913, и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M.S. Horwitz, "Adenoviruses", разделы 67 и 68, соответственно, in *Virology*, B.N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), и других ссылках, упомянутых в настоящем описании. Как правило, конструирование аденовирусных векторов включает использование стандартных способов молекулярной биологии, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), и других ссылках, упомянутых в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор содержит делецию E1 и/или делецию E3. Делеция E1 или E3 может, например, включать полную делецию гена или частичную делецию, которая делает продукт гена E1 или E3 функционально дефектным. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления, аденовирус является дефектным по репликации, например, поскольку он содержит делецию в области E1 генома. Как известно специалисту в данной области, в случае делеций необходимых областей из генома аденовируса, функции, кодируемые этими областями, необходимо предоставлять в транс-, предпочтительно, посредством клетки-продуцента, т.е. когда части или целые из областей E1, E2 и/или E4 делегированы из аденовируса, они должны присутствовать в клетке-продуценте, например, интегрированными в ее геном, или в форме так называемых аденовируса-помощника или плазмид-помощников. Аденовирус может также иметь делецию в области E3, которая является необязательной для репликации, и таким образом, нет необходимости комплементировать такую делецию. Одну или несколько из областей E1, E2, E3 и E4 можно инактивировать другими способами, например, посредством вставки представляющего интерес трансгена (обычно связанного с промотором) в области, подлежащие инактивации.

Клетка-продуцент (иногда также обозначаемая в данной области и в настоящем описании как "упаковывающая клетка" или "комплементирующая клетка"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент где желательный аденовирус можно размножить. Например, размножение рекомбинантных аденовирусных векторов осуществляют в клетках-продуцентах, комплементирующих дефекты аденовируса. Такие клетки-продуценты предпочтительно имеют в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса, и таким образом, являются способными комплементировать рекомбинантные аденовирусы с делецией в области E1. Можно использовать любую комплементирующую E1 клетку-продуцент, такую как клетки сетчатки человека, иммортализованные посредством E1, например, клетки 911 или PER.C6 (см. патент США 5994128), трансформированные посредством E1 амниоциты (см. патент EP 1230354), трансформированные посредством E1 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 конкретных вариантах осуществления, клетки-продуценты представляют собой, например, клетки HEK293 или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF, и т.п. Обзор продукции аденовирусных векторов в клетках-продуцентах приведен в (Kovesdi et al., 2010, *Viruses* 2: 1681-703).

В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей человеческой аденовирусной нуклеиновой кислоты. Человеческие аденовирусные нуклеиновые кислоты могут, например, быть выбраны из человеческого аденовируса-4 (Ad-4), человеческого аденовируса-5 (Ad-5), человеческого аденовируса-26 (Ad-26) или человеческого аденовируса-35 (Ad-35). В конкретных вариантах осуществления, дефектный по E1 аденовирусный вектор содержит кодирующую последовательность E4-orf6 аденовируса из Ad5 человека. Это позволяет размножение таких аденовирусов в хорошо известных комплементирующих линиях клеток, экспрессирующих гены E1 из Ad5, например, таких как 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, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

В конкретных вариантах осуществления, аденовирусный вектор содержит трансген. "Трансген" обозначает гетерологичную нуклеиновую кислоту, представляющую собой нуклеиновую кислоту, которая естественным образом не присутствует в векторе, и в соответствии с настоящим изобретением,

трансген может кодировать антигенный продукт гена или антигенный белок, который вызывает иммунный ответ у субъекта. Трансген может также кодировать терапевтический белок для лечения или предотвращения заболевания у нуждающегося в этом субъекта. Трансген можно, например, вводить в вектор посредством стандартных способов молекулярной биологии. Трансген можно, например, клонировать в делетированную область E1 или E3 аденовирусного вектора, или в область между областью E4 и гITR. Трансген, как правило, является функционально связанным с последовательностями для контроля экспрессии. В предпочтительных вариантах осуществления, трансген вставляют в участок вставки трансгена.

При необходимости, последовательность химерного аденовирусного капсида, содержащую полипептидные последовательности фибера, гексона и пентона, в соответствии с вариантами осуществления изобретения, и/или трансген можно подвергать оптимизации кодонного состава для обеспечения надлежащей экспрессии у подвергаемого лечению хозяина (например, человека). Оптимизация кодонного состава представляет собой технологию, широко используемую в данной области.

Трансген может находиться под контролем (т.е. функционально связанным с) происходящего из аденовируса промотора (например, главного позднего промотора) или может находиться под контролем гетерологичного промотора. Примеры подходящих гетерологичных промоторов включают промотор CMV и промотор RSV. Предпочтительно, промотор локализован выше представляющего интерес гетерологичного гена в экспрессирующей кассете.

В предпочтительных вариантах осуществления, аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

Фармацевтические и/или иммуногенные композиции.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим выделенный полинуклеотид по изобретению, выделенный полипептид по изобретению, вектор по изобретению, аденовирусный вектор по изобретению, и/или клетку-хозяина по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция", в рамках изобретения, обозначает продукт, содержащий выделенный полинуклеотид по изобретению, выделенный полипептид по изобретению, выделенный вектор (например, аденовирусный вектор) по изобретению, и/или клетку-хозяина по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Полинуклеотиды, полипептиды, векторы и/или клетки-хозяева по изобретению и содержащие их композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В рамках изобретения, термин "носитель" относится к любому расширителю, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя могут зависеть от способа введения для конкретного применения. В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не создает помех для эффективности композиции по изобретению или для биологической активности композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в свете настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции полинуклеотида, полипептида, вектора и/или клетки-хозяина, можно использовать по изобретению.

Получение состава фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известно в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21st edition (2005), и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регулирующие тоничность средства, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей можно использовать в составлении фармацевтических композиций по изобретению.

Фармацевтические композиции можно, например, составлять для экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта (т.е. фармацевтическая композиция, разработанная для экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта). Фармацевтические композиции можно, например, составлять для экспрессии антигенного полипептида или его антигенного фрагмента (например, фармацевтическая композиция для вызова иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта).

Фармацевтическая композиция, разработанная для вызова иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, может, например, быть обозначена как иммуногенная композиция. Иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие иммунологически эффективное количество очищенных или частично очищенных аденовирусных векторов для использования по изобретению. Указанные композиции можно составлять в форме вакцины (также обозначено как "иммуногенная композиция"), в соответствии со способами, хорошо известными в данной области. Такие композиции

могут включать адъюванты для усиления иммунных ответов. Оптимальные соотношения каждого компонента в составе можно определять посредством способов, хорошо известных специалисту в данной области в свете настоящего описания.

Иммуногенные композиции в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно получать в свете настоящего описания. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, включают жидкий носитель, такой как вода, вазелин, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Можно включать физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

Иммуногенные композиции, которые можно использовать по настоящему изобретению, могут содержать адъюванты. Адъюванты, подходящие для совместного введения по настоящему изобретению, должны представлять собой адъюванты, которые являются потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными у субъектов, включая QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, AS01, AS03, AS04, AS15, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафактин, квасцы и MF59.

Другие адъюванты, которые можно вводить, включают 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 изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалисту в данной области. Такие материалы должны являться нетоксичными и не должны создавать помех для эффективности активного ингредиента. Точный характер носителя или другого материала может зависеть от способа введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного способов, способа введения в слизистую оболочку (например, кишечника), интраназального или внутривагинального способов.

Способ индукции защитного иммунитета и/или экспрессии трансгена.

Другой общий аспект изобретения относится к способу индукции иммунного ответа и/или экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта. Способы могут, например, включать идентификацию нуждающегося в этом субъекта; приведение нуждающегося в этом субъекта в контакт с фармацевтической и/или иммуногенной композицией, описанной в настоящем описании; и вызов иммунного ответа и/или экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта. В конкретных вариантах осуществления, способы могут, например, включать введение субъекту вакцины, содержащей аденовирусный вектор, описанный в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам получения вакцины. Способы включают комбинирование аденовирусного вектора, описанного в настоящем описании, с фармацевтически приемлемым носителем.

Любые из иммуногенных композиций, в соответствии с вариантами осуществления изобретения, включая, но без ограничения, варианты, описанные в настоящем описании, можно использовать в способах по изобретению в качестве вакцины. Любые из фармацевтических композиций в соответствии с вариантами осуществления изобретения, включая, но без ограничения, композиции, описанные в настоящем описании, можно использовать в способах по изобретению для лечения или предотвращения заболевания у нуждающегося в этом субъекта посредством экспрессии представляющего интерес трансгена.

Введение иммуногенных композиций/вакцин/фармацевтических композиций, содержащих векторы, является, как правило, внутримышечным или подкожным. Однако, можно предусматривать также другие способы введения, такие как внутривенный, кожный, внутрикожный или назальный. Внутримышечное введение иммуногенных композиций можно осуществлять с использованием иглы для инъекции суспензии аденовирусного вектора. Альтернативой является использование безыгольного устройства для инъекции для введения композиции (с использованием, например, BIOJECTOR®) или лиофилизованного порошка, содержащих вакцину.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в участке поражения, вектор может находиться в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящие рН, изотоничность и стабильность. Специалист в данной области полностью способен получать подходящие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки можно включать, по необходимости. Можно использовать также состав с замедленным высвобождением.

Как правило, введение может иметь профилактическую цель для получения иммунного ответа против представляющего интерес антигена (например, бактериального, вирусного, паразитарного и/или грибкового патогена) до инфекции или развития симптомов. Введение аденовирусного вектора, экспрессирующего представляющий интерес трансген, может также иметь профилактическую цель у

нуждающегося в этом субъекта. Например, нуждающийся в этом субъект может иметь уменьшенную или прекращенную эндогенную экспрессию гена, соответствующего представляющему интерес трансгену. Заболевания и нарушения, которые можно лечить или предотвращать по настоящему изобретению, включают те, при которых иммунный ответ может играть защитную или терапевтическую роль, и/или корректирующая экспрессия трансгена приводит к нормальному функционированию клеток у нуждающегося в этом субъекта. В других вариантах осуществления, аденовирусные векторы можно вводить для профилактики после подвергания воздействию.

Иммуногенные композиции, содержащие химерные человеческие аденовирусные векторы, вводят субъекту, вызывая иммунный ответ на представляющий интерес антиген у субъекта. Количество композиции, достаточное для индукции поддающегося детекции иммунного ответа, определяют как представляющее собой "иммунологически эффективную дозу" или "эффективное количество" композиции. Иммуногенные композиции по изобретению могут индуцировать гуморальный, так же как опосредованный клетками иммунный ответ. В типичном варианте осуществления, иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Фармацевтические композиции можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в терапевтически эффективном количестве для лечения или предотвращения заболевания. Терапевтически эффективное количество обозначает количество аденовирусного вектора, экспрессирующего представляющий интерес трансген, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; количество, которое предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или количество, которое уменьшает или полностью облегчает симптомы, ассоциированные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству лекарственного средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (ii) уменьшение длительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iv) вызов регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (v) предотвращение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (viii) уменьшение длительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или ассоциированным с ним симптомом; (x) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

В рамках изобретения, термины "лечить", "лечение" и "обработка" все предназначены для обозначения облегчения или обращения по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра, относящегося к заболеванию, нарушению или состоянию, который, необязательно, является различимым у субъекта, но может являться различимым у субъекта. Термины "лечить", "лечение" и "обработка", могут также относиться к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к облегчению, предотвращению развития или начала, или уменьшению длительности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к предотвращению рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к прекращению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

Фактическое вводимое количество, и частота и временные рамки введения могут зависеть от характера и тяжести того, что подвергают лечению. Назначение лечения, например, решения о дозировании и т.д., находится в сфере ответственности врачей общей практики и других врачей, или, в ветеринарном контексте, ветеринара, и как правило, учитывает нарушение, подлежащее лечению, состояние индивидуального пациента, участок доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим специалистам. Примеры способов и протоколов, упомянутых выше, можно обнаружить в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980.

После получения аденовирусных векторов и, необязательно, составления таких частиц в

композиции, векторы можно вводить индивидууму, в частности, человеку или другому примату. Введение можно проводить человеку или другому млекопитающему, например, мыши, крысе, хомяку, морской свинке, кролику, овце, козе, свинье, лошади, корове, ослу, обезьяне, собаке или кошке. Доставка не относящемуся к человеку животному не обязательно должна быть для терапевтической цели, но может быть для использования в экспериментальном контексте, например, в исследовании механизмов иммунных ответов на аденовирусные векторы.

В одном иллюстративном режиме, аденовирусный вектор вводят (например, внутримышечно) в объеме, лежащем в диапазоне между приблизительно 100 мкл и приблизительно 10 мл, содержащем концентрации приблизительно от 10^4 до 10^{12} вирусных частиц/мл. Предпочтительно, аденовирусный вектор вводят в объеме, лежащем в диапазоне между 0,1 и 2,0 мл. Например, аденовирусный вектор можно вводить с использованием 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 вч/мл, 10^8 вч/мл, 10^9 вч/мл, 10^{10} вч/мл, 5×10^{10} вч/мл, 10^{11} вч/мл или 10^{12} вч/мл. Как правило, аденовирусный вектор вводят в количестве от приблизительно 10^9 до приблизительно 10^{12} вирусных частиц (вч) субъекту-человеку в ходе одного введения, более конкретно, в количестве от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{12} вч. За начальным введением может, например, следовать бустер, как описано выше.

За начальным введением может следовать бустер или ударная доза вакцины/композиции, содержащей такой же аденовирусный вектор, кодирующий представляющий интерес антиген и/или представляющий интерес трансген, или вакцины/композиции, содержащей отличный аденовирусный вектор, кодирующий такой же представляющий интерес антиген и/или представляющий интерес трансген.

Композицию можно, если желательно, предоставлять в наборе, упаковке или дозаторе, которые могут содержать одну или несколько единичных дозированных форм, содержащих активный ингредиент. Набор, например, может содержать металлическую или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Набор, упаковка или дозатор может сопровождаться инструкциями для введения.

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

Варианты осуществления

Настоящее изобретение также относится к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное, где химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное содержит полипептид фибера, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:11, полипептид гексона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:12, и полипептид пентона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:13.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенную последовательность нуклеиновой кислоты из варианта осуществления 1, где последовательность полипептида фибера содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 1 или 2, где последовательность полипептида гексона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:12.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту из любого из вариантов осуществления 1-3, где полипептид пентона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:13.

Вариант осуществления 5 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из любого из вариантов осуществления 1-4.

Вариант осуществления 6 представляет собой вектор из варианта осуществления 5, где вектор представляет собой аденовирусный вектор.

Вариант осуществления 7 представляет собой вектор из варианта осуществления 6, где аденовирусный вектор дополнительно содержит трансген, необязательно, где трансген представляет собой терапевтический трансген.

Вариант осуществления 8 представляет собой вектор из варианта осуществления 6 или 7, где аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E1.

Вариант осуществления 9 представляет собой вектор из любого из вариантов осуществления 6-8, где аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E3.

Вариант осуществления 10 представляет собой вектор из любого из вариантов осуществления 6-9, где аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей аденовирусной нуклеиновой кислоты из по меньшей мере одного из

человеческого аденовируса-4, человеческого аденовируса-5, человеческого аденовируса-26 или человеческого аденовируса-35.

Вариант осуществления 11 представляет собой вектор из варианта осуществления 10, где аденовирусный вектор содержитorf6 E4 человеческого аденовируса-5 (HAdV-5).

Вариант осуществления 12 представляет собой вектор из любого из вариантов осуществления 6-10, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

Вариант осуществления 13 представляет собой вектор из любого из вариантов осуществления 6-12, где трансген локализован в делеции E1, в делеции E3 и/или по соседству с правым инвертированным концевым повтором (rITR).

Вариант осуществления 14 представляет собой рекомбинантную клетку, содержащую вектор из любого из вариантов осуществления 5-12.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ получения вектора, включающий:

(a) выращивание рекомбинантной клетки из варианта осуществления 14 в условиях для продукции аденовирусного вектора; и

(b) выделение вектора из рекомбинантной клетки.

Вариант осуществления 16 представляет собой иммуногенную композицию, содержащую аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 6-13 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции из варианта осуществления 16.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ получения вакцины, включающий комбинирование аденовирусного вектора из любого из вариантов осуществления 6-13 с фармацевтически приемлемым носителем.

Вариант осуществления 19 представляет собой аденовирусный вектор, содержащий (a) по меньшей мере один трансген; и (b) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный аденовирусный капсид или его функциональное производное, где химерный аденовирусный капсид содержит полипептид фибера, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:11, полипептид гексона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:12, и полипептид пентона, имеющий аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью с аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO:13.

Вариант осуществления 20 представляет собой аденовирусный вектор из варианта осуществления 19, где последовательность полипептида фибера содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:11.

Вариант осуществления 21 представляет собой аденовирусный вектор из варианта осуществления 19 или 20, где последовательность полипептида гексона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:12.

Вариант осуществления 22 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-21, где полипептид пентона содержит аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:13.

Вариант осуществления 23 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-22, где аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E1.

Вариант осуществления 24 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-23, где аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E3.

Вариант осуществления 25 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-24, где аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей аденовирусной нуклеиновой кислоты из по меньшей мере одного из человеческого аденовируса-4, человеческого аденовируса-5, человеческого аденовируса-26 или человеческого аденовируса-35.

Вариант осуществления 26 представляет собой аденовирусный вектор из варианта осуществления 25, где аденовирусный вектор содержитorf6 E4 человеческого аденовируса-5 (HAdV-5).

Вариант осуществления 27 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-26, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

Вариант осуществления 28 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-27, где трансген локализован в делеции E1, в делеции E3 и/или по соседству с правым инвертированным концевым повтором (rITR).

Вариант осуществления 29 представляет собой аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-28, где трансген представляет собой терапевтический трансген.

Вариант осуществления 30 представляет собой рекомбинантную клетку, содержащую аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-29.

Вариант осуществления 31 представляет собой способ получения аденовирусного вектора, включающий:

(a) выращивание рекомбинантной клетки из варианта осуществления 30 в условиях для продукции аденовирусного вектора и

(b) выделение аденовирусного вектора из рекомбинантной клетки.

Вариант осуществления 32 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую аденовирусный вектор из любого из вариантов осуществления 19-29 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 33 представляет собой способ индукции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 32.

Вариант осуществления 34 представляет собой способ получения вакцины, включающий комбинирование аденовирусного вектора из любого из вариантов осуществления 19-29 с фармацевтически приемлемым носителем.

Вариант осуществления 35 представляет собой способ экспрессии трансгена у нуждающегося в этом субъекта, включающий:

a) идентификацию субъекта, нуждающегося в экспрессированном трансгене;

b) приведение субъекта в контакт с вектором из варианта осуществления 7 или аденовирусным вектором из любого из вариантов осуществления 19-29 и

c) экспрессию трансгена у субъекта.

Вариант осуществления 36 представляет собой способ из варианта осуществления 35, где экспрессия трансгена у нуждающегося в этом субъекта лечит или предотвращает заболевание или нарушение.

Вариант осуществления 37 представляет собой способ из варианта осуществления 35, где приведение субъекта в контакт с вектором включает выделение клетки от субъекта и приведение клетки в контакт с вектором.

Вариант осуществления 38 представляет собой способ из любого из вариантов осуществления 35-37, где нуждающийся в этом субъект представляет собой субъекта-человека.

Вариант осуществления 39 представляет собой применение вектора из варианта осуществления 7 для лечения или предотвращения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает приведение нуждающегося в этом субъекта в контакт с вектором, где приведение нуждающегося в этом субъекта в контакт приводит к экспрессии терапевтического трансгена.

Вариант осуществления 40 представляет собой применение в соответствии с вариантом осуществления 39, где приведение субъекта в контакт с вектором включает выделение клетки от субъекта и приведение клетки в контакт с вектором.

Вариант осуществления 41 представляет собой применение аденовирусного вектора из любого из вариантов осуществления 19-29 для лечения или предотвращения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает приведение нуждающегося в этом субъекта в контакт с аденовирусным вектором, где приведение нуждающегося в этом субъекта в контакт приводит к экспрессии терапевтического трансгена.

Вариант осуществления 42 представляет собой применение из варианта осуществления 41, где приведение субъекта в контакт с аденовирусным вектором включает выделение клетки от субъекта и приведение клетки в контакт с аденовирусным вектором.

Примеры

Пример 1. Получение векторов с делецией E1 и E3 на основе нового изолята аденовируса Ad20-42-42.

Новый изолят аденовируса человека, Ad20-42-42 (SEQ ID NO:1), идентифицировали и секвенировали. Обнаружили, что этот изолят аденовируса человека филогенетически принадлежит к виду D аденовируса человека (HAdV-D) и является природной химерой HAdV-20 и HAdV-42. Ген пентона происходит из HAdV-20, в то время как гены гексона и фибера происходят из HAdV-42. На фиг. 1 показана карта генома изолята Ad20-42-42 аденовируса человека.

Описание системы из трех плазмид, используемой для получения векторов Ad на основе Ad20-42-42.

Рекомбинантные аденовирусные векторы на основе Ad20-42-42 получали с использованием системы из трех плазмид. Система плазмид состоит из "адаптерной плазмиды", перекрывающей 5'-конец генома аденовируса, в которой область E1 делетирована и заменена на экспрессирующую кассету, несущую представляющий интерес ген (LacZ, Luc+ или eGFP). Вторая, "промежуточная" плазида перекрывает среднюю часть генома аденовируса без каких-либо модификаций. 3'-конец аденовирусной последовательности несет плазида "правого конца". В конструкции правого конца область E3 делетирована, и природная ORF6/7 в области E4 заменена на ORF6/7 HAdV-5.

Таблица 1

Плазмиды, используемые для конструирования рекомбинантного аденовирусного вектора Ad20-42-42

Адаптерная плаزمида	SEQ ID NO:	Промежуточная плазмида	SEQ ID NO:	Плазмида правого конца	SEQ ID NO:
pAdApt20-42-42.Empty	2				
pAdApt20-42-42.LacZ	3	pBR.Ad20-42-42.SbfI	6	pBrAd20_42_42	SrfI-7
pAdApt20-42-42.Luc+	4	final interm		rITR_dE3_5orf6	
pAdApt20-42-42.eGFP	5				

Плазмиды несли последовательности вирусного вектора, которые перекрывались друг с другом на ~2000 положений нуклеотидов, чтобы позволять гомологичную рекомбинацию между этими последовательностями в клетках HEK293 или PER.C6® (фиг. 2).

Дизайн генома Ad вектора на основе Ad20-42-42: системы плазмид конструировали посредством нескольких стадий стандартных способов молекулярного клонирования. Каждый из геномов Ad вектора на основе Ad20-42-42 конструировали для содержания делеции E1, делеции E3, различных участков вставки трансгена, и замены природной открытой рамки считывания E4 (orf) 6 и orf6/7 на рамку из аденовируса человека-5 (HAdV-5) (пары оснований 32966-34077 из последовательности в GenBank AC_000008).

Адаптерные плазмиды.

Сначала конструировали адаптерную плазмиду с делецией E1 "pAdApt20-42-42.Empty". Экспрессирующую кассету помещали в бывшую локализацию делетированной области E1. Эта кассета находится под контролем главного немедленного раннего промотора цитомегаловируса (т.е. "промотора CMV") и содержит происходящий из SV40 сигнал полиаденилирования ("поли A SV40"). Экспрессирующая кассета снабжена участком множественного клонирования для облегчения вставки разнообразных представляющих интерес генов (LacZ, Luc+ и eGFP). Пустую адаптерную плазмиду pAdApt20-42-42 конструировали следующим образом.

Фрагмент 1, перекрывающий последовательность аденовируса дикого типа от н. 1-461, получали с использованием 5'-фланкирующего участка рестриционного фермента PacI и 3'-фланкирующего участка AvrII, введенных посредством праймеров для ПЦР. Продукт ПЦР фрагмента 1 подвергали двойному расщеплению с использованием PacI и AvrII.

Фрагмент 2, содержащий полиА SV40 и нуклеотиды 3361-5908 последовательности аденовируса дикого типа, получали посредством получения двух ампликонов ПЦР с последующей ПЦР для сборки этих двух продуктов. Первый продукт ПЦР, содержащий "полиА SV40" амплифицировали из сконструированной ранее плазмиды (pAdApt26.Empty; Abbink et al., J. Virol. 81(9):4654-63 (2007)). На 5'-конце продукта ПЦР вводили участок рестрикции XbaI, в то время как с использованием обратного праймера гомологичный фрагмент Ad20-42-42 вводили в продукт ПЦР. Это перекрывание содержало природный участок узнавания XbaI (присутствующий в геноме Ad20-42-42), но его преднамеренно разрушили посредством изменения одного основания в участке узнавания. Этот фрагмент ПЦР имел длину 174 п.о. Вторая ПЦР перекрывала геном Ad20-42-42 от начала pIX (включая pIX) до приблизительно середины гена полимеразы. Прямой праймер из этой ПЦР содержал перекрывание с продуктом ПЦР 1, содержащим полиА SV40 (с разрушенным участком узнавания XbaI). Участок узнавания PacI вводили в этот фрагмент ПЦР с использованием обратного праймера. Этот фрагмент ПЦР имел длину 2574 п.о. Затем проводили ПЦР для сборки с использованием продуктов ПЦР 1 и 2 в качестве матрицы для объединения этих фрагментов. Размер продукта ПЦР для сборки составлял 2710 п.о. Затем этот продукт ПЦР для сборки подвергали двойному расщеплению с использованием XbaI и PacI.

Ранее сконструированную плазмиду (Abbink et al., J. Virol. 81(9):4654-63 (2007)) расщепляли с использованием XbaI, AvrII и PacI для получения остова плазмиды и промотора CMV (фрагмент 2108 и 880). Затем проводили лигирование в четырех точках с использованием фрагментов pAdApt26.Empty (фрагменты 2108 и 880) и фрагмента 1, и фрагмента 2. Это приводило к получению плазмиды pAdApt20-42-42.Empty.

Репортерные гены вставляли в MCS с использованием любого уникального участка KpnI, HindIII или BamHI вместе с участком XbaI с последующим лигированием.

Промежуточная плазмиды.

Промежуточная плазмиды несет геном аденовируса дикого типа от положения н. 2088 до 18494 без каких-либо модификаций. Сначала, получали два фрагмента ПЦР. Один покрывающий 5'-конец промежуточного фрагмента с участком PacI, включенным в прямой праймер, и обратный праймер конструировали немного ниже природного участка SbfI (размер продукта: 2273 п.о.) в геноме аденовируса. Второй фрагмент ПЦР получали с использованием прямого праймера, сконструированного немного выше от другого природного участка SbfI в геноме аденовируса, и участок PacI включали в обратный праймер (размер продукта: 2407 п.о.). Оба фрагмента ПЦР расщепляли с использованием ферментов рестрикции PacI и SbfI.

Остов субклона плазмиды pBR322 (Abbink et al., J. Virol. 81(9):4654-63 (2007)) с фланкирующими участками PacI расщепляли с использованием PacI (2086 п.о.). 3-точечное лигирование проводили с использованием двух дважды расщепленных продуктов ПЦР и расщепленного PacI, дефосфорилированного остова плазмиды pBr. Это привело в результате к получению плазмиды pBR.Ad20-42-42.PacI-SbfI. Плазмиду pBR.Ad20-42-42.PacI-SbfI, полученную на предшествующей стадии, размыкали разрезанием с использованием фермента рестрикции SbfI. Геномную ДНК Ad20-42-42 дикого типа расщепляли с использованием фермента рестрикции SbfI, и фрагмент длиной 11858 н., перекрывающий геном дикого типа от гена полимеразы вплоть до приблизительно середины гена pVI, лигировали в плазмиду pBR. Ad20-42-42.PacI-SbfI. Это привело в результате к получению плазмиды "pBR.Ad20-42-42.SbfI final interm".

Плазида правого конца.

Конструирование pBrAd20-42-42.SrfI-rITR: 5'-конец правого конца генома Ad-20-42-42 амплифицировали посредством ПЦР (фрагмент 1, 2098 п.о.) таким образом, что природный фрагмент SrfI-SbfI включали в продукт ПЦР, и прямой праймер дополняли участком узнавания PacI. Получали другой фрагмент, перекрывающий 3'-конец правого конца генома Ad-20-42-42, с участком узнавания SbfI, введенным посредством прямого праймера, и с участком узнавания PacI, включенным в обратный праймер. Близко к 5'-концу продукта ПЦР присутствовал природный участок MluI. Затем оба продукта ПЦР расщепляли с использованием ферментов PacI и SbfI.

Остов субклона плазмиды pBR322 (Abbink et al., J. Virol. 81(9):4654-63 (2007)) с фланкирующими участками PacI расщепляли с использованием PacI (размер фрагмента 2108 п.о.). Два расщепленных посредством PacI и SbfI фрагмента ПЦР с предшествующих стадий клонировали в остов pBR, получая в результате плазмиду pBrSrfI-SbfI/MluI-rITR. Затем эту плазмиду расщепляли с использованием SbfI и MluI. Геномную ДНК Ad20-42-42 дикого типа расщепляли с использованием SbfI и MluI, и фрагмент между геномными положениями нуклеотидов 17742 и 33714 выделяли и клонировали в плазмиду выше. Это приводило к получению в результате pBrAd20-42-42 SrfI-rITR, несущей геном Ad20-42-42 дикого типа от положения 15373 вплоть до последнего нуклеотида rITR (35187).

Делеция области E3: с целью делеции области E3, проводили две ПЦР с использованием плазмиды pBrAd20-42-42 SrfI-rITR в качестве матрицы. Первую разрабатывали выше области, подлежащей делеции; прямой праймер перекрывал природный участок AscI, в то время как в обратный праймер вводили участок SpeI. Вторую ПЦР разрабатывали ниже области E3. Обратный праймер перекрывал природный участок EcoRI в геноме Ad20-42-42, в то время как в прямой праймер включали участок SpeI. Затем первый продукт дважды расщепляли с использованием SpeI и AscI, и второй продукт - с использованием SpeI и EcoRI. Плазмиду pBrAd20-42-42 SrfI-rITR расщепляли с использованием AscI и EcoRI, и 3-точечное лигирование проводили с использованием расщепленных плазмиды и продуктов ПЦР. Фрагмент между 26673 и 30753 геномными положениями нуклеотидов Ad20-42-42 дикого типа, таким образом, выпадал из генома, и последовательность связывали посредством введения участка SpeI. Это приводило к получению в результате плазмиды pBrAd20-42-42.SrfI-rITR.dE3.

Замена природной ORF6/7 на гомологичную область HAdV-5: для замены ORF6/7 три фрагмента амплифицировали посредством ПЦР. Два разрабатывали для перекрывания области выше и ниже ORF6/7, подлежащей замене. Прямой праймер из первой ПЦР нес участок AscI, и обратный праймер из второй ПЦР нес участок EcoRI. Третью ПЦР проводили для получения ORF6/7 HAdV-5 из полученной ранее плазмиды (pBr.Ad26.SrfI-rITR.dE3.5orf6 (Abbink et al., J. Virol. 81(9):4654-63 (2007)), и она частично перекрывалась с двумя другими продуктами ПЦР. Эти три продукта ПЦР затем подвергали ПЦР для слияния, и затем двойному расщеплению с использованием AscI и EcoRI. Плазмиду pBrAd20-42-42.SrfI-rITR.dE3 также расщепляли с использованием AscI и EcoRI, и расщепленный слитый продукт ПЦР вставляли посредством 2-точечного лигирования для получения конечной плазмиды правого конца: pBrAd20-42-42 SrfI-rITR.dE3.5orf6.

Получение и продукция аденовирусных векторов на основе Ad20-42-42.

Аденовирусные векторы Ad20-42-42.LacZ.5ORF6, Ad20-42-42.Luc+.5ORF6 и Ad20-42-42.eGFP.5ORF6, которые, соответственно, содержали последовательности генома аденовирусного вектора SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10, получали посредством трансфекции соответствующих плазмид: (1) Адаптерная плазида "pAdApt20-42-42.LacZ" (SEQ ID NO:3) или "pAdApt20-42-42.Luc+" (SEQ ID NO:4), или "pAdApt20-42-42.eGFP" (SEQ ID NO:5); (2) промежуточная плазида "pBR.Ad20-42-42.SbfI final interm" (SEQ ID NO:6; фиг. 5); (3) плазида правого конца "pBrAd20-42-42 SrfI-rITR.dE3.5orf6" (SEQ ID NO:7; фиг. 6).

Трансфекцию с использованием системы из трех плазмид проводили в E1-комплементирующих клетках HEK293. До трансфекции в клетки HEK293, которые выращивали как адгерентные культуры в модифицированной способом Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), плазмиды генома вектора Ad расщепляли с использованием PacI для высвобождения соответствующих фрагментов генома аденовирусного вектора из плазмиды. Трансфекцию проводили в соответствии со стандартными способами с использованием реагента для трансфекции липофектамина (Invitrogen; Carlsbad, CA). После сбора материала трансфекций для спасения вируса, вирусы

дополнительно амплифицировали посредством нескольких последовательных циклов инфекции в культурах клеток HEK293. Вирусы очищали из неочищенного материала собранных вирусов с использованием способа двухступенчатого 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 (ВЧ) измеряли посредством способа на основе спектрофотометрии, описанного ранее (Maizel et al., "The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12", *Virology*, 36(1):115-25 (1968)).

Пример 2. Клеточные и гуморальные иммунные ответы, индуцированные новым аденовирусным вектором.

В этом примере описаны эксперименты, проведенные для оценки иммуногенности нового аденовирусного вектора на основе Ad20-42-42, полученного по настоящему изобретению. В этих экспериментах, новый вектор оценивали по его способности индуцировать гуморальные и клеточные иммунные ответы против кодируемого вектором (модельного) антигена у мышей после внутримышечной иммунизации. Тестируемый вектор экспрессировал люциферазу светляка (FLuc) в качестве модельного антигена. Вектор сравнивали параллельно с сравнительным вектором на основе человеческого аденовируса тип 26 (HAdV-26, также обозначенным в настоящем описании как Ad26). Иммунные ответы против соответствующих антигенов измеряли с использованием хорошо известных иммунологических анализов, таких как анализ иммуноферментных пятен (ELISPOT) и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Клеточные иммунные ответы, индуцированные посредством Ad20-42-42.FLuc.

Иммуногенность нового аденовирусного вектора Ad20-42-42 оценивали у мышей Balb/C, которых иммунизировали посредством внутримышечной инъекции с использованием Ad26.FLuc (сравнительного контроля), вектора Ad20-42-42, экспрессирующего люциферазу светляка (Ad20-42-42.FLuc), или с использованием аденовектора, лишённого трансгена (Ad26.E). Две дозы вектора тестировали для введения: 10^9 и 10^{10} вирусных частиц (вч) на мыш, за исключением группы Ad26.E, где использовали 10^{10} вч. Животных умерщвляли через две недели после иммунизации и отбирали образцы сыворотки и спленоцитов (фиг. 7A).

Клеточные иммунные ответы против кодируемого вектором антигена оценивали посредством специфического для FLuc анализа ELISPOT IFN- γ . Для этой цели спленоциты, образцы которых отбирали у иммунизированных мышей, на время умерщвления, стимулировали в течение ночи с использованием 15-членников, перекрывающих пул пептидов FLuc. Специфические для антигена иммунные ответы определяли посредством измерения относительного количества секретирующих IFN- γ клеток (фиг. 7B). Результаты показывают, что клеточные иммунные ответы, индуцированные посредством Ad20-42-42, являлись сравнимыми с ответом, наблюдаемым для Ad26.FLuc при наивысшей дозе для иммунизации (10^{10}). Как ожидали, специфических для FLuc ответов не детектировали против аденовекторов, лишённых люциферазы светляка (Ad26.E). В общем, данные показывают, что Ad20-42-42 индуцирует сильный клеточный ответ.

Пример 3. Оценка серологической перекрестной нейтрализации среди новых и существующих аденовирусных векторов.

Для его потенциальной полезности в качестве нового аденовирусного вакцинного вектора, новый аденовирусный вектор Ad20-42-42, полученный по настоящему изобретению, предпочтительно, должен являться серологически отличным от существующих аденовирусных векторов, в настоящее время находящихся в разработке в качестве вакцинных векторов, таких как векторы на основе аденовируса человека серотипа HAdV-26. Таким образом, проводили тесты перекрестной нейтрализации между новым аденовирусным вектором Ad20-42-42 и существующим вектором на основе HAdV-26 (Ad26). С этой целью, мышинные антисыворотки, полученные против этих векторов, подвергали перекрестному тестированию против обоих векторов в анализе нейтрализации аденовируса. Мышинные антисыворотки, используемые для этого анализа, собирали от мышей Balb/C, через две недели после их иммунизации с использованием 10^{10} векторных частиц на мыш. Анализ нейтрализации аденовируса проводили, как описано ранее (Spangiers et al 2003. *J.Clin. Microbiol.* 41:5046-5052). Кратко, начиная с разведения 1:16, получали 2-кратные серийные разведения сывороток, затем предварительно смешивали с аденовирусными векторами, экспрессирующими люциферазу светляка (FLuc), и затем инкубировали в течение ночи с клетками A549 (при множественности инфекции (MOI) 500 вирусных частиц на клетку). Уровни активности люциферазы в лизатах инфицированных клеток, измеренные через 24 ч после инфекции, представляют эффективность инфекции вектором. Титры нейтрализации против данного вектора определяли как наивысшее разведение сыворотки, способное приводить к 90% уменьшению эффективности инфекции вектором. Титры нейтрализации произвольно разделяли на следующие категории: <16 (отсутствие нейтрализации), 16,1-200 (слабо перекрестно нейтрализующие), 201-2000 (перекрестно нейтрализующие), и >2001 (сильно перекрестно нейтрализующие). Результаты показали отсутствие значительной перекрестной нейтрализации между тестируемыми векторами (фиг. 8). Присутствовала только некоторая слабая, односторонняя перекрестная нейтрализация, наблюдаемая

между векторами Ad20-42-42 и Ad26, где для антисыворотки против Ad26 показан титр нейтрализации 23 против Ad20-42-42, и для антисыворотки против Ad20-42-42 не показано никакой нейтрализации против Ad26. Таким образом, для нового аденовирусного вектора Ad20-42-42 показана перекрестная нейтрализация от низкой до отсутствующей с использованием человеческого аденовирусного вектора Ad26.

Пример 4. Серораспространенность нового аденовирусного вектора в человеческих популяциях.

Высокие уровни преобладающего гуморального иммунитета против вектора в целевых популяциях для вакцины могут препятствовать потенциальному использованию нового аденовирусного вектора в качестве эффективной платформы для вакцины. Таким образом, вектор Ad20-42-42 оценивали по его серораспространенности в 103 образцах сыворотки человека. Вектор тестировали по нейтрализации посредством образцов сыворотки человека, посредством проведения анализа на основе СРЕ (для вируса дикого типа (wt)) и анализа репортера (для экспрессирующего Luc+ вируса).

Стандартные анализы нейтрализации аденовируса проводили, как описано в примере 3 и как описано ранее (Spangiers et al 2003. J. Clin. Microbiol. 41:5046-5052). Для анализа нейтрализации аденовируса дикого типа, сыворотки инактивировали нагреванием при 55°C в течение 15 мин и разводили (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, или 1/32). Затем 50 мкл препарата аденовируса для хранения, разведенного до 50% инфекционной дозы для культуры 200 клеток (CCID₅₀), добавляли в лунки, содержащие сыворотку. На сутки 5-6, планшеты анализировали посредством анализа МТТ (Promega) по ингибированию СРЕ. Сыворотки оценивали как положительные по нейтрализации, когда защита от СРЕ составляла >90%. Процент ингибирования репликации рассчитывали относительно положительного и отрицательного контроля.

Как указано выше, кратко, начиная с разведения 1:16, получали 2-кратные серийные разведения сывороток, затем предварительно смешивали с аденовирусными векторами, экспрессирующими люциферазу светляка (FLuc), и затем инкубировали в течение ночи с клетками A549 (при множественности инфекции 500 вирусных частиц на клетку). Уровни активности люциферазы в лизатах инфицированных клеток, измеренные через 24 ч после инфекции, представляли эффективность инфекции вектором. Титры нейтрализации против данного вектора определяли как наивысшее разведение сыворотки, способное приводить к 90% уменьшению эффективности инфекции вектором. Титры нейтрализации произвольно разделяли на следующие категории: <16 (отсутствие нейтрализации), 16-50, 50-200, 200-500, 500-1000 и >1000.

Результаты показывают, что аденовирусный вектор Ad20-42-42 имеет существенно низкую серораспространенность (20-35% сероположительности) у исследуемых субъектов-людей, по сравнению с вектором HAdV-5, тестируемым в таких же анализах (фиг. 9). Кроме того, положительные титры нейтрализации, наблюдаемые против нового вектора Ad20-42-42, являлись в основном низкими, по большей части, не выше 200. В отличие от этого, положительные титры нейтрализации, обнаруженные против HAdV-5, лежали в более высоком диапазоне, достигая выше 1000. В то время как для вектора HAdV-35 показан сходный % сероположительности с Ad20-42-42, наблюдаемые титры для HAdV-35 лежали в более высоком диапазоне, чем титры Ad20-42-42.

Совместно, вышеуказанные данные показывают, что преобладающий гуморальный иммунитет против вектора Ad20-42-42 можно считать низким в оцененных целевых популяциях для вакцины, что позволяет предполагать, что этот вектор имеет потенциал в качестве эффективного вакцинного вектора в этой человеческой популяции.

Пример 5. Способность к трансдукции для вектора Ad20-42-42 в клетках сосудов человека.

Способность трансдуцировать представляющие интерес клетки и экспрессировать белки, которые они кодируют, являются необходимыми признаками векторов, предназначенных для использования в генотерапии. Новый аденовирусный вектор Ad20-42-42 тестировали по емкости трансдукции в клетках сосудов человека с использованием анализа люциферазы.

Кратко, HSVEC (эндотелиальные клетки подкожной вены человека) трансдуцировали с использованием экспрессирующего люциферазу и LacZ вектора Ad20-42-42 зависимым от дозы образом и в присутствии или в отсутствие фактора свертывания крови X (FX), для выяснения чувствительности к опосредованной FX модификации тропизма или ее отсутствия. HAd5 и HAd35 использовали в качестве контрольных векторов. Клетки рассеивали при плотности 10000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты. Их инфицировали с использованием 1000, 5000 и 10000 вирусных частиц (вч) на клетку Ad5Luc, Ad35Luc и Ad20-42-42Luc+, экспрессирующих люциферазу, в течение 3 ч при 37°C с добавлением и без добавления FX. После 3-часовой инкубации, среду удаляли, и клетки культивировали в течение 48 ч в полной среде, до того, как анализ экспрессии трансгена люциферазы проводили и выражали как относительные световые единицы (RLU) на миллиграмм (мг) белка.

Статистическую значимость между группами рассчитывали с использованием двусторонних t-критериев Стьюдента для двух выборок, где $p < 0,05$ считали статистически значимым ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$). Все результаты представляют усредненные данные из нескольких экспериментов, с четырьмя повторами для каждого условия (фиг. 10).

Полученные данные показывают заметно более высокий потенциал трансдукции Ad20-42-42, по

сравнению с HAd5 и HAd35, в присутствии FX. Наивысшую экспрессию люциферазы отмечали, когда использовали дозу 10000 вч/клетку, достигая уровней $1,5 \times 10^9$ в присутствии FX, и $\sim 1 \times 10^8$, когда FX отсутствовал. Таким образом, эти результаты показывают, что трансдукция Ad20-42-42 являлась значимо усиленной посредством FX, и что этот вектор имеет свойства более сильной трансдукции, по сравнению с двумя контрольными векторами, в присутствии FX.

Превосходящий профиль трансдукции Ad20-42-42, по сравнению с контрольным вектором HAd5, подтверждали посредством окрашивания LacZ для клеток HSVEC, с использованием трех различных доз вектора (1000, 5000 и 10000 вч/клетку), в присутствии FX. Окрашивание наблюдали с использованием простого светового микроскопа (фиг. 11).

Как ожидали, результаты показали постепенное увеличение окрашивания по мере увеличения дозы. Окрашивание для 1000, 5000 и 10000 вч/клетку показано справа налево на фиг. 11. Для клеток, трансдуцированных Ad20-42-42, показано более сильное окрашивание, по сравнению с трансдуцированными HAd5 клетками.

В общем, данные показали, что Ad20-42-42 являлся способным к трансдукции клеток сосудов, и что она была более высокой, чем у контрольных векторов в присутствии FX. Это делает Ad20-42-42 хорошим кандидатом на вектор для генотерапии, для использования в лечении заболеваний, где эндотелиальные клетки являются характерными, таких как сердечно-сосудистое заболевание или злокачественная опухоль.

Пример 6. Рецепторы-кандидаты для AdV20-42-42.

Важным признаком Ad20-42-42, который отличает его среди многих других векторов, является его потенциал к связыванию с рецептором как вируса Коксаки, так и аденовируса (CAR), и рецептором CD46 клетки, и его чувствительность к усилению трансдукции посредством FX, таким образом, расширение диапазона клеток и тканей у человека, которые могут являться доступными для генотерапии с использованием вектора Ad20-42-42.

Для проверки способности Ad20-42-42 связываться со множеством рецепторов и использовать их в качестве инструмента для входа в клетку, использовали несколько типов индикаторных кокеток. Клетки яичника китайского хомяка (CHO), экспрессирующие или лишенные CAR; клетки CHO, экспрессирующие или лишенные сиаловой кислоты; и клетки TC1, экспрессирующие или лишенные десмоглеина 2 (DSG2), трансдуцировали с использованием Ad20-42-42 и HAd5, который использовали в качестве контрольного вектора (фиг. 12A и 12B). Клетки трансдуцировали с использованием 10000 вч/клетку, и анализ люциферазы проводили, как описано выше.

Результаты, полученные из этих экспериментов, определили CAR в качестве потенциально доминантного трансмембранного рецептора, с которым связывается Ad20-42-42, по сравнению с сиаловой кислотой и DSG2, в клетках, имеющих все три рецептора на своей поверхности.

Сходные эксперименты проводили для проверки способности этого вектора связываться с CD46, другим рецептором, обычно используемым множеством типов аденовируса для входа в клетку. Для этой цели, клетки CHO, содержащие или лишенные различных изоформ (BC1, BC2, C1 и C2) этого рецептора, трансдуцировали с использованием Ad20-42-42 и HAd5, который использовали в качестве контрольного вектора. Показано, что Ad20-42-42, по-видимому, использует изоформу C2 рецептора в процессе инфекции клеток. С другой стороны, клетки K1, лишенные CD46, плохо подвергались трансфекции (фиг. 12C и 12D).

Статистическую значимость между группами рассчитывали с использованием двусторонних t-критериев Стьюдента для двух выборок, где $p < 0,05$ считали статистически значимым ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$). Все результаты представляют усредненные данные из проведенных несколько раз экспериментов, с четырьмя повторами для каждого условия. Планки погрешностей представлены как стандартная ошибка среднего (SEM).

Эти обнаружения показывают, что новый аденовирусный вектор Ad20-42-42 связывается с обоими рецепторами, CAR и CD46, присутствующими во многих типах клеток. Это расширяет диапазон типов клеток, которые можно трансдуцировать посредством вектора Ad20-42-42, что может обеспечивать преимущество для его использования в генотерапии.

Пример 7. Биораспределение Ad20-42-42 у мышей.

Для цели проверки биораспределения Ad20-42-42, его эффекта на сердечно-сосудистую систему (CVS) и его роли в качестве вектора для доставки генов, проводили эксперименты *in vivo*.

Использовали иммунокомпетентных самцов мышей, в возрасте 8-10 недель. Формировали шесть групп животных (группа для тестирования каждого вируса содержала 5 животных, и контрольные группы PBS - 3 животных). Для истощения циркулирующих макрофагов и более эффективной оценки прохождения вируса на уровне целого организма, 200 мкл липосомного клондроната (CL) внутривенно (*i.v.*) вводили в соответствующих группах за 48 ч до введения вируса.

Группы обработки инфицировали *i.v.* с использованием однократной дозы вируса (10×10^{11} вирусных частиц (ВЧ), разведенной в 100 мкл PBS), Ad20-42-42Luc+ или HAd5Luc, который использовали в качестве контрольного вектора. Контрольные группы вместо этого инъецировали с использованием 100 мкл PBS в той же самой временной точке.

Через 48 ч после доставки вируса, считывание активности люциферазы проводили с использованием биоломинесцентной визуализации, после инъекции 0,5 мл люциферина животным. Животных поддерживали под ингаляционной анестезией. Детектированные уровни экспрессии люциферазы показаны на фиг. 13.

После завершения визуализации, животных умерщвляли, и их органы (печень, сердце, селезенку, почку, кишечник, поджелудочную железу и легкие) собирали. Геномы вектора количественно оценивали посредством q-ПЦР.

В контрольной группе животных, инфицированных с использованием HAd5, вирус являлся в основном распределенным в печени и селезенке на уровнях 2×10^5 и $\sim 3 \times 10^5$ биоломинесцентных единиц, соответственно, в группе, не обработанной с использованием CL, в то время как в группе, предварительно обработанной с использованием CL, распределение являлось даже более высоким, близким к 5×10^5 в обоих органах (фиг. 14A-14B).

С другой стороны, Ad20-42-42, по-видимому, имел тропизм только к селезенке, в то время как в других органах он не был детектирован. Как ожидали, общее количество копий ДНК являлось значимо более высоким, когда добавляли CL ($\sim 2,5 \times 10^6$), по сравнению с группой без предварительной обработки CL (1×10^5) (фиг. 14C-14D).

В совокупности, эти данные показывают, что Ad20-42-42 имеет хороший профиль безопасности, с тропизмом только к селезенке, обнаруженным в исследованиях, в то время как количество копий ДНК, обнаруженное в других тестируемых органах, плохо поддавалось детекции. Для вектора Ad20-42-42 не показано никакого тропизма к печени, что делает его вектором с низкой доступностью и токсичностью для печени, и, таким образом, более подходящим для генотерапии, где перенос генов в печень может являться помехой для эффективности в целевой ткани.

Специалисту в данной области понятно, что можно вносить изменения в варианты осуществления, описанные выше, без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Понятно, таким образом, что настоящее изобретение не является ограниченным конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для включения модификаций в рамках содержания и объема настоящего изобретения, как определено посредством настоящего описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный аденовирусный капсид, где химерный аденовирусный капсид содержит полипептид фибер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, полипептид гексон, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и полипептид пентон, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

2. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.1.

3. Вектор по п.2, где вектор представляет собой аденовирусный вектор.

4. Вектор по п.3, где аденовирусный вектор дополнительно содержит трансген.

5. Вектор по п.3 или 4, где аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E1.

6. Вектор по любому из пп.3-5, где аденовирусный вектор дополнительно содержит делецию E3.

7. Вектор по любому из пп.3-6, где аденовирусный вектор представляет собой химерный аденовирусный вектор, содержащий одну или несколько последовательностей аденовирусной нуклеиновой кислоты по меньшей мере из одного человеческого аденовируса-4, человеческого аденовируса-5, человеческого аденовируса-26 или человеческого аденовируса-35.

8. Вектор по п.7, где аденовирусный вектор содержит *orf6* E4 человеческого аденовируса-5 (HAdV-5).

9. Вектор по любому из пп.3-8, где аденовирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

10. Вектор по любому из пп.4-9, где трансген локализован в делеции E1, в делеции E3 и/или по соседству с правым инвертированным концевым повтором (rITR).

11. Рекомбинантная клетка, содержащая вектор по любому из пп.2-9.

12. Способ получения вектора, включающий:

(a) выращивание рекомбинантной клетки по п.11 в условиях для продукции аденовирусного вектора и

(b) выделение вектора из рекомбинантной клетки.

13. Иммуногенная композиция для индукции иммунного ответа против антигенного продукта, кодируемого трансгеном, содержащая аденовирусный вектор по любому из пп.4-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ индукции иммунного ответа против антигенного продукта, кодируемого трансгеном, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту иммуногенной композиции по п.13.

15. Способ получения вакцины для антигенного продукта, кодируемого трансгеном, включающий комбинирование аденовирусного вектора по любому из пп.4-10 с фармацевтически приемлемым носителем.

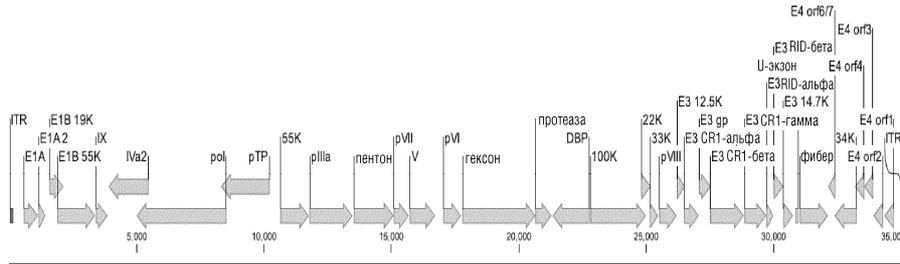
16. Способ экспрессии трансгена, который лечит или предотвращает заболевание или нарушение у

нуждающегося в этом субъекта, включающий:

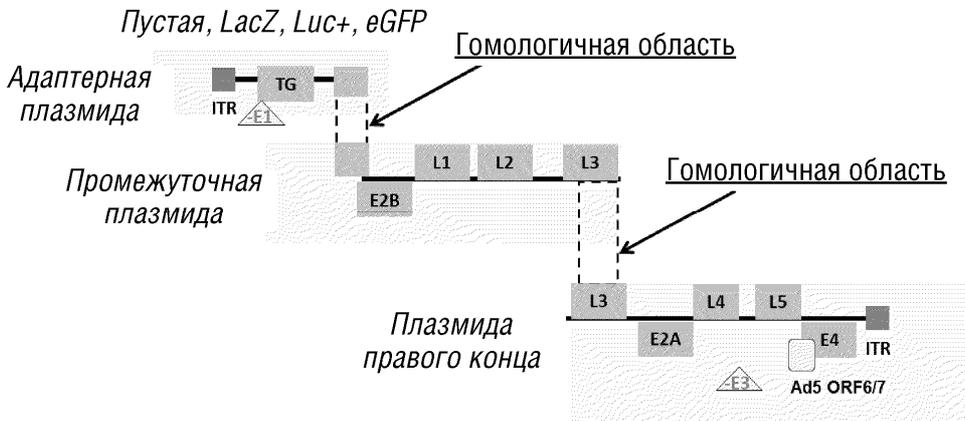
- а) идентификацию субъекта, нуждающегося в экспрессированном трансгене;
- б) приведение субъекта в контакт с вектором по п.4 и
- с) экспрессию трансгена у субъекта.

17. Способ по п.16, где приведение субъекта в контакт с вектором включает выделение клетки от субъекта, приведение клетки в контакт с вектором *in vitro* и повторное введение клетки субъекту.

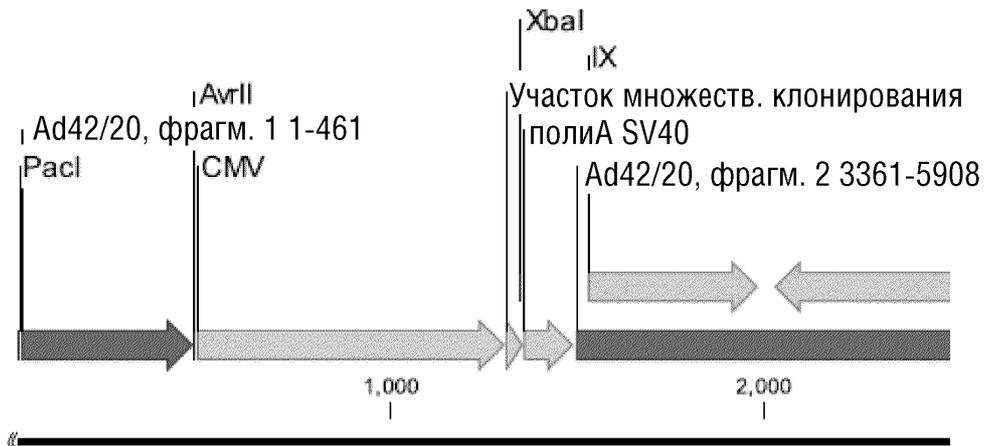
18. Способ по любому из пп.16, 17, где нуждающийся в этом субъект представляет собой человека.



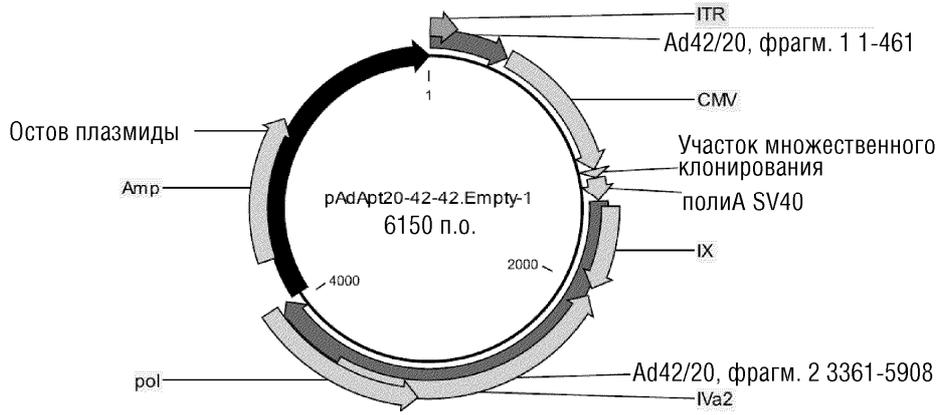
Фиг. 1



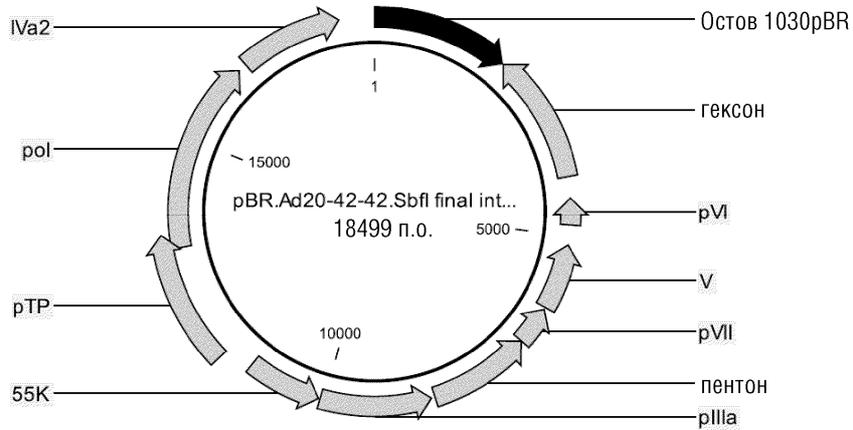
Фиг. 2



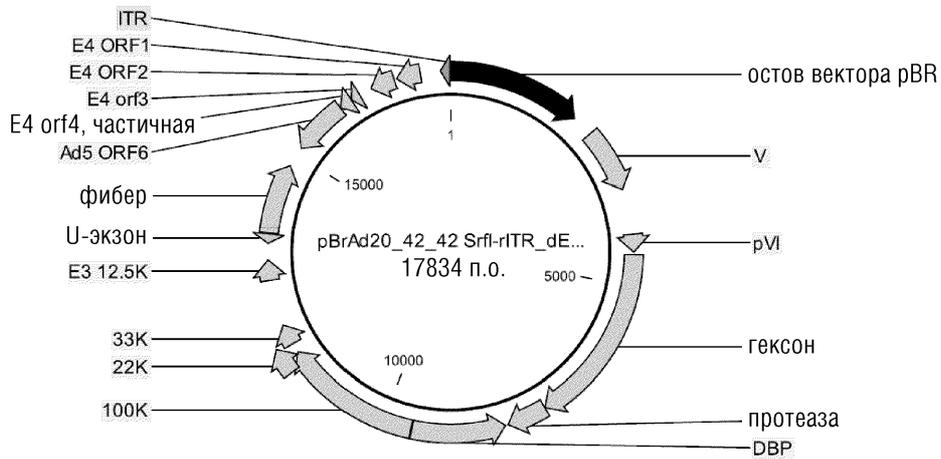
Фиг. 3



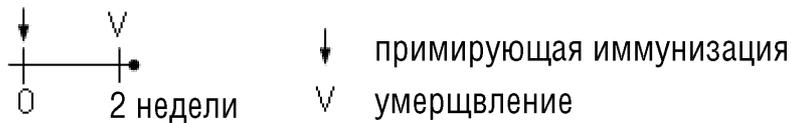
Фиг. 4



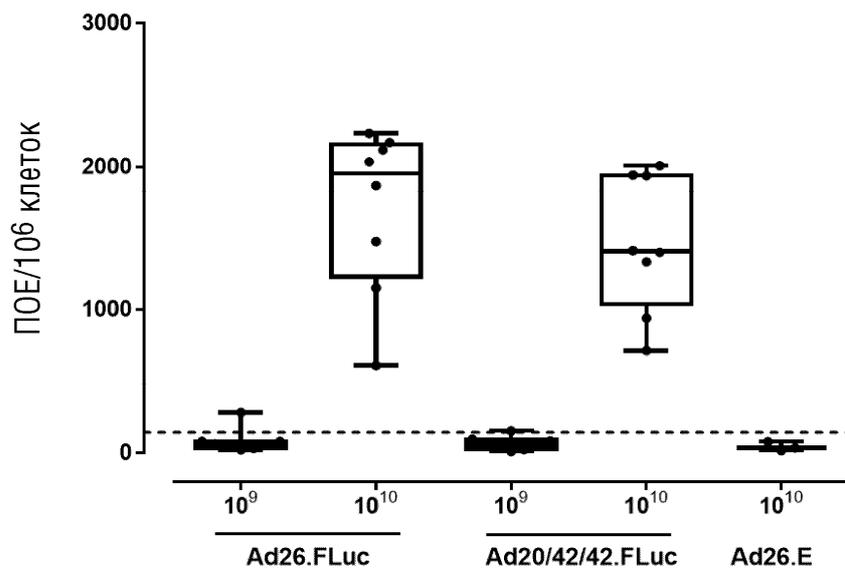
Фиг. 5



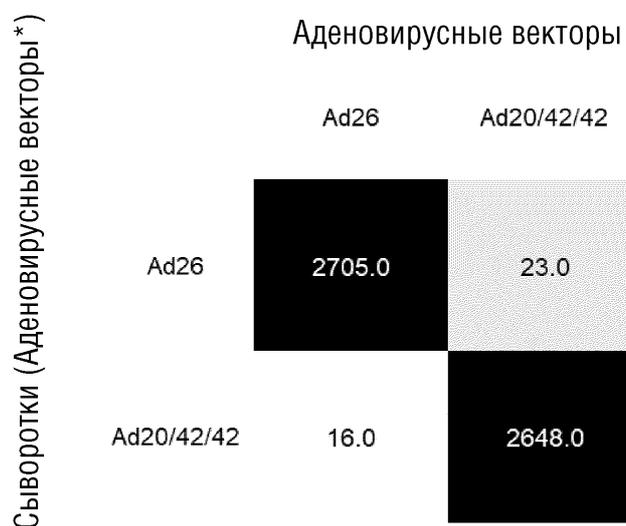
Фиг. 6



Фиг. 7А



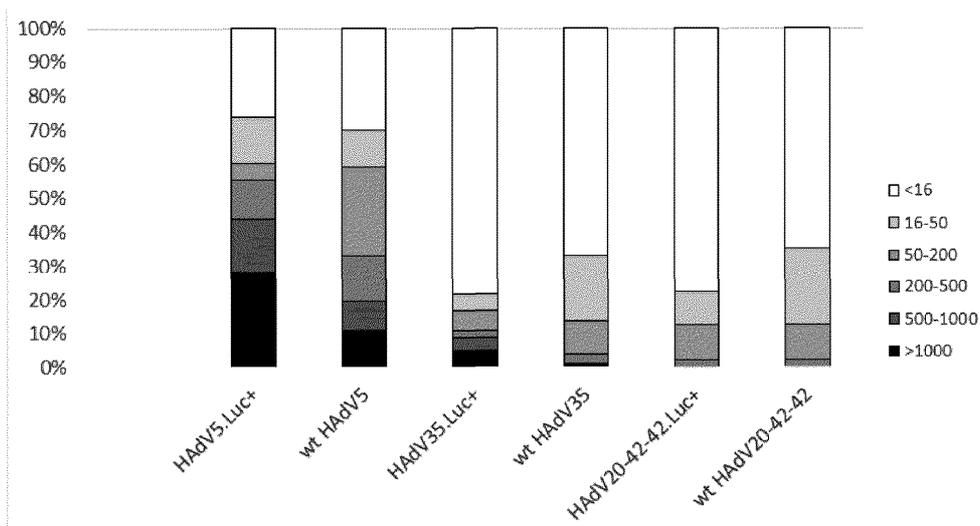
Фиг. 7B



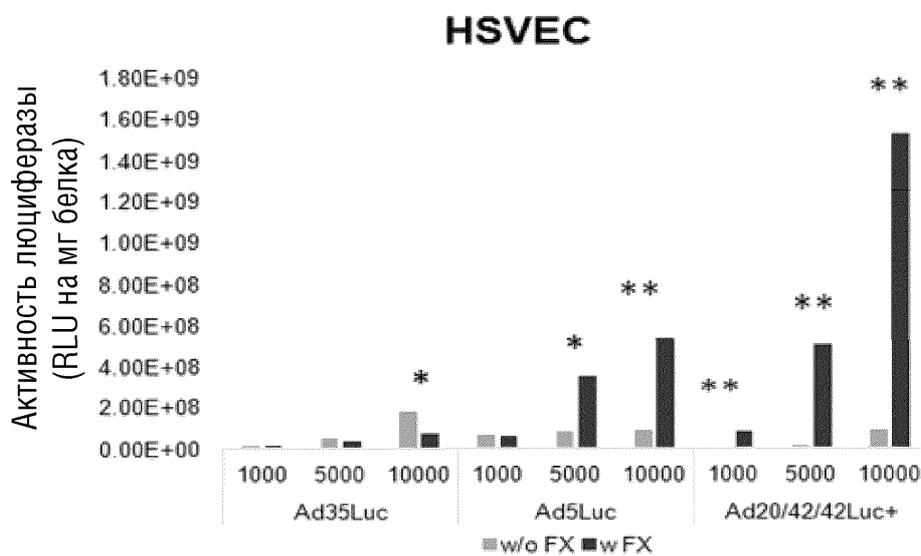
*сыворотки, собранные от мышей, иммунизированных указанным серотипом



Фиг. 8

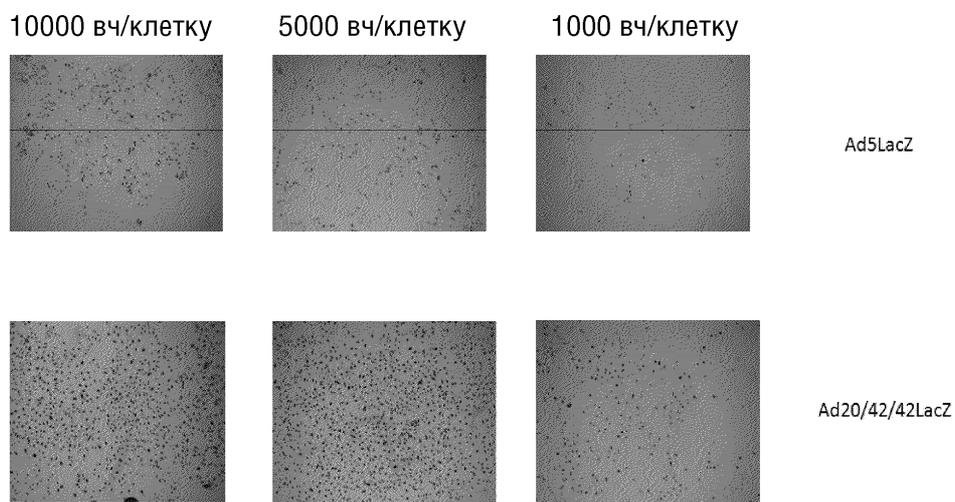


Фиг. 9



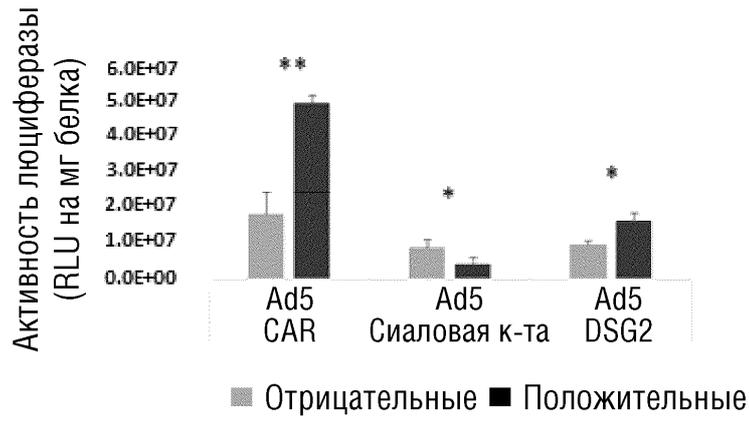
Фиг. 10

Окрашивание LacZ в HSVEC



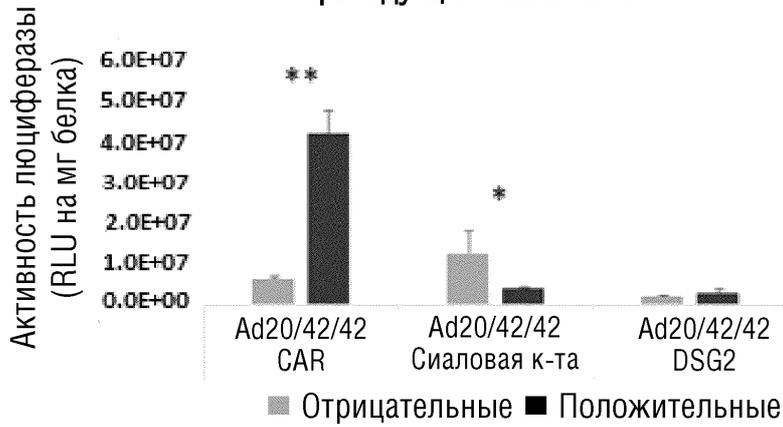
Фиг. 11

Трансдукция Ad5



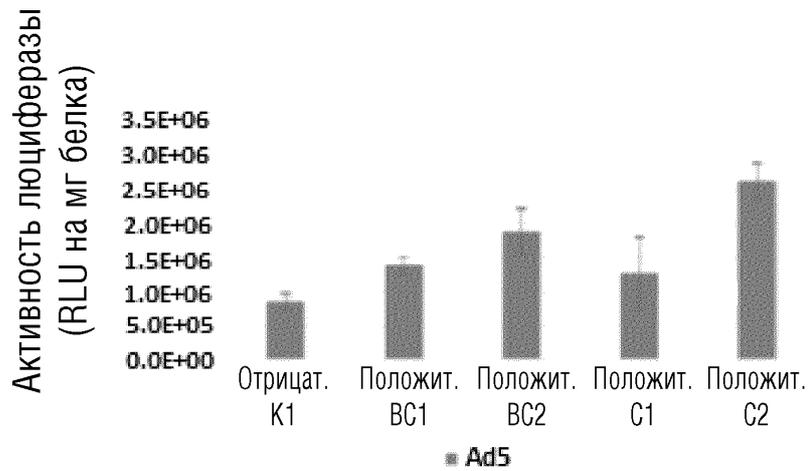
Фиг. 12А

Трансдукция Ad20/42/42



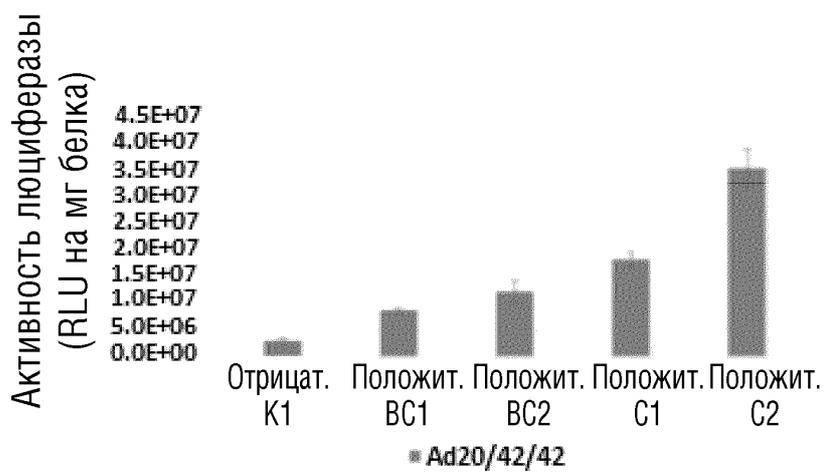
Фиг. 12В

Трансдукция Ad5

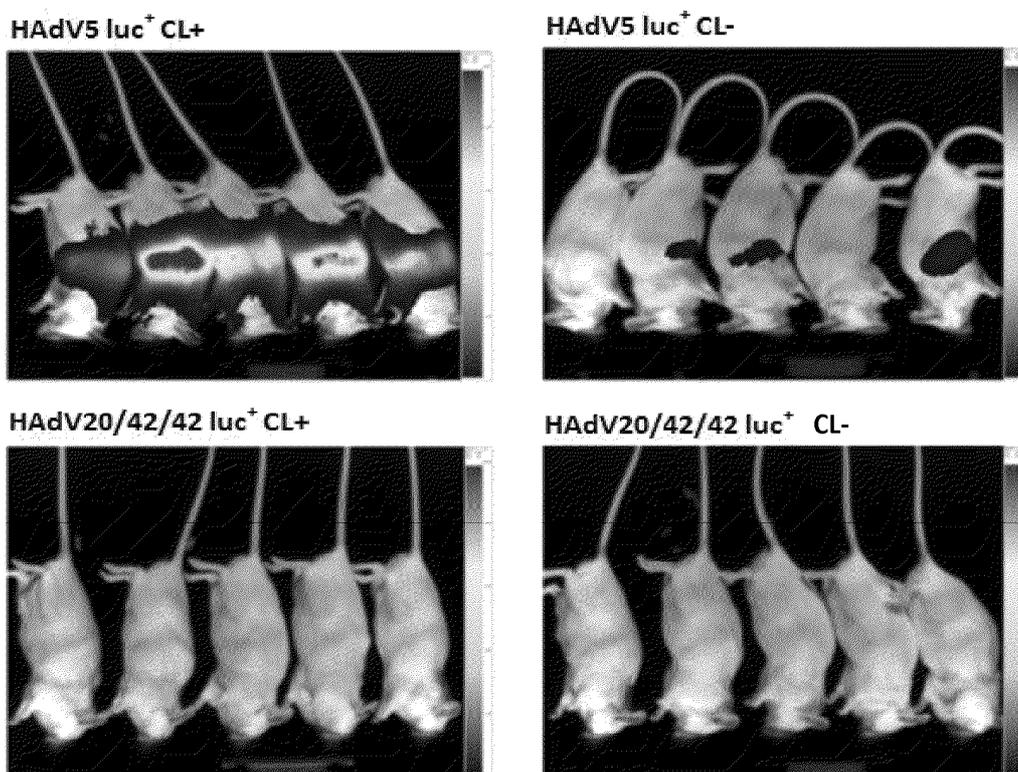


Фиг. 12С

Трансдукция Ad20/42/42

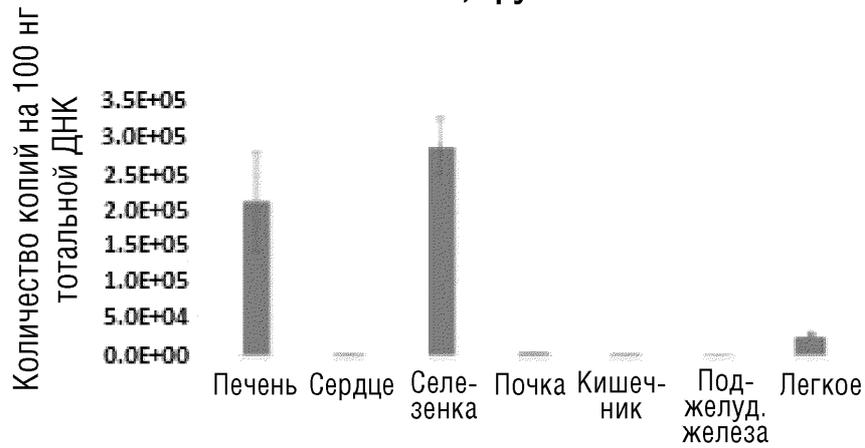


Фиг. 12D



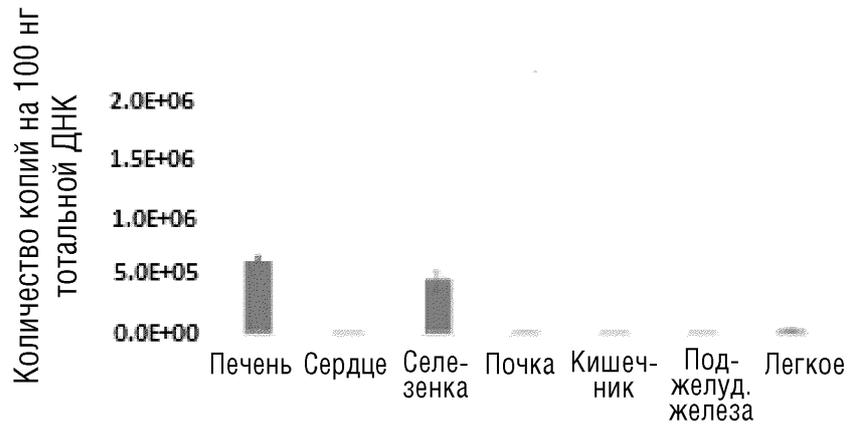
Фиг. 13

Ad5 CL-, группа 1



Фиг. 14А

Ad5 CL+, группа 4



Фиг. 14В

Ad20/42/42 CL-, группа 1



Фиг. 14С

Ad20/42/42 CL+, группа 4



Фиг. 14D

