

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091829** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.09.25**

(51) Int. Cl. **C07K 16/10** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.31**

---

(54) **КОНСТРУКТЫ АНТИТЕЛ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА**

---

(31) **62/624,320; 62/749,580**

(32) **2018.01.31; 2018.10.23**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/015975**

(87) **WO 2019/152600 2019.08.08**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ УИСТАР ИНСТИТЮТ ОФ  
ЭНЭТОМИ ЭНД БАЙОЛОДЖИ;  
ИНОВИО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Уэйнер Дэвид, Мутхумани Кар, Чэнь  
Цзин, Смит Тревор, Шультеис Кэтрин  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В настоящем документе раскрыта композиция, включающая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против антигена респираторно-синцитиального вируса. В настоящем документе также раскрывается способ генерирования синтетического антитела у субъекта путем введения композиции субъекту. В раскрытии также предложен способ предотвращения и/или лечения респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у субъекта с использованием указанной композиции и способа генерации.

---

**202091829**

**A1**

**A1**

**202091829**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564230EA/061

### КОНСТРУКТЫ АНТИТЕЛ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты для генерирования одного или более синтетических антител и их функциональных фрагментов *in vivo*, и к способу профилактики и/или лечения вирусной инфекции у субъекта путем введения указанной композиции.

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Этой заявкой испрашивается приоритет относительно предварительной заявки США № 62/624320, поданной 31 января 2018 года, и предварительной заявки США № 62/749580, поданной 23 октября 2018 года, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) представляет собой серьезную угрозу для здоровья маленьких детей и пожилых людей, так как осложнения, связанные с инфекциями нижних дыхательных путей, могут привести к госпитализации и даже смерти от данной болезни некоторых пациентов. Почти все мировое население заражается вирусом в течение первых лет жизни, при этом иммунитет во многих случаях не вырабатывается или не полностью защищает от последующих инфицирований. При том, что необходимая вакцина от данного вируса еще не создана, пассивная иммунизация иммунопрофилактическим анти-РСВ-F-антителом (павилизумабом) успешно сократила количество госпитализаций уязвимых пациентов. Однако, использование данного моноклонального антитела (mAb) ограничено необходимостью наличия больших ресурсов и недоступно для большинства групп населения с высоким уровнем риска.

При том, что была доказана эффективность mAb в обеспечении защиты от многих инфекционных заболеваний, их широкое использование ограничено. Ограниченный период полувыведения *in vivo* означает, что для поддержания иммунитета требуются многократные дозы, а высокая стоимость и сложности, связанные с разработкой, изготовлением и распространением, также препятствуют их глобальному использованию. В ответ на это, разрабатываются новые стратегии, основанные на доставке генов антител *in vivo*. Одной из таких платформ является dMAb, синтетическое ДНК- кодируемое mAb, доставляемое посредством электрогенетрансфера *in vivo* и использующее собственные мышечные клетки организма для генерации и секреции белка иммуноглобулина. В отличие от препаратов на основе белка, плазмидная ДНК недорога в производстве, а из-за ее температурной устойчивости ей не требуется холодовая цепь, что делает ее идеальной для глобального распространения. В исследованиях проверки и подтверждения принципа

действия на доклинических моделях животных, эта платформа обеспечивала защиту от различных инфекционных заболеваний, включая грипп, псевдомонаду и лихорадку Эбола.

Таким образом, в данной области техники существует потребность в улучшенных терапевтических средствах, которые предотвращают и/или лечат инфекцию РСВ. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность.

#### РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей одно или более синтетических антител, отличающихся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из а) нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело против респираторного синцитиального вируса (РСВ); б) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент синтетического антитела против РСВ; в) нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело ScFv против РСВ ; и г) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент синтетического антитела ScFv против РСВ. В одном варианте воплощения, изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей ScFv против DMAb РСВ, или ее фрагменту или варианту. В одном варианте воплощения, изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против РСВ, или его фрагмент или вариант.

В одном варианте воплощения изобретения, синтетическое антитело связывается с антигеном РСВ. В одном варианте воплощения изобретения, синтетическое антитело связывается с одним или более антигенами РСВ, выбранными из РСВ-F, РСВ-G, РСВ-Ga, РСВ-Gb, РСВ-M2-1, РСВ M2-2 и любой их комбинации.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID № 7, и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID №: 1-6; или фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID № 7 и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID № 1-6, или фрагмент нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный SEQ ID № 1-6.

В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность кодирует лидерную последовательность.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит вектор экспрессии.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к композиции, содержащей

молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. В одном варианте воплощения изобретения, композиция содержит фармацевтически приемлемый наполнитель. В одном варианте воплощения изобретения, композиция содержит гиалуронидазу.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к моноклональному антителу против РСВ. В одном варианте воплощения изобретения, моноклональное антитело против РСВ включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID № 7, и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID №: 1-6; или фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID № 7 и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к препарату, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты согласно изобретению. В одном варианте воплощения изобретения, препарат содержит гиалуронидазу.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к способу предотвращения или лечения заболевания у субъекта. В одном варианте воплощения изобретения, способ включает применение к субъекту молекулы нуклеиновой кислоты, композиции, препарата или анти-РСВ моноклонального антитела. В одном варианте воплощения изобретения, заболевание представляет собой респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1, содержащей Фигуры с 1А по 1D, изображена конструкция и тестирование *in-vitro* конструктора sc-Fv-Fc РСВ-FdMAb: на Фигуре 1А показана иллюстрация формата человеческих IgG1 и scFv-Fc. Полные шарнирные и Fc-части молекулы сохраняются в формате scFv-Fc. Фигура 1В изображает плазмидную карту РСВ-F dMAb. Фигура 1С изображает экспрессию dMAb РСВ-F *in vitro*. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на 293 Т-клетках через 3 дня после трансфекции (DAPI - синий, РСВ-F dMAb - красный). На Фигуре 1С представлен анализ вестерн-блоттинга супернатанта клеточной культуры клеток НЕК293Т, трансфицированных dMAb РСВ-F *in vitro*, собранных через 3 дня (дорожка 1: IgG-РСВ dMAb, дорожка 2: sc-Fv-Fc РСВ-F dMAb).

На Фигуре 2, содержащей Фигуры 2А-2С, изображена платформа доставки *in vivo* РСВ-F dMAb. На Фигуре 2А изображена электропорация *in vivo*, облегчающая доставку dMAb в мышечную ткань, экспрессия миоцитов и секреция закодированного MAб. MAб распространяется системно. На Фигуре 2В показан пример экспрессии dMAb в миоцитах после доставки dMAb к большеберцовой мышце мыши (DAPI - синий, dMAb - зеленый). На Фигуре 2С показана сывороточная концентрация человеческого IgG после доставки dMAb, измеренная с помощью ELISA (+/- СЭМ, n=7).

На Фигуре 3, содержащей Фигуры 3А-3D, изображена платформа доставки *in vivo* РСВ-F dMAb у мышей линии Balb/c. Плазмиду dMAb РСВ-F вводили мышам линии

Valb/c в бедренную мышцу. Образцы сыворотки были взяты на 7 день после лечения. На Фигуре 3А показана экспрессия РСВ-F dMAb в сыворотке. Sc-Fv-Fc конструктор (+/- СПСВ, n=5-8). Фигура 3В изображает связывание антигена РСВ-F с dMAb. Сигнал связывания РСВ-F образцов сыворотки (+/- СПСВ, n=4). На Фигуре 3С показана нейтрализация вируса РСВ-А. Титр нейтрализации (разбавление сыворотки  $\log_2$  на 60%, уменьшение образования бляшек; +/- СПСВ, n=3-11, пунктирная линия указывает на лимит детекции при разведении сыворотки 1/20). На Фигуре 3D показана концентрация sc-Fv-Fc. РСВ-F dMAb в образцах бронхоальвеолярного лаважа через 7 дней после доставки пДНК РСВ-dMAb (моль sc-Fv-Fc dMAb на грамм общего белка в образце лаважа).

На Фигуре 4, содержащей Фигуры 4А-4D, показана характеристика РСВ-F dMAb у хлопковых крыс. На Фигуре 4А показана локальная экспрессия dMAb, продемонстрированная иммунофлуоресцентным окрашиванием dMAb РСВ-F в мышечной ткани ТА хлопковых крыс через 7 дней после доставки пДНК dMAb РСВ-F к участку ткани (DAPI - синий; РСМА-F dMAb - зеленый; сечение перпендикулярно миоцитам). На Фигуре 4В показаны уровни dMAb РСВ-F (нг/мл), измеренные в течение 39 дней после внутримышечного введения 800 мкг dMAb-плазмиды (+/- СПСВ, n=5). На Фигуре 4С показана функция нейтрализации вируса, экспрессирующего РСВ-F dMAb *in vivo*. Образцы сыворотки собирали и тестировали через 7 дней после доставки 2,4 мг sc-Fv-Fc dMAb-пDNA: нейтрализующий титр (+/- СПСВ, пунктирная линия указывает на лимит детекции при разведении сыворотки 1/20). На Фигуре 4D показана концентрация dMAb РСВ-F в образцах БАЛ у обработанных хлопковых крыс. На Фигуре 4D показана концентрация dMAb РСВ-F в образцах бронхоальвеолярного лаважа у подопытных хлопковых крыс.

На Фигуре 5, включающей Фигуры 5А-5D, изображены экспериментальные результаты, демонстрирующие, что dMAb РСВ-F обеспечивает защиту от заболеваний нижних дыхательных путей у зараженных живыми вирусами хлопковых крыс. На Фигуре 5А показана схема исследования заражения хлопковых крыс: животным давали 2,4 мг РСВ-dMAb за 7 дней до заражения и вводили внутримышечно 15 мг/кг паливизумаба за 1 день до заражения. На Фигуре 5В показана вирусная нагрузка ткани легких хлопковых крыс (БОЕ/г), собранной через 5 дней после интраназального заражения живым вирусом РСВ/А/long (+/- СПСВ, n=4-5). На Фигуре 5С показаны уровни мРНК РСВ ( $\log_2$  и нормализованного по бета-актину) ткани легких хлопковых крыс через 5 дней после интраназального заражения живым вирусом РСВ/А/long (+/- SEM, n=4-5, непараметрический критерий Стьюдента с поправкой Манна-Уитни:  $p$  (без лечения в сравнении с РСВ-dMAb) = 0,0159;  $p$  (без лечения в сравнении с паливизумабом) = 0,0079). На Фигуре 5D показаны сывороточные уровни dMAb паливизумаба и sc-Fv-Fc РСВ-F у хлопковых крыс в день заражения (день 7) и через 5 дней после заражения (+/- СПСВ, n=4-5).

На Фигуре 6 представлены результаты экспериментов, демонстрирующие кинетику экспрессии РСВ DMAbs.

На Фигуре 7 показаны экспериментальные результаты, демонстрирующие пиковую экспрессию РСВ-DMAbs.

Фигура 8 изображает экспериментальные результаты, демонстрирующие количество DMAb в образцах бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ).

На Фигуре 9 изображены экспериментальные результаты, демонстрирующие связывание РСВ-F.

Фигура 10 изображает экспериментальные результаты, демонстрирующие нейтрализацию.

На Фигуре 11 показаны экспериментальные результаты, демонстрирующие РСВ-DMAb у хлопковых крыс.

На Фигуре 12 представлены экспериментальные результаты, демонстрирующие пиковую экспрессию и функциональность человеческого sc-Fv анти-РСВ у иммунокомпетентных мышей. Мышам линии balb/c водили 200 мкг человеческого sc-Fv анти-РСВ dMAb в бедренную мышцу. Доставка осуществлялась при помощи CELLECTRA-3P®. Средняя сывороточная экспрессия 13200 нг/мл белка человеческого sc-Fv была достигнута через 7 дней после введения. Экспрессированные *in vivo* человеческие sc-Fv связываются с антигеном РСВ-F. Сыворотка обработанных мышей проявляет живую нейтрализующую активность вируса РСВ-A, что было показано благодаря анализу уменьшения бляшек *in vitro*, результаты которого в среднем составляют 6,9 log реципиента. Нейтрализационный титр человеческого sc-Fv присутствует в легких обработанных мышей со средней концентрацией 1,1 нг человеческого sc-Fv на мкг общего белка в бронхоальвеолярном лаваже (BAL).

Фигура 13 изображает экспериментальные результаты, демонстрирующие сохраненную экспрессию sc-Fv человека у хлопковых крыс. 100 мкг (синего цвета) и 800 мкг (зеленого цвета) человеческого sc-Fv доставляли в мышцу ТА хлопковых крыс. Доставку осуществляли с помощью CELLECTRA-3P®. Пиковая экспрессия в сыворотке крови достигается через 7 дней (226 нг/мл и 1353 нг /мл, соответственно).

Фигура 14 изображает экспериментальные результаты, демонстрирующие пиковую экспрессию и функциональность человеческого sc-Fv у хлопковых крыс. Доставка с помощью CELLECTRA-3P® 2,4 мг человеческого sc-Fv в бедренную мышцу хлопковых крыс привела к экспрессии в сыворотке крови, в среднем, 7030 нг/мл на 7 день. Сыворотка обработанных хлопковых крыс нейтрализуется в реакции нейтрализации бляшкообразования *in vitro* я в среднем со значением нейтрализованного титра реципиента 5,4 log.

На Фигуре 15 изображена платформа РСВ-dMAb.

На Фигуре 16 показаны экспериментальные результаты, демонстрирующие, что РСВ dMAb защищает хлопковую крысу от инфекции нижних дыхательных путей после заражения РСВ/A.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим рекомбинантную

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Композицию можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, для облегчения экспрессии *in vivo* и образования синтетического антитела.

В частности, полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи, экспрессируемые из последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот, могут собираться в синтетическое антитело. Полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом таким образом, что их сборка приводит к связыванию антигена синтетическим антителом, приобретению иммуногенных свойств по сравнению с антителом без сборки, как описано в данном изобретении, и приобретению способности вызывать или индуцировать иммунный ответ против антигена.

Кроме того, данные синтетические антитела вырабатываются у субъекта быстрее, чем антитела, которые вырабатываются в результате антиген-индуцированного иммунного ответа. Синтетические антитела способны эффективно связывать и нейтрализовать целый ряд антигенов. Синтетические антитела также способны эффективно защищать от болезней и/или способствовать повышению выживаемости при заболевании.

#### 1. Определения

Все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно известно специалистам в данной области техники, если не указано иное. В случае конфликта, настоящий документ, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, однако способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, так же могут использоваться на практике или при тестировании настоящего изобретения. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки во всей их полноте. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения.

Термины «содержит (ат)», «включает (ют)», «имеющий», «имеет (ют)», «могут», «состоит (ят)» и их варианты, в контексте данного документа, являются неограничивающими переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможных дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают множественные варианты, кроме случаев, когда контекст явно указывает иное. В настоящем раскрытии изобретения также рассматриваются другие варианты воплощения изобретения, «содержащие», «состоящие из» и «состоящие, по существу, из» представленных в данном документе вариантов воплощения или элементов, независимо от того, изложены они явно или нет.

«Антитело» означает антитело, принадлежащее к классам IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или его фрагменты, или производные, включая Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и одноцепочечные антитела и их производные. Антитело может быть антителом, выделенным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, аффинно-очищенным

антителом или любой их смесью, которая проявляет достаточную специфичность связывания с желаемым эпитопом или полученной из него последовательностью.

Термины «фрагмент антитела» или «антительный фрагмент», в контексте данного документа, используются взаимозаменяемо и относятся к части интактного антитела, содержащей антигенсвязывающий сайт или переменную область. Эта часть не включает константные домены тяжелой цепи (то есть CH2, CH3 или CH4, в зависимости от изотипа антитела) области Fc интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты Fab'-SH, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатела, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи, и одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR: переменной области тяжелой цепи, но, не ограничиваясь ими.

«Антиген» относится к белкам, обладающим способностью генерировать иммунный ответ у хозяина. Антиген может быть распознан и связан антителом. Антиген может происходить из организма или из внешней среды.

«CDRы» обозначает определяющие комплементарность области аминокислотных последовательностей антитела, которые представляют собой гиперпеременные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. See, e.g., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). В переменной части иммуноглобулина имеются три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи (или области CDR). Таким образом, термин «CDR», в контексте данного документа, относится ко всем трем CDR тяжелой цепи или всем трем CDR легкой цепи (или как ко всем CDR тяжелой цепи, так и ко всем CDR легкой цепи, если это необходимо). Структура и сворачивание белка антитела могут означать, что другие остатки считаются частью антигенсвязывающей области и должны быть понятны специалисту в данной области техники. См., например, Chothia et al., (1989) *Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*; *Nature* 342, p 877-883.

В контексте данного документа, термины «кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота» могут относиться к нуклеиновой кислоте (молекуле РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодированная последовательность так же может включать ДНК последовательность, кодирующую последовательность РНК. Кодированная последовательность может дополнительно включать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая сигнал промотора и полиаденилирования, способный направлять экспрессию в клетках индивидуума или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту. Кодированная последовательность может дополнительно содержать последовательности, кодирующие сигнальные пептиды.

Термины «комплементарный» или «комплементарность», в контексте данного документа, означают, что нуклеиновая кислота может образовывать пары с другими нуклеиновыми кислотами, нуклеотидными аналогами или молекулами по правилу Уотсона-Крика (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстина.

Термин «постоянный ток», в контексте данного документа, описывает ток, который воспринимается или которому подвергается ткань или клетки, определяющие указанную ткань, в течение времени воздействия электрического импульса, доставляемого в ту же ткань. Электрический импульс подается от устройств электропорации, описанных в данном документе. Указанный ток подается с постоянной плотностью в указанную ткань в течение всего времени воздействия электрического импульса, поскольку устройство для электропорации, описанное в настоящем документе, обладает возможностью обратной связи, которая, предпочтительно, должна быть мгновенной. Элемент обратной связи может измерять сопротивление ткани (или клеток) на протяжении всего времени воздействия импульса и вызывать соответствующие изменения выходной электрической мощности устройства электропорации (например, увеличивать напряжение) таким образом, чтобы плотность тока в одной и той же ткани оставалась постоянной на протяжении всего времени воздействия электрического импульса (порядка микросекунд) и от импульса к импульсу. В некоторых вариантах воплощения изобретения, элемент обратной связи содержит контроллер.

Термины «обратная связь по току» или «обратная связь», в контексте данного документа, могут использоваться взаимозаменяемо и могут означать активную реакцию представленных устройств электропорации, которая включает в себя измерение плотности тока в ткани между электродами и соответствующее изменение уровня мощности, подаваемого устройством ЭП для поддержания плотности тока на постоянном уровне. Этот постоянный уровень задается пользователем до начала импульсного режима или электрической обработки. Обратная связь может быть обеспечена компонентом электропоратора, например, контроллером, поскольку его электрическая цепь способна непрерывно контролировать плотность тока в ткани между электродами, сравнивать этот контролируемый ток (или ток в ткани) с заданным током и непрерывно производить корректировку уровня выходной мощности для поддержания контролируемого тока на заданных уровнях. Цикл обратной связи может быть мгновенным, поскольку он представляет собой аналоговую обратную связь замкнутого контура.

Термин «децентрализованный ток», в контексте данного документа, может означать паттерн электрических токов, подаваемых из различных массивов игольчатых электродов электропораторов, описанных в данном документе, при которых паттерны минимизируют или, предпочтительно, устраняют возникновение теплового напряжения, связанного с электропорацией, в любой области электропорлируемой ткани.

Термины «электропорация», «электропермеабилитация» или «электрокинетическое усиление» («ЭП»), в контексте данного документа, используются взаимозаменяемо и означают использование трансмембранного импульса электрического поля для индукции

микроскопических отверстий (пор) в биомембране; их присутствие позволяет таким биомолекулам, как плазмиды, олигонуклеотиды, мРНК, лекарства, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

«Эндогенное антитело», в контексте данного документа, может относиться к антителу, вырабатываемому субъектом, которому вводят эффективную дозу антигена для индукции гуморального иммунного ответа.

«Механизм обратной связи», в контексте данного документа, может относиться к процессу, выполняемому программным или аппаратным обеспечением (или программно-аппаратным обеспечением), в процессе которого получают и сравнивают импеданс желаемой ткани (до, во время и/или после воздействия импульса энергии) с текущим значением, предпочтительно, ток, и корректирует уровень мощности, подаваемой для достижения заданного значения. Механизм обратной связи может быть выполнен как аналоговый замкнутый контур.

«Фрагмент» может означать функциональный полипептидный фрагмент антитела, который может связываться с необходимой мишенью и имеет такой же необходимый эффект, как и целое антитело. Фрагмент антитела может быть на 100% идентичен полной длине, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты на N- или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами или без них и/или с метионином в положении 1. Фрагменты могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов от полной длины исходной нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Фрагмент может содержать фрагмент полипептида, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичен антителу и дополнительно содержит N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть связаны с фрагментом антитела.

Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты может быть на 100% идентичен полной длине, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида на 5' или 3' конце, в каждом случае с последовательностями или без них, кодирующими сигнальный пептид или метионин в положении 1. Фрагменты могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99%

или более процентов от полной длины исходной кодирующей последовательности, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Фрагмент может содержать фрагмент, кодирующий полипептид, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичен антителу и дополнительно, но не обязательно, содержит последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно последовательности, кодирующие N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например сигнальный пептид IgE или IgG. Последовательности, кодирующие N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, могут быть связаны с фрагментом кодирующей последовательности.

В контексте данного документа, термин «генетический конструкт» относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, такой как антитело. Генетический конструкт так же может относиться к молекуле ДНК, которая транскрибирует РНК. Кодирующая последовательность включает сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая сигнал промотора и полиаденилирования, способный направлять экспрессию в клетках индивидуума, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. В контексте данного документа, термин «экспрессируемая форма» относится к генетическим конструктам, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, кодирующей белок, таким образом, чтобы при наличии в клетке индивидуума кодирующей последовательности, она экспрессировалась.

В контексте данного документа, термины «идентичный» или «идентичность», относительно двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, означают, что последовательности имеют определенный процент остатков, одинаковых в указанной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в указанной области, определения количества позиций, в которых одинаковый остаток встречается в обеих последовательностях для получения количества совпадающих позиций, деления количества совпавших позиций на общее количество позиций в указанной области и умножение результата на 100 для получения процента идентичности последовательности. В тех случаях, когда две последовательности имеют разную длину, либо выравнивание приводит к одному или более ступенчатым разрывам и указанная область сравнения включает только одну последовательность, при вычислении, остатки одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель. При сравнении ДНК и РНК тимин (T) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентификация может быть выполнена вручную или с помощью компьютерного алгоритма для последовательности, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Термин «импеданс», в контексте данного документа, может использоваться при

рассмотрении в деталях механизма обратной связи соответственно с законом Ома и может быть преобразован в ток.

«Иммунный ответ», в контексте данного документа, означает активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на введение антигена. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа, или в обеих формах

Термины «нуклеиновая кислота» или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид», в контексте данного документа, означают, что по меньшей мере два нуклеотида ковалентно связаны друг с другом. Изображение одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь изображенной одиночной цепи. Многие варианты нуклеиновой кислоты могут быть использованы для той же цели, что и приведенная нуклеиновая кислота. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает идентичные, по существу, нуклеиновые кислоты и их дополнения. Одиночная цепь также включает зонд, который может гибридизоваться с последовательностью-мишенью при жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, или могут содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, как геномной, так и кДНК, РНК или гибридной, где нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты могут быть получены методами химического синтеза или рекомбинантными методами.

«Функционально связанный», в контексте данного документа, означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен на 5'-(восходящий) или 3'-(нисходящий) конце подконтрольного гена. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между этим промотором и геном, который он контролирует и откуда происходит. Как уже известно в данной области техники, изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери функции промотора.

Термины «пептид», «белок» или «полипептид», в контексте данного документа, могут означать связанную последовательность аминокислот и могут быть природными, синтетическими или модифицированными, или комбинированными из природных и синтетических.

«Промотор», в контексте данного документа, означает синтетическую или полученную в природе молекулу, которая способна придавать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических регуляторных транскрипционных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор также может

содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут находиться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от стартового сайта транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включая вирусные, бактериальные, грибковые, растительные, насекомые и животные. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференциально по отношению к клетке, ткани или органу, в котором происходит экспрессия, или относительно стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или возбуждающие агенты. Типичные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор PCV-LTR, промотор CMV IE, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор CMV IE.

«Сигнальный пептид» и «лидерная последовательность», в контексте данного документа, используются взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть связана с аминокислотной группой на конце белка, изложенного в данном документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности обычно направляют локализацию белка. Используемые в данном изобретении сигнальные пептиды/лидерные последовательности оптимально облегчают секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется. При секреции из клетки, сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остатка белка, обычно называемого зрелым белком. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности связаны с N-концом белка.

«Жесткие условия гибридизации», в контексте данного документа, означают условия, при которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизоваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью) в сложной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Жесткие условия могут быть выбраны приблизительно на 5-10°C ниже, чем температура плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности при определенном pH ионной силы.  $T_m$  может быть температурой (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеинов), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесии (так как последовательности мишени присутствуют в избытке, при  $T_m$ , 50% зондов равновесно связаны). При жестких условиях концентрация соли может составлять менее чем приблизительно 1,0 М иона натрия, например, концентрация приблизительно 0,01-1,0 М иона натрия (или других солей) при pH 7,0-8,3, и температура не менее чем мере приблизительно 30 ° C для коротких зондов (например, приблизительно 10-50 нуклеотидов) и, не менее чем приблизительно 60 ° C для длинных зондов (например, больше, чем приблизительно 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты благодаря добавлению дестабилизирующих агентов, таких как формамид. При селективной или специфической гибридизации, положительный сигнал может по меньшей мере в 2-10 раз превышать фоновую гибридизацию. Примерные

жесткие условия гибридизации включают следующие: 50% формамид, 5х стандартный солевой раствор и 1% СДС, инкубирование при 42°C или 5х стандартный солевой раствор, 1% СДС, инкубирование при 65 °С, с отмывкой в 0,2х стандартном солевом растворе и 0,1% СДС при 65 °С.

Термины «субъект» и «пациент» в данном описании используются взаимозаменяемо и могут относиться к любым позвоночным животным, включая млекопитающих (например, корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяки, морская свинка, кошка, собака, крыса и мышь, низший примат(например, обезьяна, такая как циномоугус или резус), шимпанзе и т. д. и человек). В некоторых вариантах воплощения, субъект может быть или не быть человеком. Субъект или пациент могут проходить другие формы лечения.

Термин «существенно комплементарный», в контексте данного документа, означает, что первая последовательность составляет по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности комплементу второй последовательности, покрывая участок из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизуются в жестких условиях гибридизации.

Термин «существенно идентичный», в контексте данного документа, означает, что первая и вторая последовательности составляют по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 90%, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности, покрывая участок из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов или аминокислот или по отношению к нуклеиновым кислотам, если первая последовательность является, по существу, комплементарной комплементу второй последовательности.

Синтетическое антитело», в контексте данного документа, относится к антителу, которое кодируется рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, и генерируется у субъекта.

Термины «лечить», «лечение», в контексте данного документа, могут означать защиту животного от заболевания посредством средств предотвращения, подавления, угнетения или полного устранения заболевания. Профилактика заболевания включает введение вакцины, описанной в настоящем изобретении, животному до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение вакцины, описанной в настоящем изобретении, животному после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Подавление заболевания включает введение вакцины, описанной в настоящем изобретении, животному после клинического проявления заболевания.

Термин «вариант», по отношению к нуклеиновой кислоте, в контексте данного документа, означает (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент эталонной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii)

нуклеиновую кислоту, которая существенно идентична указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементом или последовательностью, существенно ей идентичной.

Термин «вариант», по отношению к пептиду или полипептиду, в контексте данного документа, означает пептид или полипептид, отличающийся по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая существенно идентична эталонному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативное замещение аминокислоты, то есть замена аминокислоты другой аминокислотой со схожими свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), как известно, в данной области техники обычно включает незначительные изменения. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, частично, с учетом гидропатического индекса аминокислот, что известно в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Гидропатический индекс аминокислоты основан на учете ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с подобными гидропатическими индексами могут быть замещены друг другом с одновременным сохранением функции белка. В одном аспекте, аминокислоты, имеющие гидропатические индексы  $\pm 2$ , являются замещенными. Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замещений с сохранением биологической функции. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным оценочным критерием, который, как упоминалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101, полностью включенный в данный документ в качестве ссылки. Замена аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может привести к сохранению пептидами биологической активности, например иммуногенности, подразумеваемой данной областью техники. Для замены можно использовать аминокислоты, имеющие значения гидрофильности в пределах  $\pm 2$  друг для друга. На индекс гидрофобности и значение гидрофильности аминокислот влияет определенная боковая цепь этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением считается, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, от боковых цепей этих аминокислот, что проявляется в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах.

Вариант может быть последовательностью нуклеиновой кислоты, которая практически идентична по всей длине полной последовательности гена или ее фрагмента. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична по всей длине генной

последовательности или ее фрагмента. Вариант может быть аминокислотной последовательностью, которая существенно идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента. Аминокислотная последовательность может быть на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 95 96, 97, 98, 99 или 100% идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

Термин «вектор», в контексте данного документа, означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую источник репликации. Вектор может быть вирусным вектором, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или дрожжевой искусственной хромосомой. Вектор может быть вектором ДНК или РНК. Вектор может быть самореплицирующимся внехромосомным вектором или вектором, интегрированным в геном хозяина.

При использовании в данном документе числовых диапазонов, предусматриваются все промежуточные числа диапазона с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона чисел 6-9, числа 7 и 8 рассматриваются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 подразумеваются числа 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9 и 7,0.

## 2. Композиция

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. При введении субъекту, нуждающемуся в этом, композиция может приводить к образованию синтетического антитела у субъекта. Синтетическое антитело может связывать молекулу-мишень (то есть антиген), присутствующую у субъекта. Такое связывание может нейтрализовать антиген, блокировать распознавание антигена другой молекулой, например, белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на антиген.

В одном варианте воплощения, композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическое антитело. В одном варианте воплощения изобретения, композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первое синтетическое антитело, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второе синтетическое антитело. В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело против респираторного синцитиального вируса (анти-РСВ).

В одном варианте воплощения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-РСВ антитело, содержит одну или более оптимизированных по кодонам последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности, кодируемой одним из SEQ ID № 1-6, или фрагмент аминокислотной

последовательности, который по меньшей мере на 90% гомологичен аминокислотной последовательности, кодируемой одним из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более оптимизированных по кодонам последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична SEQ ID №7, или фрагмент аминокислотной последовательности, который является, по крайней мере, на 90% гомологичен SEQ ID №7. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих аминокислотную последовательность, кодируемую одной из SEQ ID № 1-6, или фрагмент аминокислотной последовательности, кодируемый одной из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих SEQ ID №7, или фрагмент SEQ ID №7.

В одном варианте воплощения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей РНК, транскрибированных с одной или более последовательностями ДНК, кодирующими аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности, кодируемой одним из SEQ ID № 1-6 или фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей РНК, транскрибированных с одной или более последовательностями ДНК, кодирующими аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична SEQ ID №7 или фрагменту SEQ ID № 7. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей РНК, транскрибированных с одной или более последовательностями ДНК, кодирующими аминокислотную последовательность, кодируемую одним из SEQ ID № 1-6, или фрагмент кодированной аминокислотной последовательности, кодируемый одной из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей РНК, транскрибированных с одной или более последовательностями ДНК, кодирующими аминокислотную последовательность из SEQ ID №7 или фрагмент из SEQ ID № 7.

В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более оптимизированных по кодомам последовательностей нуклеиновых кислот по меньшей мере на 90% гомологичных SEQ ID № 1-6, или фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на

90% гомологичный SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более оптимизированных по кодомам последовательностей нуклеиновых кислот, указанных в SEQ ID № 1-6, или фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, указанный в SEQ ID № 1-6.

В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более оптимизированных по кодомам последовательностей нуклеиновых кислот по меньшей мере на 90% гомологичных SEQ ID № 1-6, или фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90% гомологичный SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая анти-PCB антитело, содержит одну или более последовательностей РНК, транскрибированных с одной или более последовательностями ДНК, указанными в SEQ ID № 1-6, или фрагмент последовательности ДНК, указанный в SEQ ID № 1-6.

В одном варианте воплощения изобретения, композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическую тяжелую цепь РСВ. В одном варианте воплощения изобретения, композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическую легкую цепь РСВ. В одном варианте воплощения, композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическое антитело РСВ. В одном варианте воплощения, последовательность, кодирующая синтетическое антитело РСВ, содержит первую последовательность, кодирующую синтетическую тяжелую цепь РСВ, и вторую последовательность, кодирующую синтетическую легкую цепь РСВ.

Композиция, раскрытая в настоящем изобретении, может лечить, предотвращать и/или защищать от любого заболевания, расстройства или состояния, связанного с респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией. В определенных вариантах раскрытия изобретения, композиция может лечить, предотвращать и/или защищать от вирусной инфекции. В определенных вариантах воплощения изобретения, композиция может лечить, предотвращать и/или защищать от состояния, связанного с респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией.

Композиция может приводить к генерации синтетического антитела у субъекта в течение по меньшей мере приблизительно 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 20 часов, 25 часов, 30 часов, 35 часов, 40 часов, 45 часов, 50 часов или 60 часов после введения композиции субъекту. Композиция может приводить к образованию синтетического антитела у субъекта в течение по меньшей мере приблизительно 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней после введения композиции субъекту. Композиция может приводить к образованию синтетического антитела у субъекта в течение от приблизительно 1 часа до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 часа до

приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 часа до от приблизительно 2 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 дня, от приблизительно 1 часа до приблизительно 72 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 60 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 48 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 36 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 12 часов или от приблизительно 1 часа до приблизительно 6 часов после введения композиции субъекту.

При введении субъекту, нуждающемуся в этом, композиция может приводить к образованию синтетического антитела у субъекта быстрее, чем к образованию эндогенного антитела у субъекта, которому вводят антиген для индукции гуморального иммунного ответа. Композиция может приводить к образованию синтетического антитела по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней до образования эндогенного антитела у субъекта, которому вводили антиген для индукции гуморального иммунного ответа.

Композиция, согласно настоящему изобретению, может иметь свойства, предъявляемые к эффективным композициям, такие как безопасность, когда сама вакцина не должна вызывать заболевание или смерть; обеспечение простоты применения, небольшое количество побочных эффектов, биологическая стабильность и низкая стоимость дозы.

### 3. Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты

Как описано выше, композиция может содержать рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты. Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Более подробно, антитело описано ниже.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты. Такая оптимизация может повысить или изменить иммуногенность антитела. Оптимизация также может улучшить транскрипцию и/или трансляцию. Оптимизация может включать одно или более положений из перечисленных: лидерную последовательность с низким содержанием GC-пар для улучшения транскрипции; стабилизирование мРНК и оптимизацию кодонов; добавление последовательности Козак (например, GCC ACC) для улучшения трансляции; добавление лидерной последовательности иммуноглобулина (Ig), кодирующего сигнальный пептид; добавление внутренней последовательности IRES и исключение, насколько это возможно, мотивов цис-действующих последовательностей (то есть внутренних ТАТА-боксов).

Конструкт рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать один или более конструктов рекомбинантных последовательностей нуклеиновой кислоты. Конструкт рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более компонентов, описанных ниже.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид тяжелой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует сайт расщепления протеазой или пептидазой. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует внутренний сайт входа в рибосому (IRES). IRES может быть либо вирусным IRES, либо эукариотическим IRES. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать одну или более лидерных последовательностей, в которых каждая лидерная последовательность кодирует сигнальный пептид. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать в себя один или более промоторов, один или более интронов, одну или более областей терминации транскрипции, один или более кодонов инициации, один или более кодонов терминации или остановки и/или один или более сигналов полиаденилирования. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может включать одну или более последовательностей линкера или tag-последовательности. Последовательность tag может кодировать tag гемагглютинина (HA).

#### (1) Полипептиды тяжелой цепи

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид тяжелой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Полипептид тяжелой цепи может включать область варибельной тяжелой цепи (VH) и/или по меньшей мере одну область константной тяжелой цепи (CH). По меньшей мере одна константная область тяжелой цепи может включать константную область 1 тяжелой цепи (CH1), константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3) и/или шарнирную область.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, полипептид тяжелой цепи может включать область VH и область CH1. В других вариантах воплощения изобретения, полипептид тяжелой цепи может включать область VH, область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

Полипептид тяжелой цепи может включать набор областей, определяющих

комплементарность («CDR»). Набор CDR может содержать три гипервариабельные области области VH. Исходя из N-конца полипептида тяжелой цепи, эти CDR обозначены как «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептиды тяжелой цепи могут способствовать связыванию или распознаванию антигена.

#### (2) Полипептиды легкой цепи

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Полипептид легкой цепи может включать область вариабельной легкой цепи (VL) и/или по меньшей мере одну область константной легкой цепи (CL).

Полипептид легкой цепи может включать набор областей, определяющих комплементарность («CDR»). Набор CDR может содержать три гипервариабельные области VL области. Исходя из N-конца полипептида легкой цепи, эти CDR обозначены как «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептиды легкой цепи могут способствовать связыванию или распознаванию антигена.

#### (3) Сайт расщепления протеазой

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления протеазой. Сайт расщепления протеазой может быть распознан протеазой или пептидазой. Протеаза может представлять собой эндопептидазу или эндопротеазу, например, фурин, эластазу, HtrA, кальпаин, трипсин, химотрипсин, трипсин и пепсин, но, не ограничиваясь ими. Протеазой может быть фурин. В других вариантах воплощения изобретения, протеаза может представлять собой сериновую протеазу, треониновую протеазу, цистеиновую протеазу, аспартатпротеазу, металлопротеазу, протеазу глутаминовой кислоты или любую протеазу, которая расщепляет внутреннюю пептидную связь (т.е. не расщепляет N-концевую или C-концевую пептидную связь).

Сайт расщепления протеазой может включать одну или более аминокислотных последовательностей, которые способствуют или повышают эффективность расщепления. Одна или более аминокислотных последовательностей могут повышать или усиливать эффективность образования или генерации дискретных полипептидов. Одна или более аминокислотных последовательностей могут включать пептидную последовательность 2A.

#### (4) Линкерная последовательность

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать одну или более последовательностей линкера. Линкерная последовательность может пространственно разделять или связывать один или более компонентов, описанных в данном изобретении. В других вариантах воплощения изобретения, линкерная последовательность может кодировать аминокислотную последовательность, которая пространственно разделяет или связывает два или более полипептида.

#### (5) Промотор

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более промоторов. Одним или более промоторами может быть любой промотор, который способен управлять и регулировать экспрессию гена. Такой промотор представляет собой цис-действующий элемент последовательности, необходимый для транскрипции с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Выбор промотора, используемого для направления экспрессии гена, зависит от конкретного применения. Промотор может быть расположен приблизительно на таком же расстоянии как от начала транскрипции в конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, так и от сайта начала транскрипции в его естественной сборке. Однако, изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери функции промотора.

Промотор может быть функционально связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи. Промотор может представлять собой промотор с доказанной эффективностью экспрессии в эукариотических клетках. Промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью, может представлять собой промотор CMV, промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), такой как ранний промотор SV40 и поздний промотор SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор, такой как промотор длинного концевой повтора (LTR), вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса птичьего лейкоза (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как промотор немедленно-раннего ответа CMV, промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может быть промотором человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин, человеческий полиэдрин или человеческий металлотронеин.

Промотор может быть конститутивным промотором или индуцибельным промотором, который инициирует транскрипцию только тогда, когда на клетку-хозяина воздействует какой-то конкретный внешний стимул. В случае многоклеточного организма промотор также может быть специфичным для конкретной ткани или органа, или стадии развития. Промотор также может представлять собой тканеспецифичный промотор, такой как мышечный или кожный специфический промотор, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US 20040175727, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Промотор может быть связан с энхансером. Энхансер может быть расположен перед кодирующей последовательностью. Энхансером может быть человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или вирусный энхансер, такой как один из CMV, FMDV, RSV или EBV. Энхансеры полинуклеотидной функции описаны в патентах США № 5593972, 5962248 и WO 94/016737, содержание каждого из которых полностью включено а данное описание

посредством ссылки.

(6) Интрон

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более интронов. Каждый интрон может включать функциональные донорные и акцепторные сайты сплайсинга. Интрон может включать усилитель сплайсинга. Интрон может включать в себя один или более сигналов, необходимых для эффективного сплайсинга.

(7) Участок терминации транскрипции

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более участков терминации транскрипции. Участок терминации транскрипции может быть расположен ниже кодирующей последовательности для обеспечения эффективной терминации. Участок терминации транскрипции может быть получен из того же гена, что и промотор, описанный выше, или может быть получен из одного или более различных генов.

(8) Кодон инициации

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более кодонов инициации. Кодон инициации может быть расположен перед кодирующей последовательностью. Кодон инициации может быть расположен перед кодирующей последовательностью. Кодон инициации может быть связан с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной инициации трансляции, например, с сайтом связывания рибосомы, но, не ограничиваясь им.

(9) Кодон терминации

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более кодонов терминации. Кодон терминации может быть расположен перед кодирующей последовательностью. Кодон терминации может быть расположен перед кодирующей последовательностью. Кодон терминации может быть связан с одним или более сигналами, необходимыми для эффективного завершения терминации.

(10) Сигнал полиаденилирования

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более сигналов полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может включать в себя один или более сигналов, необходимых для эффективного полиаденилирования транскрипта. Сигнал полиаденилирования может быть расположен после кодирующей последовательности. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигнал полиаденилирования  $\beta$ -глобина человека. Сигнал полиаденилирования SV40 может быть сигналом полиаденилирования плазмиды pCER4 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния).

(11) Лидерная последовательность

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать одну или более лидерных последовательностей. Лидерная последовательность может кодировать сигнальный пептид. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина (Ig), например, сигнальным пептидом IgG и сигнальным пептидом IgE, но не ограничиваясь ими.

Расположение конструкта рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Как описано выше, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может включать одну или более конструкций рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, в которой каждая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более компонентов. Один или более компонентов подробно описаны выше. Один или более компонентов, в случае, когда они включены в конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, могут быть расположены в любом порядке относительно друг друга. В некоторых вариантах воплощения изобретения, один или более компонентов могут быть расположены в конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты так, как это описано ниже.

#### (12) Расположение 1

В одном расположении, первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, а вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Например, в одном варианте воплощения изобретения, первая рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полипептид тяжелой цепи. В одном варианте воплощения изобретения, вторая рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полипептид легкой цепи.

Первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может быть помещена в вектор. Вторая рекомбинантная конструкция последовательности нуклеиновой кислоты может быть помещена во второй или отдельный вектор. Размещение рекомбинантной конструкции последовательности нуклеиновой кислоты в векторе более подробно описано ниже.

Первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может включать промотор, интрон, область терминации транскрипции, кодон инициации, кодон терминации и/или сигнал полиаденилирования. Первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может дополнительно включать лидерную последовательность, где лидерная последовательность расположена перед (или на 5'-конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи. Соответственно, сигнальный пептид, кодируемый лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом

тяжелой цепи.

Вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может включать промотор, иницирующий кодон, терминирующий кодон и сигнал полиаденилирования. Вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может дополнительно включать лидерную последовательность, где лидерная последовательность расположена перед (или на 5'-конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Соответственно, сигнальный пептид, кодируемый лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом легкой цепи.

Соответственно, один пример расположения 1 может включать первый вектор (и, следовательно, первую конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH и CH1, и второй вектор (и, таким образом, конструкцию второй последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид легкой цепи, включающий VL и CL. Второй пример расположения 1 может включать первый вектор (и, таким образом, первую конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и второй вектор (и, таким образом, вторую конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид легкой цепи, который включает VL и CL.

### (13) Расположение 2

Во втором расположении, конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид тяжелой цепи, может быть расположена выше (или на 5'-конце) от гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Альтернативно, гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид легкой цепи, может быть расположена выше (или на 5'-конце) от гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи.

Конструкт последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть помещен в вектор, как это более подробно описано ниже.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления протеазой и/или линкерную последовательность. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сайт расщепления протеазой, может быть расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи, если она включена в

конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Соответственно, сайт расщепления протеазой позволяет разделить полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи на отдельные полипептиды во время экспрессии. В других вариантах воплощения изобретения, в случае, если линкерная последовательность включена в конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, тогда линкерная последовательность может быть расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может включать промотор, интрон, область терминации транскрипции, кодон инициации, кодон терминации и/или сигнал полиаденилирования. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более промоторов. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать два промотора таким образом, что один промотор может быть связан с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, а второй промотор может быть связан с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В других вариантах воплощения изобретения, конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один промотор, который связан с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может дополнительно включать две лидерные последовательности, в которых первая лидерная последовательность расположена выше (или на 5'-конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и вторая лидерная последовательность расположена выше (или на 5'-конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Соответственно, первый сигнальный пептид, кодируемый первой лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом тяжелой цепи, а второй сигнальный пептид, кодируемый второй лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом легкой цепи.

Соответственно, один пример расположения 2 может включать вектор (и, следовательно, рекомбинантную конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает в себя VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который включает в себя VL и CL, в котором линкерная последовательность расположена между последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Второй пример расположения 2 может включать вектор (и, следовательно, рекомбинантную конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который включает VL и CL, в котором последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующая сайт расщепления протеазой расположен между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Третий пример расположения 2 может включать вектор (и, следовательно, рекомбинантную конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и полипептид легкой цепи, который включает VL и CL, где линкерная последовательность расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Четвертый пример расположения 2 может включать вектор (и, следовательно, рекомбинантную конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и полипептид легкой цепи, который включает VL и CL, где гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сайт расщепления протеазой, расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

#### (14) Расположение ScFv

В расположении ScFv, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может включать последовательность, кодирующую домен VH полипептида тяжелой цепи и домен VL полипептида легкой цепи, и, необязательно, дополнительно линкерную последовательность, расположенную между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей VH домен и домен VL.

Пример расположения ScFv может включать вектор (и, следовательно, рекомбинантную конструкцию последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий VH, линкер, VL, шарнирную область, CH2 и CH3. Область VH может быть связана с областью VL через линкер на N-конце или C-конце.

Экспрессия конструкта рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Как описано выше, конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать, в комплексе из одного или более компонентов, гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и/или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Соответственно, конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может способствовать экспрессии полипептида тяжелой цепи и/или

полипептида легкой цепи.

При использовании расположения 1, описанного выше, первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи, а вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида легкой цепи. При использовании расположения 2, описанного выше, конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может способствовать экспрессии полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи.

Во время экспрессии, например, в клетке, организме или млекопитающем, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут собираться в синтетическое антитело, не ограничиваясь только этим. В частности, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, таким образом, что сборка приводит к появлению способности синтетического антитела связывать антиген. В других вариантах воплощения изобретения, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом таким образом, что сборка приводит к появлению у синтетического антитела более иммуногенных свойств по сравнению с не собранным антителом, как это описано в настоящем документе. В других вариантах воплощения изобретения, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом таким образом, что синтетическое антитело становится способным вызывать или усиливать иммунный ответ против антигена.

#### Вектор

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, описанная выше, может включать один или более векторов. Один или более векторов могут содержать источник репликации. Один или более векторов могут быть плазмидой, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или дрожжевой искусственной хромосомой. Один или более векторов могут быть либо самовоспроизводящимся внехромосомным вектором, либо вектором, интегрированным в геном хозяина.

Векторы включают плазмиды, векторы экспрессии, рекомбинантные вирусы, любые формы рекомбинантной «голой ДНК» вектора и тому подобное, но, не ограничиваясь перечисленным. «Вектор» включает нуклеиновую кислоту, которая может инфицировать, трансфицировать, временно или постоянно трансдуцировать клетку. Признано, что вектор может представлять собой голую нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту в комплексе с белком или липидом. Вектор необязательно содержит вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты и/или белки и/или мембраны (например, клеточную мембрану, вирусную липидную оболочку и т.д.). Векторы включают репликоны (например, РНК-репликоны, бактериофаги), но, не ограничиваясь ими, к которым фрагменты ДНК могут присоединяться и реплицироваться. Таким образом, векторы включают, но, не ограничиваются, РНК, автономную самореплицирующуюся кольцевую или линейную ДНК или РНК (например, плазмиды, вирусы и тому подобное, см., например, патент США № 5217879) и включают как

экспрессирующие, так и неэкспрессирующие плазмиды. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вектор включает линейную ДНК, ферментативную ДНК или синтетическую ДНК. Когда рекомбинантный микроорганизм или клеточная культура описываются в качестве хозяина «вектора экспрессии», они включают как внехромосомную кольцевую, так и линейную ДНК и ДНК, которые были включены в хромосому (ы) хозяина. Если вектор поддерживается клеткой-хозяином, вектор может либо стабильно реплицироваться клетками во время митоза в качестве автономной структуры, либо включаться в геном хозяина.

Один или более векторов могут быть гетерологичной экспрессирующей конструкцией, которая обычно представляет собой плазмиду, используемую для введения определенного гена в клетку-мишень. Как только вектор экспрессии оказывается внутри клетки, полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, которые кодируются конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, продуцируются с помощью клеточной транскрипции и трансляции рибосомных комплексов. Один или более векторов могут экспрессировать большие количества стабильной мессенджерной РНК и, следовательно, белков.

#### (15) Вектор экспрессии

Один или более векторов могут быть кольцевой плазмидой или линейной нуклеиновой кислотой. Кольцевая плазида и линейная нуклеиновая кислота способны направлять экспрессию конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующей клетке субъекта. Один или более векторов, содержащих конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, могут быть химерными, что означает, что по меньшей мере один из компонентов вектора является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из других его компонентов.

#### (16) Плазида

Один или более векторов могут быть кольцевой плазмидой или линейной нуклеиновой кислотой. Плазида может быть использована для трансфекции клеток рекомбинантной конструкцией последовательности нуклеиновой кислоты. Плазида может быть использована для введения рекомбинантной конструкции последовательности нуклеиновой кислоты субъекту. Плазида также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии генов в клетке, в которую вводится плазида.

Плазида также может содержать источник репликации млекопитающих для поддержания внехромосомной плазмиды и получения множества копий плазмиды в клетке. Плазмидой может быть pVAX1, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (Сан-Диего, Калифорния), которые могут включать источник репликации вируса Эпштейна-Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, которая может продуцировать высококопийную эписомальную репликацию без интеграции. Основой плазмиды может быть pAV0242. Плазида может быть дефектной плазмидой по репликации аденовируса типа 5 (Ad5).

Плазмидой может быть pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которая может быть использована для продуцирования белка в *Escherichia coli* (*E.coli*). Плазмидой может быть pYES2 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которая может быть использована для продуцирования белка в штамме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазида может также быть полной системой экспрессии бакуловируса MAXBAC™ (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которая может быть использована для продуцирования белка в клетках насекомых. Плазмидой также могут быть pcDNA1 или pcDNA3 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которые могут быть использованы для продуцирования белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

#### (17) РНК

В одном варианте воплощения изобретения, РНК является молекулой. В одном варианте воплощения изобретения, молекула РНК транскрибируется с последовательности ДНК, описанной в данном изобретении. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула РНК кодируется последовательностью ДНК по меньшей мере на 90% гомологичной одной из SEQ ID № 1-6 или фрагментом последовательности ДНК, по меньшей мере 90% гомологичным одной из SEQ ID № 1- 6. В другом варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную последовательностью ДНК, кодирующей полипептидную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную одной из аминокислотной последовательности, кодируемой одним из SEQ ID № 1-6, фрагментом аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 90% гомологичную аминокислотной последовательности, кодируемой одним из SEQ ID № 1-6, или его вариантом, или его фрагментом. В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную последовательностью ДНК, кодирующая полипептидную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID №7, фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный SEQ ID №7, или его вариант, или его фрагмент. Соответственно, в одном варианте воплощения, изобретение относится к молекуле РНК, кодирующей один или более MAbs или DMAbs. РНК может быть плюс-цепью. Соответственно, в некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула РНК может транслироваться клетками без необходимости присутствия каких-либо промежуточных стадий репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, используемая в изобретении, может быть кэпирована на 5'-конце (например, 7-метилгуанозином). Кэпирование может усиливать трансляцию РНК *in vivo*. 5'-нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь 5'-трифосфатную группу. В кэпированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином через 5'-5'-мостик. Молекула РНК может иметь 3'-поли-А-хвост. Она также может включать последовательность распознавания поли-А-полимеразы (например, AAUAAA) приблизительно 3'-конца. Молекула РНК, используемая в изобретении, может

быть одноцепочечной. Молекула РНК, используемая в изобретении, может включать синтетическую РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула РНК представляет собой молекулу голой РНК. В одном варианте воплощения изобретения, молекула РНК включена в вектор.

В одном варианте воплощения изобретения, РНК имеет 5' и 3' UTR. В одном варианте воплощения изобретения, длина 5'-UTR равна диапазону от нуля до 3000 нуклеотидов. Длина 5'- и 3'-последовательностей UTR, добавленных в кодирующую область, может быть изменена различными способами, включая конструирование праймеров для ПЦР с отжигом в различных областях UTR, но, не ограничиваясь этим. Используя этот подход, специалист в данной области техники может модифицировать 5' и 3' длины UTR, необходимые для достижения оптимальной эффективности трансляции, следующей после трансфекции транскрибированной РНК.

5' и 3' UTR могут представлять собой встречающиеся в природе эндогенные 5' и 3' UTR гена, представляющего интерес. Альтернативно, последовательности UTR, не являющиеся эндогенными для гена, представляющего интерес, могут быть добавлены путем включения последовательностей UTR в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, не являющихся эндогенными для интересующего гена, может быть полезным при модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в 3'-последовательностях UTR могут снижать стабильность РНК. Следовательно, 3'-UTR могут быть выбраны или разработаны для увеличения стабильности транскрибированной РНК на основе свойств UTR, хорошо известных в данной области техники.

В одном варианте воплощения изобретения, 5'-UTR может содержать последовательность Козак эндогенного гена. Альтернативно, когда 5'-UTR, не являющийся эндогенным для интересующего гена, добавляется с помощью ПЦР так, как это описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть изменена путем добавления 5'-последовательности UTR. Последовательности Козак могут повысить эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но, по-видимому, нет необходимости в обеспечении эффективной трансляции для всех РНК. Требования к последовательностям Козак известны в данной области техники для большинства РНК. В других вариантах воплощения изобретения, 5'-UTR может быть получен из РНК-вируса, чей РНК-геном стабилен в клетках. В других вариантах воплощения изобретения, различные нуклеотидные аналоги могут быть использованы в 3' или 5' UTR для препятствия деградации экзонуклеазы РНК.

В одном варианте воплощения изобретения, РНК имеет как кэпирование на 5' конце, так и 3' поли-(А) хвост, который определяет связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность РНК в клетке.

В одном варианте воплощения изобретения, РНК представляет собой нуклеозид-модифицированную РНК. Нуклеозид-модифицированная РНК обладает особыми

преимуществами по сравнению с немодифицированной РНК, включая, например, повышенную стабильность, низкую или отсутствующую врожденную иммуногенность и улучшенную трансляцию.

#### (18) Кольцевой и линейный вектор

Один или более векторов могут быть кольцевой плазмидой, которая может трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, как автономно реплицирующаяся плазида с источником репликации). Вектором может быть pVAX, pcDNA3.0 или pGroX или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

В настоящем документе также представлена линейная нуклеиновая кислота или кассета линейной экспрессии («LEC»), которая способна эффективно доставляться субъекту посредством электропорации и экспрессии полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи, кодируемого конструктом рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. LEC может представлять собой любую линейную ДНК, лишенную какого-либо фосфатного остова. LEC может не содержать генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. LEC может не содержать других последовательностей нуклеиновых кислот, не связанных с желаемой экспрессией гена.

LEC может быть получен из любой плазмиды, способной к линейаризации. Плазмидой может быть способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Плазмидой может быть pNP (Puerto Rico/34) или pM2 (New Caledonia/99). Плазмидой может быть WLV009, pVAX, pcDNA3.0 или pGroX или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

LEC может быть pcrM2. LEC может быть pcrNP. pcrNP и pcrMR могут быть получены из pNP (Puerto Rico/34) и pM2 (New Caledonia/99), соответственно.

#### (19) Вирусные векторы

В одном варианте воплощения изобретения, представленные в данном описании вирусные векторы способны доставлять нуклеиновую кислоту, описанную в изобретении, в клетку. Вектор экспрессии может быть представлен клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al. (2001) и в Ausubel et al. (1997), а так же в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ретровирусами, аденовирусами, аденоассоциированными вирусами, вирусами герпеса и лентивирусами. В общем, подходящий вектор содержит источник репликации, функционирующий по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные сайты рестрикционной

эндонуклеазы и один или более селективных маркеров. (Смотри, например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6,326,193). Вирусные векторы, особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. д. См., например, патенты США № 5,350,674 и №5585362.

#### (20) Способ получения вектора

В настоящем документе представлен способ получения одного или более векторов, в которые помещена конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. После заключительного этапа субклонирования, вектор может быть использован для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном ферментационном резервуаре с использованием известных в данной области техники способов.

В других вариантах воплощения изобретения, после заключительного этапа субклонирования вектор может использоваться с одним или более устройствами электропорации (ЭП). Устройства ЭП более подробно описаны ниже.

Один или более векторов могут быть сконструированы или изготовлены с использованием комбинации известных устройств и технологий, однако, более предпочтительным является изготовление с использованием технологии изготовления плазмид, которая описана в лицензированной, находящейся на рассмотрении предварительной заявке США, серийный номер США 60/939,792, которая была подана 23 мая 2007 г. В некоторых примерах, ДНК-плазмиды, использованные в данных исследованиях, могут быть сконструированы в концентрациях, превышающих или равных 10 мг/мл. Технологии изготовления также включают или объединяют различные устройства и протоколы, хорошо известные специалистам в данной области техники, в дополнение к технологиям, описанным в заявке США под серийным номером 60/939792, включая описанные в патенте США № 7,238,522, выданного 3 июля 2007 г. Упомянутые выше публикация и патент, а именно публикация США № 2009/004716 и патент США № 7,238,522, соответственно, включены полностью в данное изобретение посредством ссылки.

#### 4. Антитело

Как это уже было сказано выше, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело может связываться или реагировать с антигеном так, как это в деталях описано ниже.

Антитело может содержать область, определяющую комплементарность легкой и тяжелой цепей («CDR»), соответственно, расположенную между каркасными участками тяжелой легкой цепей («FR»), которые обеспечивают поддержку CDR и определяют пространственную взаимосвязь CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельные области V тяжелой и легкой цепей. Исходя из N-конца

полипептида тяжелой цепи или легкой цепи, эти области обозначены как «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. Следовательно, антигенсвязывающий сайт может включать шесть CDR, включающих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепей.

Протеолитический фермент папаин расщепляет преимущественно молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, два из которых (фрагменты F (ab)) содержат ковалентный гетеродимер, который включает интактный антигенсвязывающий сайт. Фермент пепсин способен расщеплять молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, включая фрагмент F (ab')<sub>2</sub>, который содержит оба антигенсвязывающих сайта. Соответственно, антителом может быть Fab или F (ab')<sub>2</sub>. Fab может включать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи Fab может включать область VH и область CH1. Легкая цепь Fab может включать область VL и область CL.

Антитело может быть иммуноглобулином (Ig). Ig может быть, например, IgA, IgM, IgD, IgE и IgG. Иммуноглобулин может включать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина может включать область VH, область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3. Полипептид легкой цепи иммуноглобулина может включать область VL и область CL.

Антитело может быть поликлональным или моноклональным. Антитело может быть химерным антителом, одноцепочечным антителом, аффинно-зрелым антителом, человеческим антителом, гуманизированным антителом или полностью человеческим антителом. Гуманизированное антитело может быть антителом вида, не принадлежащего к человеку, которое связывает желаемый антиген, имеющий одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR) вида, не принадлежащего к человеку, и каркасных областей молекулы человеческого иммуноглобулина.

Антитело может быть биспецифическим антителом, как это более подробно описано ниже. Антитело может быть бифункциональным антителом, как это более подробно описано ниже.

Как это описано выше, антитело может быть сгенерировано у субъекта после введения композиции субъекту. У антитела, введенного субъекту, может присутствовать период полувыведения. В некоторых вариантах воплощения изобретения, антитело может быть модифицировано для продления или укорочения его периода полувыведения у субъекта. Такие модификации более подробно описаны ниже.

Антитело может быть дефукозилировано, как это описано более подробно ниже.

Антитело может быть модифицировано для уменьшения или предотвращения антителозависимого усиления (ADE) заболевания, связанного с антигеном, как это более подробно описано ниже.

ScFv антитело

В одном варианте воплощения изобретения, DMAb, описанный в изобретении, является ScFv DMAb. В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb относится

к Fab-фрагменту без областей CH1 и CL. Таким образом, в одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb относится к Fab-фрагменту DMAb, содержащему VH и VL. В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb содержит линкер между VH и VL. В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb является ScFv-Fc DMAb. В одном варианте воплощения изобретения, ScFv-Fc DMAb содержит области VH, VL и CH2 и CH3. В одном варианте воплощения изобретения, ScFv-Fc DMAb содержит линкер между VH и VL. В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb, описанный в изобретении, характеризуется модифицированной экспрессией, стабильностью, периодом полувыведения, связыванием антигена, спариванием тяжелой цепи с легкой цепью, проникновением в ткани, или их комбинацию по сравнению с родительским DMAb.

В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb, описанный в изобретении, имеет по меньшей мере в 1,1 раза, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раза, по меньшей мере в 1,7 раза, по меньшей мере в 1,8 раза, по меньшей мере в 1,9 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,1 раза, по меньшей мере в 2,2 раза, по меньшей мере в 2,3 раза, по меньшей мере в 2,4 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 2,6 раза, по меньшей мере в 2,7 раза, по меньшей мере в 2,8 раза, по меньшей мере в 2,9 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 5,5 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 9,5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз или более чем в 50 раз более высокую экспрессию, по сравнению с родительским DMAb.

В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb, описанный в изобретении, имеет по меньшей мере в 1,1 раза, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раза, по меньшей мере в 1,7 раза, по меньшей мере в 1,8 раза, по меньшей мере в 1,9 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,1 раза, по меньшей мере в 2,2 раза, по меньшей мере в 2,3 раза, по меньшей мере в 2,4 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 2,6 раза, по меньшей мере в 2,7 раза, по меньшей мере в 2,8 раза, по меньшей мере в 2,9 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 5,5 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 9,5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз или более чем в 50 раз более высокое связывание антигена, по сравнению с родительским DMAb.



раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 9,5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз или более чем в 50 раз более высокое проникновение в ткани по сравнению с родительским DMAb.

В одном варианте воплощения изобретения, ScFv DMAb, описанный в изобретении, имеет по меньшей мере в 1,1 раза, по меньшей мере в 1,2 раза, по меньшей мере в 1,3 раза, по меньшей мере в 1,4 раза, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 1,6 раза, по меньшей мере в 1,7 раза, по меньшей мере в 1,8 раза, по меньшей мере в 1,9 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,1 раза, по меньшей мере в 2,2 раза, по меньшей мере в 2,3 раза, по меньшей мере в 2,4 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 2,6 раза, по меньшей мере в 2,7 раза, по меньшей мере в 2,8 раза, по меньшей мере в 2,9 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 5,5 раза, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 6,5 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 7,5 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 8,5 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 9,5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз или более чем в 50 раз улучшенное спаривание тяжелых и легких цепей дуг с другом, по сравнению с родительским DMAb.

#### Биспецифическое антитело

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать биспецифическое антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Биспецифическое антитело может связываться или реагировать с двумя антигенами, например, с двумя антигенами, описанными ниже более подробно. Биспецифическое антитело может состоять из фрагментов двух антител, описанных в данном изобретении, что позволяет биспецифическому антителу связываться или реагировать с двумя желаемыми молекулами-мишенями, которые могут включать антиген, более подробно описанный ниже, лиганд, включая лиганд рецептора, рецептор, включающий лиганд-связывающий сайт на рецепторе, комплекс лиганд-рецептор и маркер.

Изобретение раскрывает новые биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается с первой мишенью, и второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается со второй мишенью, с особенно предпочтительными свойствами, такими как продуктивность, стабильность, аффинность связывания, биологическая активность, специфическое нацеливание на определенные Т-клетки, эффективное нацеливание и снижение токсичности. В некоторых случаях, существуют биспецифические антитела, где биспецифическое антитело связывается с первой мишенью с высокой аффинностью и со второй мишенью с низкой аффинностью. В других случаях существуют биспецифические антитела, в которых биспецифическое антитело связывается с первой мишенью с низкой

аффинностью и со второй мишенью с высокой аффинностью. В других случаях существуют биспецифичные антитела, в которых биспецифическое антитело связывается с первой мишенью с желаемой аффинностью и со второй мишенью с желаемой аффинностью.

В одном варианте воплощения изобретения, биспецифическое антитело представляет собой двухвалентное антитело, содержащее а) первую легкую цепь и первую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, и б) вторую легкую цепь и вторую тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном.

Молекула биспецифического антитела, согласно изобретению, может иметь два сайта связывания любой желаемой специфичности. В некоторых вариантах воплощения изобретения, в одном из сайтов связывания находится антиген РСВ. В некоторых вариантах воплощения изобретения, сайт связывания, включенный во фрагмент Fab, представляет собой сайт связывания, специфичный для антигена РСВ. В некоторых вариантах воплощения изобретения, сайт связывания, включенный в одноцепочечный фрагмент Fv, представляет собой сайт связывания, специфичный для антигена РСВ, такого как капсидный антиген РСВ или антиген оболочки РСВ, например РСВ-F, РСВ-G, РСВ-Ga, РСВ -Gb, РСВ-M2-1 или РСВ M2-2.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, один из сайтов связывания молекулы антитела, описанного в изобретении, способен связывать молекулу специфического рецептора Т-клеток и/или молекулу специфического рецептора природных клеток-киллеров (НК-клеток). Т-клеточный специфический рецептор является, так называемым, «Т-клеточным рецептором» (TCR), который позволяет Т-клетке связываться и, при присутствии дополнительных сигналов, активироваться и реагировать на эпитоп/антиген, презентуемый другим клеткам, которые называются антиген-презентирующими клетками или АПК. Известно, что Т-клеточный рецептор напоминает Fab-фрагмент природного иммуноглобулина. Как правило, он является одновалентным и включает  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, в некоторых вариантах воплощения изобретения, он включает  $\gamma$ -цепи и  $\delta$ -цепи (см. выше). Соответственно, в некоторых вариантах воплощения изобретения, TCR является TCR ( $\alpha/\beta$ ), а в некоторых вариантах воплощения, это TCR ( $\gamma/\delta$ ). Рецептор Т-клеток образует комплекс с корецептором CD3 Т-клеток. CD3 является белковым комплексом и состоит из четырех отдельных цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$  и две цепи CD3 $\epsilon$ . Эти цепи связываются с молекулой, известной как рецептор Т-клеток (TCR), и  $\zeta$ -цепью для генерации сигнала активации в Т-лимфоцитах. Следовательно, в некоторых вариантах воплощения изобретения, Т-клеточный специфический рецептор представляет собой Т-клеточный корецептор CD3. В некоторых вариантах воплощения изобретения, рецептором, специфичным для Т-клеток является CD28 - белок, который также экспрессируется на Т-клетках. CD28 может обеспечивать костимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-клеток. CD28 играет важную роль в пролиферации и выживании Т-клеток,

продукции цитокинов и развитии Т-хелперов 2-го типа. Еще одним примером специфического Т-клеточного рецептора является CD134, также называемый Oх40. CD134/OX40 экспрессируется через 24-72 часа после активации и может использоваться для определения вторичной костимулирующей молекулы. Другим примером Т-клеточного рецептора является 4-1 ВВ, способный связываться с 4-1 ВВ-лигандом на антигенпрезентирующих клетках (АПК), посредством чего генерируется костимулирующий сигнал для Т-клетки. Другим примером рецептора, который преимущественно обнаруживают на Т-клетках, является CD5, низкие уровни которого также обнаруживаются на В-клетках. Другим примером рецептор-модифицирующих функций Т-клеток является CD95, также известный как рецептор Fas, который опосредует апоптотическую передачу сигналов Fas-лигандом, экспрессируемым на поверхности других клеток. Сообщается, что CD95 модулирует TCR/CD3-управляемые сигнальные пути покоящихся Т-лимфоцитов.

Примером молекулы специфического рецептора NK-клеток являются CD16, низкоаффинный Fc-рецептор, и NKG2D. Примером рецепторной молекулы, которая присутствует на поверхности как Т-клеток, так и естественных киллеров (NK), является CD2, а также другие молекулы, принадлежащие к суперсемейству CD2. CD2 способен действовать в качестве костимулирующей молекулы на Т и NK клетках.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, первый сайт связывания молекулы антитела связывается с антигеном РСВ, а второй сайт связывания связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу рецептора специфических натуральных клеток-киллеров (NK).

В некоторых вариантах воплощения изобретения, первый сайт связывания молекулы антитела связывает один из антигенов РСВ, выбранный из РСВ-F, РСВ-G, РСВ-Ga, РСВ-Gb, РСВ-M2-1 или РСВ M2-2 или полипротеина, содержащего любую их комбинацию, и второй сайт связывания связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу рецептора специфических натуральных клеткок-киллеров (NK). В некоторых вариантах воплощения изобретения, первый сайт связывания молекулы антитела связывает антиген РСВ, а второй сайт связывания связывает один из перечисленных CD3, рецептора Т-клеток (TCR), CD28, CD16, NKG2D, Oх40, 4-1ВВ, CD2, CD5 и CD95.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, первый сайт связывания молекулы антитела связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу специфического рецептора натуральных клеткок-киллеров (NK), а второй сайт связывания связывает антиген РСВ. В некоторых вариантах воплощения изобретения, первый сайт связывания антитела связывает молекулу специфического Т-клеточного рецептора и/или молекулу специфического рецептора натуральных клеткок-киллеров (NK), а второй сайт связывания связывает один из РСВ-F, РСВ-G, РСВ-Ga, РСВ-Gb, РСВ-M2-1 или РСВ M2-2 или полипротеин, содержащий любую их комбинацию. В некоторых вариантах воплощения изобретения, первый сайт связывания антитела связывает один из

перечисленных CD3, рецептора Т-клеток (TCR), CD28, CD16, NKG2D, O<sub>x</sub>40, 4-1BB, CD2, CD5 и CD95, а второй сайт связывания связывает РСВ антиген.

#### Бифункциональное антитело

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать бифункциональное антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Бифункциональное антитело может связываться или реагировать с антигеном так, как это описано ниже. Бифункциональное антитело также может быть модифицировано для придания антителу дополнительной функциональности за пределами распознавания и связывания антигена. Такая модификация может включать связь с фактором Н или его фрагментом, но не ограничиваясь им. Фактор Н является растворимым регулятором активации комплемента и, таким образом, может способствовать иммунному ответу посредством лизиса, опосредованного комплементом (CML).

#### Продление периода полувыведения антитела

Согласно тому, что было изложено выше, антитело может быть модифицировано для продления или укорочения периода полувыведения у субъекта. Модификация может продлить или сократить период полувыведения антитела в сыворотке субъекта.

Модификация может присутствовать в константной области антитела. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в константной области антитела, которые увеличивают период полувыведения антитела по сравнению с периодом полувыведения антитела, не содержащего одну или более аминокислотных замен. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в области СН<sub>2</sub> антитела, которые увеличивают период полувыведения антитела по сравнению с периодом полувыведения антитела, не содержащего одну или более аминокислотных замен.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, одна или более аминокислотных замен в константной области могут быть заменами остатка метионина в константной области, остатка тирозина, остатка серина в константной области остатком треонина, остатка треонина в константной области, остатка глутамата или любая их комбинация, которая тем самым продлевает период полувыведения антитела.

В других вариантах воплощения изобретения, одна или более аминокислотных замен в константной области могут быть заменами остатка метионина в домене СН<sub>2</sub>, остатка тирозина, остатка серина в домене СН<sub>2</sub> остатком треонина, остатка треонина в домене СН<sub>2</sub>, остатка глутамата или любой их комбинацией, тем самым продлевая период полувыведения антитела.

#### Дефукозилизация

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, которое не является фукозилированным (то есть дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело), его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Фукозилирование включает добавление сахарной фукозы к молекуле, например, присоединение фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. Соответственно,

фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области в дефукозилированном антителе. В свою очередь, отсутствие фукозилирования может улучшать связывание FcR3a и антитело-направленную клеточную цитотоксическую (ADCC) активность антитела по сравнению с фукозилированным антителом. Следовательно, в некоторых вариантах воплощения изобретения, нефукозилированное антитело может проявлять повышенную активность ADCC по сравнению с фукозилированным антителом.

Антитело может быть модифицировано таким образом, чтобы предотвращать или ингибировать фукозилирование антитела. В некоторых вариантах воплощения изобретения, такое модифицированное антитело может проявлять повышенную активность ADCC по сравнению с немодифицированным антителом. Модификация может находиться в тяжелой цепи, легкой цепи или быть их комбинацией. Модификация может быть одной или более аминокислотными заменами в тяжелой цепи, одной или более аминокислотными заменами в легкой цепи или их комбинацией.

#### Сниженный ответ ADE

Антитело может быть модифицировано для уменьшения или предотвращения антителозависимого усиления (ADE) заболевания, при этом с сохранением функции нейтрализации антигена.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, антитело может быть модифицировано для включения одной или более аминокислотных замен, уменьшающих или предотвращающих связывание антитела с FcγR1a. Одна или более аминокислотных замен могут находиться в константной области антитела. Одна или более аминокислотных замен могут включать замену остатка лейцина на остаток аланина в константной области антитела, то есть также называемую в данном документе LA, мутация LA или замена LA. Одна или более аминокислотных замен могут включать замену двух остатков лейцина, каждый из которых является остатком аланина, в константной области антитела и также называемые в данном документе LALA, мутация LALA или замена LALA. Наличие замен LALA может предотвращать или блокировать связывание антитела с FcγR1a, влияя на модифицированное антитело таким образом, что оно не усиливает или не вызывает ADE заболевания, связанного с антигеном, но все же остается способным нейтрализовать антиген.

#### Моноклональные антитела

В одном варианте воплощения, изобретение относится к антителам против РСВ. Антитела могут быть интактными моноклональными антителами и иммунологически активными фрагментами (например, фрагментом Fab или (Fab)<sub>2</sub>), тяжелой цепью моноклонального антитела или легкой цепью моноклонального антитела.

Антитело может содержать область, определяющую комплементарность легкой и тяжелой цепей («CDR»), соответственно, расположенную между каркасными участками тяжелой легкой цепей («FR»), которые обеспечивают поддержку CDR и определяют пространственную взаимосвязь CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельные области V тяжелой и легкой цепей. Исходя из N-конца

полипептида тяжелой цепи или легкой цепи, эти области обозначены как «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. Следовательно, антигенсвязывающий сайт может включать шесть CDR, включающих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепей.

Антитело может быть иммуноглобулином (Ig). Ig может быть, например, IgA, IgM, IgD, IgE и IgG. Иммуноглобулин может включать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина может включать область VH, область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3. Полипептид легкой цепи иммуноглобулина может включать область VL и область CL.

В одном варианте воплощения изобретения, анти-PCB антитело содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6, или фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, анти-PCB антитело содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID №7, или фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный SEQ ID №7. В одном варианте воплощения изобретения, анти-PCB антитело содержит аминокислотную последовательность, кодируемую одной из SEQ ID № 1-6, или фрагмент аминокислотной последовательности, кодируемый одной из SEQ ID № 1-6. В одном варианте воплощения изобретения, анти-PCB антитело содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID №7, или фрагмент аминокислотной последовательности, изложенный в SEQ ID №7.

## 5. Антиген

Синтетическое антитело направлено против антигена или его фрагмента, или варианта. Антиген может быть последовательностью нуклеиновой кислоты, аминокислотной последовательностью, полисахаридом или их комбинацией. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть ДНК, РНК, кДНК, их вариантом, их фрагментом или их комбинацией. Аминокислотная последовательность может быть белком, пептидом, их вариантом, их фрагментом или их комбинацией. Полисахарид может быть полисахаридом, кодируемым нуклеиновой кислотой.

Антиген может происходить из вируса. Антиген может быть связан с вирусной инфекцией. В одном варианте воплощения изобретения, антиген может быть связан с респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией. В одном варианте воплощения изобретения, антиген может быть гликопротеином РСВ или структурным белком РСВ. В одном варианте воплощения изобретения, антиген РСВ может быть РСВ-F, РСВ-G, РСВ-Ga, РСВ-Gb, РСВ-M2-1 или РСВ M2-2.

В одном варианте воплощения изобретения, антиген может быть фрагментом белка РСВ. В одном варианте воплощения изобретения, антиген может быть фрагментом гликопротеина РСВ или структурного белка РСВ.

В одном варианте воплощения изобретения, синтетическое антители, описанное в изобретении, нацелено против двух или более антигенов. В одном варианте воплощения изобретения по меньшей мере один антиген биспецифического антитела выбран из антигенов, описанных в данном изобретении. В одном варианте воплощения изобретения, два или более антигенов выбраны из антигенов, описанных в данном изобретении.

#### Вирусные антигены

Вирусный антиген может быть вирусным антигеном, или его фрагментом или вариантом. Вирус может быть болезнетворным вирусом. Вирус может быть респираторно-синцитиальным вирусом.

Антиген может быть антигеном РСВ, или его фрагментом, или его вариантом. Антиген РСВ может происходить из фактора, позволяющего вирусу размножаться, заражать или выживать. Факторы, позволяющие РСВ реплицироваться или выживать, включают структурные белки и неструктурные белки, но, не ограничиваясь ими. Такой белок может быть гликопротеином, структурным белком или неструктурным белком. В одном варианте воплощения изобретения, антиген РСВ может включать РСВ-G, РСВ-F, РСВ-SH, РСВ-N, РСВ-П, РСВ-M и РСВ-L.

#### 6. Вспомогательные вещества и другие компоненты композиции

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. Фармацевтически приемлемый наполнитель может быть функциональными молекулами, такими как переносчики, носители или разбавители. Фармацевтически приемлемый наполнитель может быть агентом, облегчающим трансфекцию, и может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию.

Средство, облегчающее трансфекцию является полианионом, поликатионом, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид. Средство, облегчающее трансфекцию, является поли-L-глутаматом, который может присутствовать в композиции в концентрации менее 6 мг/мл. Облегчающий трансфекцию агент может также включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, и гиалуроновая кислота также могут быть использованы в сочетании с композицией. Композиция может также включать агент, облегчающий трансфекцию, такой как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосомы (см., например, W09324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию. Средство, облегчающее трансфекцию является полианионом, поликатионом, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид. Концентрация

трансфекционного агента в вакцине составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Композиция может дополнительно содержать генетический усиливающий агент, как это описано в заявке на патент США серийный номер №021 579, поданной 1 апреля 1994 г., которая полностью включена в данное описание посредством ссылки.

Композиция может содержать ДНК в количестве от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или, предпочтительно, от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или, более предпочтительно, от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения, композиция, в соответствии с настоящим изобретением, содержат от приблизительно 5 нанограмм до приблизительно 1000 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения, композиция содержит от приблизительно 10 нанограмм до приблизительно 800 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения, композиция может содержать от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения, композиция может содержать от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения, фармацевтические композиции содержат от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограммов, от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограммов, от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг, от приблизительно 5 до приблизительно 1000 микрограмм, от приблизительно 10 до приблизительно 800 микрограмм, от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограмм, от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограмм, от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограмм от приблизительно 100 до приблизительно 200 мкг ДНК.

Композиция может быть составлена в соответствии с со способом применения. Инъекционная фармацевтическая композиция может быть стерильной, апиrogenной и не содержащей частиц. Может быть использован изотонический состав или раствор. Изотонические добавки могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Композиция может содержать вазоконстрикторный агент. Изотонические растворы могут включать забуференный фосфатом физиологический раствор. Композиция может дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизация такими компонентами как LGS или поликатионы, или полианионы в составе препарата может привести к достижению ею стабильности при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение продолжительных периодов времени,

### 7. Способ генерации синтетического антитела.

Настоящее изобретение также относится к способу генерации синтетического антитела. Способ может включать введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, с использованием способа доставки, описанного более подробно ниже. Соответственно, синтетическое антитело генерируется у субъекта или *in vivo* после введения композиции субъекту.

Способ также может включать введение композиции в одну или более клеток и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или продуцироваться в одной или более клетках. Способ может дополнительно включать введение композиции в одну или более тканей, например, кожу и мышцы, но не ограничиваясь ими, и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или продуцироваться в одной или более тканях.

### 8. Способ идентификации или скрининга антитела

Настоящее изобретение также относится к способу идентификации или скрининга антитела, описанного выше, которое реагирует или связывается с антигеном, описанным выше. При проведении способа идентификации или скрининга антитела можно использовать антиген в согласно методологиям, известных специалистам в данной области техники, для идентификации или скрининга антитела. Такие методологии могут включать отбор антитела из библиотеки (например, фаговое отображение) и иммунизацию животного с последующим выделением и/или очисткой антитела, но не ограничиваясь ими.

### 9. Способ доставки композиции

Настоящее изобретение также относится к способу доставки композиции субъекту, нуждающемуся в этом. Способ доставки может включать введение композиции субъекту. Доставка может включать инъекцию ДНК с электропорацией и без нее *in vivo*, доставку, опосредованную липосомами, и облегченную доставку с помощью наночастиц, но не ограничиваясь ими.

Млекопитающим, получающим доставку композиции, может быть человек, примат, низший примат, не являющийся человеком, корова, крупный рогатый скот, овца, коза, антилопа, бизон, буйвол, бизон, бык, олень, еж, слон, лама, альпака, мышь, крыса и курица.

Композиция может вводиться различными путями, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, посредством ингаляции, посредством буккального введения, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, интратекальный и внутрисуставный или их комбинации. Для ветеринарного применения, композицию можно вводить в виде подходящей приемлемой композиции в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринар может легко определить режим дозирования и способ введения, который

наиболее подходит для конкретного животного.

Композицию можно вводить с помощью традиционных шприцев, безыгольных инъекционных устройств, «бомбардировок с применением микрочастиц» или других физических методов, таких как электропорация («ЭП»), «гидродинамический метод» или ультразвук.

#### Электропорация

Введение композиции посредством электропорации может быть выполнено с использованием устройств электропорации, сконфигурированных для доставки импульса энергии в желаемую ткань млекопитающего, эффективного для образования обратимых пор в клеточных мембранах, где, предпочтительно, импульс энергии является постоянным током отвечающим текущим вводным параметрам, заданным пользователем. Устройство электропорации может содержать компонент электропорации и набор электродов или модуль с ручным управлением. Компонент электропорации может включать в себя или состоять из одного или более различных элементов устройства электропорации, в том числе: контроллера, генератора сигналов тока, тестера импеданса, регистратора сигналов, элемента ввода, элемента сообщения о состоянии, порта связи, компонента памяти, источника питания и выключателя. Электропорацию можно проводить с использованием устройства электропорации *in vivo*, например, системы CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Плимут-митинг, Пенсильвания) или электропоратора Eigen (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Плимут-митинг, Пенсильвания) для облегчения трансфекции клеток плазмидой.

Компонент электропоратора может функционировать как один элемент устройства электропорации, а другие элементы могут быть отделенными элементами (или компонентами), связанными с компонентом электропоратора. Компонент электропоратора может функционировать в качестве более чем одного элемента устройств электропорации, который может быть связан с другими элементами электропорации, отделенными от компонента электропоратора. Элементы устройств электропорации, существующие как части одного электромеханического или механического устройства, не могут быть ограничены, поскольку элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы, связанные друг с другом. Компонент электропоратора может иметь возможность доставлять импульс мощности, вырабатывающий постоянный ток в желаемой ткани, и включает механизм обратной связи. Узел электродов может включать в себя решетку электродов, имеющую множество электродов в пространственном расположении, причем узел электродов принимает импульс энергии от компонента электропоратора и доставляет его в желаемую ткань через электроды. По меньшей мере один из множества электродов является нейтральным во время подачи импульса энергии, отслеживает импеданс в желаемой ткани и передает значение импеданса компоненту электропоратора. Механизм обратной связи может принимать измеренный импеданс и соответственно может регулировать импульс мощности, подаваемый компонентом электропоратора, для поддержания необходимого уровня постоянного тока.

Множество электродов могут доставлять импульс энергии децентрализованным образом. Множество электродов могут доставлять импульс энергии децентрализованным образом посредством управления электродами в запрограммированной последовательности, при этом запрограммированная последовательность вводится пользователем в компонент электропоратора. Запрограммированная последовательность может содержать множество импульсов, доставляемых последовательно, причем каждый импульс из множества импульсов доставляется по меньшей мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс, и в котором последующий импульс из множества импульсов доставляется посредством другого, по крайней мере, из двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс.

Механизм обратной связи может быть выполнен как с помощью аппаратного, так и с помощью программного обеспечения. Механизм обратной связи может быть выполнен по аналоговой схеме замкнутого контура. Отсчет значений по обратной связи происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но, предпочтительно, является непрерывным в реальном времени или мгновенным (то есть, мгновенным, по существу, определяемым доступными методами определения времени отклика). Нейтральный электрод может измерять импеданс в желаемой ткани и передавать значение импеданса механизму обратной связи, в свою очередь механизм обратной связи реагирует на значение импеданса и регулирует значение мощности для поддержания уровня постоянного тока на значении, соответствующем заданному току. Механизм обратной связи может поддерживать требуемый уровень постоянного тока непрерывно и мгновенно в процессе воздействия импульса мощности.

Примеры устройств электропорации и способов электропорации, которые могут облегчать введение композиции, описанной согласно настоящему изобретению, включают описанные в патенте США № 7245963, Draghia-Akli и др., патентной публикации США 2005/0052630, поданной Smith и др., ссылки на содержание которых в полном объеме включены в настоящее описание. Другие устройства электропорации и способы электропорации, которые можно использовать для облегчения введения композиции, включают в себя устройства, представленные в одновременно находящейся на рассмотрении и заявке того же заявителя на патент США, серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 г., которая заявляет о преимуществе в соответствии с 35 USC 119 (e) для предварительных заявок США Сер. 60/852,149, поданной 17 октября 2006 года, и 60/978,982, поданной 10 октября 2007 года, включенных в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

Патент США № 7245963, авторства Draghia-Akli и соавт. описывает модульные электродные системы и их использование для облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Модульные электродные системы могут содержать множество игольчатых электродов; игл для подкожных инъекций; электрических разъемов, которые обеспечивают проводящую связь от программируемого

импульсного контроллера постоянного тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может обхватить множество игольчатых электродов, установленных на опорной конструкции, и плотно вставить их в выбранную ткань тела или растения. Затем биомолекулы вводят через подкожную иглу в выбранную ткань. Активируется программируемый контроллер импульсов постоянного тока, и электрический импульс постоянного тока подается на множество игольчатых электродов. Прилагаемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение биомолекулы в ячейку между множества электродов. Ссылки на все содержание патента США № 7245963 полностью включены в настоящее описание изобретения.

Патентная публикация США 2005/0052630, представленная Smith и соавт. описывает устройство электропорации, которое можно использовать для эффективного облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Устройство электропорации содержит электрокинетическое устройство («устройство ЕKD»), работа которого задается программным обеспечением или аппаратно-программным обеспечением. Устройство ЕKD генерирует серию программируемых шаблонных импульсов постоянного тока между массива электродов на основании пользовательского управления и введенных параметров импульсов, и позволяет хранить и получать данные о форме колебаний сигнала тока. Устройство электропорации также содержит сменный электродный диск, имеющий ряд игольчатых электродов, центральный канал для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Ссылки на все содержание патента США 2005/0052630 полностью включены в настоящее описание изобретения.

Электродный массив и способы, описанные в патентах США №7,245,963 и 2005/0052630 можно адаптировать для глубокого проникновения не только в такие ткани, как мышцы, но и в другие ткани или органы. С учетом конфигурации электродного массива, инъекционная игла полностью вставляется в целевой орган, и инъекция вводится перпендикулярно целевой ткани в области, которая предварительно очерчена электродами. Electrodes описаны в патенте США № 7245963 и в патенте США 2005/005263, предпочтительно, являются длиной 20 мм и шириной 21 мм.

Кроме того, в некоторых вариантах воплощения изобретения, которые включают устройства электропорации и их использование, присутствуют устройства электропорации, которые описаны в следующих патентах: патент США 5 273 525, выданный 28 декабря 1993 г., патенты США 6 110 161, выданный 29 августа 2000 г., 6 261 281 выданный 17 июля 2001 г. и 6 958 060, выданный 25 октября 2005 г., и патент США 6 939 862, выданный 6 сентября 2005 г. Кроме того, в настоящем документе рассматриваются патенты, охватывающие предмет, предоставленный в патенте США 6 697 669, выданном 24 февраля 2004 г., который касается введения ДНК с использованием любого из множества устройств и патент США 7,328,064, выданный 5 февраля 2008 г., на способ инъекции ДНК, рассматриваемый в данном описании. Ссылки на вышеуказанные патенты включены в данное описание во всей их полноте.

## 10. Способы лечения

В настоящем документе также предлагается способ лечения, защиты от и/или предотвращения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, путем генерирования у субъекта синтетического антитела. Способ может включать введение композиции субъекту. Введение композиции субъекту может быть осуществлено с использованием способа доставки, описанного выше.

В определенных вариантах воплощения, изобретение относится к способу лечения, защиты от и/или предотвращения инфекции РСВ. В одном варианте воплощения изобретения, способом лечат, защищают и/или предотвращают заболевание, связанное с РСВ.

После генерации синтетического антитела у субъекта, синтетическое антитело может связываться или реагировать с антигеном. Такое связывание может нейтрализовать антиген, блокировать распознавание антигена другой молекулой, например, белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на антиген, и, таким образом лечить, защищать от, и/или предотвращать заболевание субъекта, связанное с антигеном.

Синтетическое антитело может лечить, предотвращать и/или защищать от заболевания у субъекта, которому вводят композицию. Синтетическое антитело может лечить, предотвращать и/или защищать от заболевания субъект, которому вводят композицию, путем связывания антигена. Синтетическое антитело может способствовать выживаемости больного субъекта, которому вводят композицию. В одном варианте воплощения изобретения, синтетическое антитело может обеспечивать увеличение выживаемости больного субъекта в сравнении с предполагаемой выживаемостью больного субъекта, которому не вводили синтетическое антитело. В различных вариантах воплощения изобретения, синтетическое антитело может обеспечивать увеличение выживаемости больных субъектов, которым вводили композицию по меньшей мере приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% по сравнению с предполагаемой выживаемостью субъектов, которым не вводили композицию. В одном варианте воплощения изобретения, синтетическое антитело может обеспечивать повышенную защиту субъекта от заболевания по сравнению с предполагаемой защитой субъекта, которому не вводили синтетическое антитело. В различных вариантах воплощения изобретения, синтетическое антитело может защищать субъект, которому вводят композицию, от заболевания по меньшей мере приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% лучше предполагаемой защиты без применения композиции.

Доза композиции может составлять от 1 мкг до 10 мг активного компонента/кг массы тела/время и может составлять от 20 мкг до 10 мг компонента/кг массы тела/время. Композицию можно вводить каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 день. Количество доз композиции для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

## 11. Использование в сочетании с антибиотиками

Настоящее изобретение также относится к способу лечения, защиты от и/или предотвращения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения комбинации синтетического антитела и терапевтического антибиотика.

Синтетическое антитело и антибиотик могут вводиться любым подходящим способом для обеспечения присутствия у субъекта комбинации, как синтетического антитела, так и антибиотика. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение первой композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению любым из способов, подробно описанных выше, и введение второй композиции, содержащей антибиотик, через менее, чем 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней после введения синтетического антитела. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение первой композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению любым из способов, подробно описанных выше, и введение второй композиции, содержащей антибиотик, через более, чем 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней после введения синтетического антитела. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение первой композиции, содержащей антибиотик, и введение второй композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению любым из способов, подробно описанных выше через менее, чем 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней после введения антибиотика. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение первой композиции, содержащей антибиотик, и введение второй композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению любым из способов, подробно описанных выше через более, чем 1, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней после введения антибиотика. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение первой композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению любым из способов, подробно описанных выше, и второй композиции, одновременно содержащей антибиотик. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение первой композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению любым из способов, подробно описанных выше, и второй композиции, одновременно содержащей антибиотик. В одном варианте воплощения изобретения, способ может включать введение единственной композиции, содержащей синтетическое антитело согласно изобретению, и антибиотик.

Примеры антибиотиков, которые можно использовать в комбинации с синтетическими антителами согласно изобретению включают аминогликозиды (например, гентамицин, амикацин, тобрамицин), хинолоны (например, ципрофлоксацин, левофлоксацин), цефалоспорины (например, цефтазидим, цефепим, цефеперазон, цефпиром, цефтобипрол), антипсевдомональные пенициллины: карбоксипенициллины (например, карбенициллин и тикарциллин) и уреидопенициллины (например, мезлоциллин, азлоциллин и пиперациллин), карбапенемы (например, меропенем, полипинексин, имипенемин), монобактамы (например, азтреонам), но, не ограничиваясь ими.

## 12. Генерация синтетических антител *in vitro* и *ex vivo*.

В одном варианте воплощения изобретения, синтетическое антитело генерируется *in vitro* или *ex vivo*. Например, в одном варианте воплощения изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая синтетическое антитело, может быть введена и экспрессирована в клетке *in vitro* или *ex vivo*. Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии, вектор может легко вводиться в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжи или насекомого любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть трансформирован в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим способами.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и тому подобные. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См. например, Sambrook et al. (2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция.

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы, особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. д. См., например, патенты США № 5,350,674 и №5585362.

Химические средства введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, шарики и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, везикула с искусственной мембраной).

В случае использования невирусной системы доставки, примером средства доставки является липосома. Предполагается использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водной внутренней части липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, которая связывается как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, образовывать комплекс с липосомой, диспергироваться в растворе, содержащем липид, смешиваться с липидом, объединяться с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплексы с мицеллой или иным

образом связываться с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором, не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислоидной структуре в виде мицелл, или в «сжатой» структуре. Они также могут просто вкрапляться в раствор, возможно, образуя агрегаты, не являющиеся однородными по размеру или форме. Липиды - это жирные вещества, которые могут встречаться в природе или синтетические липиды. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды.

### 13. Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах. Следует понимать, что, хотя эти примеры и указывают предпочтительные варианты воплощения изобретения, они приведены в данном описании только для иллюстрации. Специалист в данной области техники может определить основные характеристики этого изобретения используя приведенные выше обсуждения и данные примеры и, не отступая от сущности изобретения и объема, она может вносить различные изменения и модификации в изобретение для его адаптации к различным применениям и условиям. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение показанным и описанным здесь, будут очевидны специалистам в данной области техники из предшествующего описания. Такие модификации также попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### Пример 1

Данные, представленные в настоящем документе, описывают платформу доставки генов антител, использующую сконструированное анти-PCV-F ДНК-кодированное моноклональное антитело (dMAb), которое может обойти многие препятствия, ограничивающие глобальное использование рекомбинантных моноклональных антител (mAb) в качестве профилактических средств, нацеленных на инфекционные заболевания. В результате доставки этого конструкта гена антитела *in vivo* образуются устойчивые системные уровни антител в сыворотке модельных экспериментальных животных. У хлопковых крыс, являющихся золотым стандартом животных, используемых при моделировании PCV-инфекции, наблюдалась устойчивая экспрессия dMAb в сыворотке и присутствие антитела в образцах лаважа легких, что демонстрирует потенциал формирования длительного иммунитета и эффективного биораспределения. Кроме того, сыворотка от животных, несущих dMAb PCV-F, была функционально активной с точки зрения антигенсвязывающего и нейтрализующего живого вируса, а dMAb PCV-F обеспечивал защиту от заражения болезнью. Важно, что в опыте с заражением хлопковых крыс, являющихся золотым стандартом для моделирования PCV инфекции человека, данный dMAb PCV-F обеспечивал защиту от заболевания нижних дыхательных путей. Эти результаты подтверждают значение dMAb в качестве потенциальной

технологической платформы для расширения глобального доступа к иммунопрофилактическим агентам на основе моноклональных антител и борьбы с тяготами инфекционных заболеваний.

Далее описаны материалы и способы.

### **Животные**

Самок мышей Balb/c в возрасте от 4 до 6 недель и хлопковых крыс в возрасте от 6 до 8 недель содержали в группе с произвольным доступом к корму и воде.

### **Лечение животных**

Мышам и хлопковым крысам брили шерсть по линии мышц задних ног. Плазмидную ДНК РСВ-F dMAb составляли с 117,8-128,5 Ед/ \мл человеческой рекомбинантной гиалуронидазы (Hyalenex®, Halozyme, Сан-Диего, Калифорния). Мышам вводили 30 мкл, а хлопковым крысам - 200 мкл внутримышечных (ВМ) инъекций препарата. Глубину инъекции контролировали на 2 мм у мышей и 5 мм у хлопковых крыс. ЭП был доставлен в место инъекции с CELLECTRA-3P®. Массив из трех игольчатых электродов с глубиной введения 3 мм использовали для мышей и с глубиной введения 6 мм для хлопковых крыс. Обработка ЭП состоит из двух наборов импульсов с постоянным током 0,1 А. Второй набор импульсов подается с трехсекундной задержкой. Каждый набор состоит из двух импульсов по 52 мс с задержкой в 198 мс между импульсами.

### **Иммуофлуоресцентное окрашивание**

Через 7 дней после ВМ доставки pDNA ткани мышей и хлопковых крыс собирали, фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине (BBC Biochemical, Стенфорд, Массачусетс) и погружали в 30% (мас./об.) сахарозу (Sigma, Сент-Луи, Миссури) в дистиллированной воде для окрашивания экспрессии dMAb *in vivo*. Затем ткани были внедрены в состав О.С.Т. (Sakura Finetek, Торранс, Калифорния) и быстро заморожены. Замороженные блоки ткани разрезали до толщины 18 мкм.

Для окрашивания экспрессии dMAb *in vitro* трансфицированные клетки 293Т культивировали на предметных стеклах и фиксировали через 3 дня после трансфекции 10% забуференном нейтральном формалине (BBC Biochemical) в течение 10 минут при комнатной температуре и затем промывали ФСБ.

Предметные стекла инкубировали с блокирующим буфером (0,3% (об./об.) Triton-X (Sigma), 2% (об./об.) сыворотки осла в ФСБ) в течение 30 мин, покрытые парафильмом. Антитело козы к IgG-Fc фрагменту антитела человека (Bethyl, Монтгомери, Алабама) разводили 1: 100 в инкубационном буфере (1% (мас./об.) BSA (Sigma), 2% (об./об.) сыворотки осла, 0,3% (об./об.) Triton-X (Sigma) и 0,025% (об./об.) 1 г/мл азида натрия (Sigma) в ФСБ). 150 мкл окрашивающего раствора добавляли к каждому предметному стеклу и инкубировали в течение 2 часов. Предметные стекла промывали 5 минут в 1хФСБ три раза. Антитело козы к IgG AF488 осла (Abscam, Кембридж, Великобритания) разводили 1: 200 в инкубационном буфере и добавляли в каждую секцию по 50 мкл. Предметные стекла промывали после 1 часа инкубации и устанавливали на DAPI-Fluoromount (SouthernBiotech, Бирмингем, Алабама) и накрывали.

Экспрессию конструкций dMAb in vivo и in vitro регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа BX51 (Olympus, Центр Велли, Пенсильвания), оборудованного монохроматической камерой Retiga3000 (QImaging, Суррей, Канада).

#### **ДСН-ПААГ (SDS-PAGE) и Вестерн-блот**

Набор для трансфекции Липофектамин 3000 (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс) использовали для трансфекции адгезивных клеток НЕК 293Т (ATCC® CRL11268™) плазмидами, кодирующими человеческий РСВ IgG и sc-Fv-Fc РСВ-dMAb. Культуральную среду собирали через 72 часа после трансфекции и фильтровали, используя систему вакуумной фильтрации 0,22 мкм Stericup-GP (Millipore, Берлингтон, Массачусетс). Супернатант из клеток, трансфицированных dMAb sc-Fv-Fc РСВ, очищали с использованием спин-колонок Protein A (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя. Элюированный белок концентрировали с помощью центробежного фильтра Amicon Ultra-15 (30 кДа) и количественно определяли с помощью Nanodrop. Супернатант из человеческих трансфицированных IgG РСВ клеток очищали с использованием Protein G GraviTrap (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс) в соответствии с инструкциями производителя. Элюированный белок концентрировали с помощью центробежного фильтра Amicon Ultra-15 (30 кДа). 10 мкг каждого образца наносили на NuPAGE™ 4-12% бис-трис-гель (ThermoFisher). Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standard (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния) был использован в качестве стандартного маркера. Гель переносили на мембрану PVDF с использованием устройства для трансфера iBlot™ 2 (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс). Мембрана была заблокирована козьим гистологическим буфером (1% (мас./об.) BSA (Sigma), 2% (об./об.) козьей сыворотки (Sigma), 0,3% (об./об.) Triton-X (Sigma) и 0,025% (об./об.) 1 г/мл азида натрия (Sigma) в ФСБ) в течение 30 минут при комнатной температуре. Антитела козы против человеческого IgG адсорбированные легкими и тяжелыми цепями антител обезьяны, конъюгированные с HRP (A80-319P, Bethyl) в разведении 1: 5000 в козьем гистологическом буфере, добавляли и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки блота по 5 минут в 1X DPBS (HyClone, Логан, Юта) добавляли козьему антителу против человеческого IgG-Fc-фрагмента HRP (A80-104P, Bethyl) в разведении 1: 5000 в козьем гистологическом буфере и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки блота трижды по 5 минут в 1X DPBS мембрану обрабатывали с использованием ECL™ Prime Western Blotting system (GE Healthcare) и визуализировали с использованием Protein Simple FluorChem System.

#### **Количественное определение dMAb РСВ-F человека в сыворотке животных и БАЛ**

В 96-луночные планшеты для анализа (Thermo Scientific) добавляли 1 мкг/лунку козьего антитела против человеческого IgG Fc-фрагмента (Bethyl) в 1x DPBS (ThermoFisher) и инкубировали в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшеты промывали 0,2% (об./об.) TWEEN в 1xФСБ промывочном буфере и блокировали 10% (об./об.) ФБС в 1xDPBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы сыворотки

разводили в 1% (об./об.) ФСБ в 0,2% (об./об.) TWEEN-1xФСБ, и 100 мкл этой смеси добавляли в промытый аналитический планшет. Кроме того, готовили стандартные разведения очищенного человеческого одноцепочечного антитела в виде серийных разведений 1: 2, начиная с 500 нг/мл в буфере для разведения, и добавляли в двух повторах в каждый аналитический планшет. Образцы и стандарт инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки, планшеты инкубировали в разведении 1: 10000 козьего антитела против человеческого IgG-Fc-фрагмента HRP (Bethyl, A80-104P) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для детекции к промытым планшетам добавляли раствор SureBlue Substrate (Seracare, Milford, MA). Реакцию останавливали, добавляя в аналитические планшеты стоп-раствор TMB (Seracare, Milford, MA) через 6 минут. Оптическую плотность измеряли при 450 нм. Уровень экспрессии в сыворотке интерполировали по стандартной кривой с использованием сигмоидальной четырехпараметрической логистической кривой, подходящей для log концентрации.

#### **Антиген-связывающее ELISA**

Планшеты для анализа покрывали 1 мкг/лунку слитого гликопротеина (Sino Biological, Уэйн, Пенсильвания) (A2) респираторно-синцитиального вируса человека (PCV), разведенного в 1x DPBS (ThermoFisher), и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 1xФСБ-буфером с 0,05% TWEEN. Добавляли 250 мкл/лунку 3% (мас./об.) BSA в 1x ФСБ с 0,05% TWEEN и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы сыворотки разводили в 1% (мас./об.) BSA в 1x ФСБ с 0,05% TWEEN. После промывки планшетов для анализа, образцы сыворотки добавляли в трехкратных серийных разведениях. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки добавляли 100 мкл разбавленного козьего антитела против человеческого IgG-Fc-фрагмента HRP (Bethyl, A80-104P) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для получения сигнала использовали SureBlue/TMB Stop Solution (Seracare, Милфорд, Массачусетс) и считывали оптическую плотность образцов при 450 нм.

#### **Анализ нейтрализующих антител РСВ (снижение на 60%)**

Образцы термообработанных сывороток разводили 1:10 с помощью ЕМЕМ и делали серию разведений 1:4. Разведенные образцы сывороток инкубировали с РСВ (25-50 БОЕ) в течение 1 часа при комнатной температуре и проводили инокуляцию на слившиеся монослои Нер-2 в 24-луночных планшетах в двух повторах. После одного часа инкубации при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, лунки заполняли 0,75% метилцеллюлозной средой. После 4 дней инкубации верхний слой удаляли и клетки фиксировали 0,1% кристаллическим фиолетовым красителем в течение одного часа, а затем промывали и высушивали на воздухе. Соответствующие титры реципрокных нейтрализующих антител определяли в конечной точке при 60% снижения вирусного контроля с использованием статистической программы. Для всех животных в группе были рассчитаны среднее геометрическое ± стандартная ошибка.

## **Исследование хлопковых крыс**

### *Животные:*

Пятнадцать (15) инбредных самок хлопковых крыс *Sigmodon hispidus* в возрасте от 6 до 8 недель (источник: Sigmovir Biosystems, Inc., Роквилль, Мэриленд) содержались и находились под ветеринарным надзором в соответствии с руководящими принципами Национального института здравоохранения и Комитета по уходу за животными Sigmovir с использованием одобренного Комитетом протокола исследований на животных. Хлопковых крыс помещали в прозрачные поликарбонатные клетки по одному и снабжали стандартным кормом для грызунов (Harlan # 7004) и водопроводной водой ad lib.

### *Испытуемый вирус:*

Для снижения дефектных частиц, прототип длинного штамма РСВ/А (АТСС, Манассас, Виргиния) размножали в клетках HEp-2 после серийной очистки бляшек. В данном эксперименте *in vivo* использовали пул вируса, обозначенный как hPCSV/A/Long Lot № 021413, приготовленный в стабилизирующей сахарозной среде и содержащий приблизительно  $2 \times 10^7$  БОЕ/мл. Стоковый материал вируса хранится при минус 80°C и охарактеризован *in vivo* на модели хлопковых крыс для репликации верхних и нижних дыхательных путей.

### *Процедура:*

15 взрослых самок хлопковых крыс (6-8 недель) были разделены на три группы по пять животных в каждой. Животных группы РСВ-dMAb обрабатывали, как описано выше, на 0 день эксперимента. Животным контрольной группы паливизумаба вводили внутримышечно по 0,1 мл 15 мг/кг паливизумаба на 6-й день эксперимента. Третью группу животных оставили без лечения. На 7-й день всем животным вводили  $10^5$  БОЕ РСВ/А/Long (ВМ) в объеме 0,1 мл. Всех животных умерщвляли на 12 день. Легкие собирали единым блоком и разделяли на три части, левая часть использовалась для титрования вируса, а язычковый сегмент использовали для проведения количественного ПЦР.

### *Титрование вируса в легких*

Гомогенаты легких очищали центрифугированием и разбавляли в ЕМЕМ. Конфлюэнтные монослои HEp-2 инфицировали в двух повторах разбавленными гомогенатами в 24-луночных планшетах. После одного часа инкубации при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, лунки заполняли 0,75% метилцеллюлозной средой. После 4 дней инкубации верхний слой удаляли и клетки фиксировали 0,1% кристаллическим фиолетовым красителем в течение одного часа, а затем промывали и высушивали на воздухе. Бляшки подсчитывали и титр вируса выражали в бляшкообразующих единицах на грамм ткани. Вирусные титры рассчитывали для всех животных в группе в данный момент времени как среднее геометрическое+стандартная ошибка.

### *ПЦР в реальном времени легочной ткани*

Суммарную РНК экстрагировали из гомогенизированной легочной ткани с использованием набора RNeasy purification kit (QIAGEN, Валенсия, Калифорния). Один

мкг суммарной РНК использовали для приготовления кДНК с использованием Super Script II RT (Invitrogen) и олиго dT праймера (1 мкл, Invitrogen). Для реакций ПЦР в реальном времени использовался Bio-Rad iQTM SYBR Green Supermix с конечным объемом 25 мкл и с конечной концентрацией праймера 0,5 мкМ. Реакции проводили в двух повторах в 96-луночных блоках. Амплификацию проводили с использованием iCycler Bio-Rad при следующих параметрах: 1 цикл при 95°C в течение 3 минут, затем 40 циклов при 95°C в течение 10 с, 60°C в течение 10 с и 72°C в течение 15 с. Циклы базовой линии и пороговое значение цикла (Ct) рассчитывали с помощью программного обеспечения iQ5 в режиме подбора базовой линии с вычитанием кривой ПЦР. Относительное количественное определение ДНК применялось ко всем образцам. Стандартные кривые получают с использованием серийно разведенного образца кДНК, наиболее обогащенного интересующим транскриптом (например, легкие на 4-й день после первичной инфекции РСВ). Значения Ct нанесены на график против  $\log_{10}$  фактора разведения кДНК. Эти кривые используются для преобразования значений Ct, полученных для разных образцов, в относительные единицы экспрессии. Эти относительные единицы экспрессии затем нормализуют до уровня б-актина мРНК («гена домашнего хозяйства»), экспрессируемого в соответствующем образце. Во время исследований на животных, уровни мРНК выражают как среднее геометрическое  $\pm$  СПСВ для всех животных в группе в данный момент времени.

#### *Статистика*

Статистический анализ был выполнен с использованием GraphPad Prism v.7 с использованием непараметрического двустороннего t-критерия Манна-Уитни.

Далее описаны результаты.

#### **Проектирование конструкта РСВ-F-dMAb**

Анти-РСВ-F dMAb основан на одобренном FDA анти-РСВ mAb, Паливизумабе. Для облегчения разработки молекулы, модели dMAb в форматах как переменных фрагментов (Fv), так и одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) были созданы с использованием Discovery Studio 4.5 (Biovia, Сан-Диего, Калифорния). ScFv моделировали в ориентациях VH-VL и VL-VH с использованием линкера (G4S) 3. На основании результатов моделирования была выбрана ориентация VL-VH, так как было предсказано, что она приведет к наименьшей пертурбации переменных доменов scFv (Фигура 1А). Ген для sc-Fv-Fc РСВ-F dMAb (РСВ-F dMAb) был клонирован в основную цепь pVAX под контролем промотора ЦМВ человека (Фигура 1В). Экспрессия dMAb РСВ-F была подтверждена иммунофлуоресцентным окрашиванием *in vitro* трансфицированных клеток 293Т с помощью пДНК dMAb РСВ-F (Фигура 1С). Окрашивание демонстрирует цитозольную экспрессию РСВ-F-dMAb. Секреция dMAb РСВ-F клетками 293Т была подтверждена с помощью вестерн-блот анализа супернатанта клеточной культуры (Фигура 1D). Как и ожидалось, 2 полосы были обнаружены для Паливизумаб-IgG, представляющих тяжелую (57 кДа) и легкую цепи (26 кДа), и единственная полоса (60 кДа) была обнаружена для одноцепочечной конструкции dMAb

PCB-F.

### **Модель экспрессии dMAb in vivo**

Для оптимальной экспрессии dMAb in vivo был разработан усовершенствованный протокол доставки пДНК.

dMAb пДНК состоит из фермента, разрушающего внеклеточный матрикс (ECM), гиалуронидазы, и доставляется в мышцы электропорацией in vivo. Схема, представленная на Фигуре 2А, описывает платформу dMAb, подчеркивая доставку и экспрессию in vivo. Вкратце, пДНК dMAb доставляется в скелетную мышцу с помощью электропорации. Экспрессия dMAb в месте доставки ВМ может быть визуализирована путем окрашивания человеческого IgG в миоцитах (Фигура 2В). При выработке dMAb миоциты секретируют антительный конструктор в объем циркулирующей крови. DMAb можно измерить в сыворотке крови (Фигура 2С). Экспрессия dMAb может сохраняться месяцами.

### **Экспрессия dMAb PCB-F in vivo у мышей BALB/c**

Экспрессию функциональных dMAb PCB-F оценивали in vivo. Мышам BALB/c вводили в переднюю большеберцовую мышцу 50 мкг пДНК dMAb PCB-F. На 7-й день концентрация dMAb в сыворотке PCB-F в среднем составляла 7500 нг/мл (Фигура 3А). После 7-го дня наблюдалось снижение концентрации в сыворотке, что было связано с повышением ответа хозяина на антинаркотические антитела (ADA), вызванные конструктором ксеногенных антител человека (данные не представлены). Способность экспрессированного dMAb PCB-F связывать антиген PCB-F была подтверждена с помощью ELISA-исследования образцов сыворотки от подвергнутых лечению животных по сравнению с животными без лечения (Фигура 3В). Сыворотка от животных, обработанных конструкцией PCB-dMAb, демонстрирует сильный, зависимый от разведения сыворотки сигнал связывания и демонстрирует «эффект крючка» при более высоких концентрациях в сыворотке. Способность PCB-F связывать in vivo экспрессируемый dMAb PCB-F превращается в функциональную нейтрализацию вируса. Сыворотка, содержащая PCB-F-dMAb, достигает устойчивых титров, нейтрализующих вирус PCB/A, равных  $7 \log_2$  (Фигура 3С). Биораспределение dMAb PCB-F в месте заражения PCB было подтверждено в образцах легочного лаважа. Через 7 дней после введения PCB-F dMAb в большеберцовую мышцу было успешно измерено dMAb в образцах бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), 11,25 моль mAb/г общего белка +/- СПСВ 2,65 (Фигура 3D). Таким образом, ВМ-доставка dMAb PCB-F привела к получению функционального антительного конструктора против PCB-F, который присутствовал в системном кровообращении и в физиологически релевантном сайте естественной инфекции PCB.

### **Экспрессия dMAb PCB-F in vivo у хлопковых крыс**

Хлопковые крысы считаются золотым стандартом модели при моделировании инфекции PCB и лекарственного вмешательства. Хлопковые крысы чувствительны к неадаптированному PCB человека и в 100 раз более восприимчивы к инфекции, чем мыши. Они также отображают многие особенности патологии заболеваний человека [21,

22].

Первоначально способность миоцитов хлопковых крыс экспрессировать конструкции dMAb оценивали после доставки кДНК dMAb РСВ-F в мышцу ноги (Фигура 4А). Затем было проверено, не является ли локальная экспрессия dMAb системной экспрессией. Были измерены устойчивые (более 5 недель) уровни (более 1000 нг/мл) dMAb РСВ-F в сыворотке крови у крыс (Фигура 4В). Функциональность экспрессированного dMAb проверяли в анализе нейтрализации РСВ/А. В анализе уменьшения образования бляшек измеряли средний титр нейтрализации, который был равен 5,4 (Фигура 4С). Биораспределение dMAb в месте заражения РСВ оценивали в жидкости БАЛ.

Средние уровни dMAb РСВ-F в образцах БАЛ от этих животных составляли 10,8 моль/г общего белка (Фигура 4D). Таким образом, доставка пДНК РСВ-F-dMAb в мышцы хлопковых крыс приводила к системному продуцированию функциональных антител, которые нейтрализовали вирус РСВ и присутствовали в легких.

#### **Экспрессированный *in vivo* РСВ-dMAb обеспечивает защиту от заболеваний нижних дыхательных путей**

Способность получать функциональный анти-РСВ-F dMAb у хлопковых крыс подтолкнул нас к проверке эффективности данной платформы в исследовании активной иммунопрофилактики (Фигура 5А). Отдельным группам хлопковых крыс вводили либо РСВ-F-dMAb (группа 1), либо паливизумаб (группа 2), либо оставляли без лечения. Все группы подвергались интраназальному введению  $10^5$  БОЕ РСВ/А/Long на 0 день. Через пять дней после заражения собирали легочную ткань и измеряли вирусную нагрузку. Обе группы 1 и 2 были защищены от заболеваний нижних дыхательных путей, связанных с инфекцией РСВ. Легкие крыс, обработанные dMAb, содержали среднюю вирусную нагрузку в 250 БОЕ (СПСВ=50) через 5 дней после интраназального заражения. Аналогичная вирусная нагрузка была измерена в легких хлопковых крыс, обработанных паливизумабом: 200 БОЕ (СПСВ=0). Для сравнения, легкие необработанных хлопковых крыс содержали высокую вирусную нагрузку в 27520 БОЕ (СПСВ=8408,9) (Фигура 5В). Значительно уменьшенное количество копий вирусного генома в тканях нижних дыхательных путей измеряли с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймера, нацеленного на неструктурный белок 1 (NS1) РСВ. Средние уровни РСВ-мРНК у dMAb (среднее значение мРНК РСВ=0,181, СПСВ=0,050) и у паливизумаба (среднее значение мРНК РСВ=0,032, СПСВ=0,004) у хлопковых крыс были снижены по сравнению с необработанными животными (среднее значение мРНК РСВ=1,175; СПСВ=0,306) (Фигура 5С). Следует отметить, что обработанные dMAb хлопковые крысы были защищены от заболевания нижних дыхательных путей, хотя уровни dMAb в сыворотке РСВ-F были приблизительно в 10 раз ниже, чем измеренные уровни для паливизумаба (Фигура 5D). Таким образом, эти данные продемонстрировали способность платформы АИР, использующей dMAb против РСВ-F, защищать от вирусного заражения на модели заболевания, принадлежащей к золотому стандарту.

## **Защита dMAb от заболеваний нижних дыхательных путей при заражении живым вирусом**

Существует насущная потребность в разработке технологий платформ, которые могут быть использованы для расширения доступа пациентов к профилактическим и терапевтическим моноклональным антителам. Представленная в данном описании работа подчеркивает потенциал платформы доставки генов антител dMAb в достижении этой цели. Данная технология нацелена на РСВ с использованием конструкции dMAb, основанной на одобренном FDA mAb Паливизумабе. Полученные данные демонстрируют успешную экспрессию *in vivo* конструкции dMAb в нескольких доклинических моделях и способность обеспечивать защиту хозяина от заражения вирусом (Фигура 5). Данные, представленные в данном описании и в других недавних отчетах [10-13, 23] подчеркивают характеристики и эффективность платформы dMAb как профилактического варианта множества инфекционных заболеваний.

Успех технологии dMAb зависит от эффективной доставки пДНК хозяину. Доставка dMAb *in vivo* нацелена на миоциты хозяина в скелетных мышцах, которые считаются эндокринным органом, способным хорошо синтезировать и секретировать множество факторов [24]. Кроме того, миоциты чрезвычайно долгоживущие, и, таким образом, совокупность этих характеристик делает мышцы идеальной биологической фабрикой экспрессии высоких уровней трансгенов, которая может сохраняться в течение нескольких месяцев после осуществления доставки [25,26]. Однако, чтобы использовать весь потенциал мышечного сайта в качестве биологической фабрики, продуцирующей mAb, требуется высокоэффективная доставка пДНК dMAb в миоциты. Для оптимизации мышечной доставки dMAb пДНК используется ЭП и ЕСМ-модифицирующий фермент гиалуронидаза.

Отличительная черта этого протокола доставки проявляется в достижении устойчивой экспрессии dMAb в миоцитах в месте доставки (Фигура 2b), что приводит к получению высоких уровней dMAb, секретлируемых в кровотоки (Фигура 2c). Важно отметить, что эта устойчивая экспрессия является длительной. 23-недельная экспрессия против ксеногенного dMAb была продемонстрирована при отсутствии адаптивного иммунного ответа хозяина (Фигура 2C). У хлопковых крыс дикого типа было показано экспрессию длительностью в 39 дней даже в присутствии функционирующей иммунной системы (Фигура 4B). Устойчивая экспрессия является чрезвычайно важным компонентом в иммунопрофилактической модальности и признаком, отсутствующим при использовании обычных рекомбинантных mAb. Например, применение паливизумаба в идеале должно начинаться до начала сезона РСВ, обычно длящегося с ноября по апрель с отклонениями в различных регионах [27]. Его дозировка составляет 15 мг/кг и должна вводиться внутримышечно ежемесячно в течение сезона РСВ. Период полувыведения в сыворотке определен как равный 20 дням [28,29]. С другой стороны, dMAb-аналог паливизумаба постоянно экспрессируется и секретруется, таким образом может поддерживаться эффективный циркулирующий уровень mAb. Однократная доставка dMAb обеспечивает

генерацию защитных mAb в сыворотке пациента в течение сезона РСВ. В подтверждение, в расширенном фармакокинетическом (pK) исследовании на хлопковых крысах (Фигура 4B) и мышях с T-клеточной недостаточностью (Фигура 2C) была доказана циркуляция высоких уровней dMAb РСВ-F человека, остающихся стабильными до 6 недель в течение нескольких месяцев.

Отличительной особенностью антител sc-Fv является их превосходное биораспределение. Благодаря небольшому размеру они эффективно проникают в ткани. Однако их эффективность ограничена периодом полувыведения из сыворотки, составляющим всего более часов. Слияние с белком Fc увеличивает период полувыведения образованной молекулы sc-Fv-Fc из сыворотки с нескольких часов до нескольких дней [30]. Хотя он и не превышает период полувыведения полноразмерной молекулы IgG, он все же демонстрирует лучшее биораспределение из-за своего меньшего размера [31]. РСВ-dMAb был успешно обнаружен в легких мышей и хлопковых крыс (Фигура 3D и 4D). Повышенная способность меньшей молекулы sc-Fv-Fc присутствовать в месте инфицирования РСВ может объяснять аналогичные уровни защиты от заболеваний нижних дыхательных путей (Фигура 5B и Фигура 5C), несмотря на то, что их концентрация в сыворотке в 10 раз ниже (Фигура 5D) в сравнении с Паливизумабом. Для обеспечения более точного сравнения двух молекул и их биораспределения будут разработаны схемы будущих экспериментов обеих конструкций mAb в равных концентрациях в сыворотке животных во время заражения вирусом. Ранее сообщалось о важности биораспределения mAb для предотвращения заболевания нижних дыхательных путей после заражения РСВ. Wu et al. сообщают о более низкой эффективности вариантов паливизумаба *in vivo* из-за плохого биораспределения несмотря на высокую нейтрализующую способность *in vitro* [32]. Tiwari et al. опубликовали многообещающие результаты целенаправленного воздействия на легочную ткань для экспрессии мРНК-кодируемого РСВ-Ab [33].

При том, что для доставки генов антител использовались другие платформы, dMAb обладает множеством преимуществ по сравнению с другими технологиями моноклональных антител на основе нуклеиновых кислот, включая доставку антител на основе вирусного вектора и мРНК. Во-первых, dMAb представляет собой «голую» платформу пДНК, благодаря чему возможно предотвратить образование противовекторного иммунитета, ограничивающего использование доставки генов на основе аденовируса или рекомбинантного аденоассоциированного вируса, как и избежание необходимости использования потенциально токсичных химических носителей платформы доставки. Для использования mAb на основе мРНК обычно необходимы липидные наночастицы [34-36]. Как обсуждалось выше и подчеркивалось данными, представленными в этом исследовании, существует устойчивый, но конечный профиль экспрессии dMAb. Кодированные мРНК антитела имеют значительно более короткие периоды полураспада в сыворотке, более близкие к периодам полураспада рекомбинантных антител, в то время как доставка генов антител аденовирусом или

рекомбинантным аденоассоциированным вирусом может приводить к бесконечной экспрессии, с вытекающими отсюда проблемами безопасности, возникающими из-за возможности интеграции в соматическую ДНК и потенциально неограниченной экспрессии трансгена [37]. Кроме того, в отличие от многих рекомбинантных антител и антител на основе мРНК, доставляющихся внутривенно и требующих наличия значительной инфраструктуры для введения дозировок пациентам, dMAb можно вводить внутримышечно в полевых условиях. Плазмидную ДНК относительно легко производить, что позволяет спроектировать высокорентабельное производство. Готовая плазмидная ДНК устойчива к перепадам температур и не требует лиофилизации, а для ее хранения и распространения не требуется холодовая цепь.

Таким образом, применение платформы dMAb, таргетированной на инфекционное заболевание РСВ в установленных моделях заболевания демонстрирует устойчивые уровни циркулирующей конструкции антитела РСВ в сыворотке и тканях легкого животных. Кроме того, конструкция антитела, экспрессируемая *in vivo*, была функционально активной и обеспечивала защиту от заболеваний нижних дыхательных путей в исследованиях заражения живым вирусом (Фигура 5). Данные результаты подтверждают важность технологии dMAb и ее потенциал в борьбе с глобальной смертностью, вызванной инфекционными заболеваниями.

#### **Ссылки**

1 Nair, H. et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* (London, England) 375, 1545-1555, doi:10.1016/s0140-6736(10)60206-1 (2010).

2 O'Brien, K. L. et al. Efficacy of motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet. Infectious diseases* 15, 1398-1408, doi:10.1016/s1473-3099(15)00247-9 (2015).

3 Griffin, M. P. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI8897, the Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody with an Extended Half-Life, in Healthy Adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61, doi:10.1128/aac.01714-16 (2017).

4 Ambrose, C. S., Chen, X. & Kumar, V. R. A population-weighted, condition-adjusted estimate of palivizumab efficacy in preventing PCB-related hospitalizations among US high-risk children. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10, 2785-2788, doi:10.4161/hv.32082 (2014).

5 Qin, Y., Guo, H., Tang, B. & Yang, S. M. The non-reverse transcriptase activity of the human telomerase reverse transcriptase promotes tumor progression (review). *International journal of oncology* 45, 525-531, doi:10.3892/ijo.2014.2470 (2014).

6 Subramanian, K. N. et al. Safety, tolerance and pharmacokinetics of a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. MEDI-493 Study Group. *The Pediatric infectious disease journal* 17, 110-115 (1998).

7 Tjelle, T. E. et al. Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 9, 328-336, doi:10.1016/j.ymthe.2003.12.007 (2004).

8 Schultheis, K. et al. in *MOLECULAR THERAPY*. 269-269 (CELL PRESS 50 HAMPSHIRE ST, FLOOR 5, CAMBRIDGE, MA 02139 USA).

9 McMahon, J. M., Signori, E., Wells, K. E., Fazio, V. M. & Wells, D. J. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage. *Gene therapy* 8, 1264-1270, doi:10.1038/sj.gt.3301522 (2001).

10 Elliott, S. T. C. et al. DMAb inoculation of synthetic cross reactive antibodies protects against lethal influenza A and B infections. *NPJ Vaccines* 2, 18, doi:10.1038/s41541-017-0020-x (2017).

11 Patel, A. et al. An engineered bispecific DNA-encoded IgG antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* in a pneumonia challenge model. *Nat Commun* 8, 637, doi:10.1038/s41467-017-00576-7 (2017).

12 Wang, Y. et al. Anti-OspA DNA-Encoded Monoclonal Antibody Prevents Transmission of Spirochetes in Tick Challenge Providing Sterilizing Immunity in Mice. *J Infect Dis*, doi:10.1093/infdis/jiy627 (2018).

13 Muthumani, K. et al. Rapid and Long-Term Immunity Elicited by DNA-Encoded Antibody Prophylaxis and DNA Vaccination Against Chikungunya Virus. *J Infect Dis* 214, 369-378, doi:10.1093/infdis/jiw111 (2016).

14 Andrews, C. D. et al. In Vivo Production of Monoclonal Antibodies by Gene Transfer via Electroporation Protects against Lethal Influenza and Ebola Infections. *Molecular therapy. Methods & clinical development* 7, 74-82, doi:10.1016/j.omtm.2017.09.003 (2017).

15 Muthumani, K. et al. Novel prostate cancer immunotherapy with a DNA-encoded anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody. *Cancer Immunol Immunother* 66, 1577-1588, doi:10.1007/s00262-017-2042-7 (2017).

16 Hollevoet, K., De Smidt, E., Geukens, N. & Declerck, P. Prolonged in vivo expression and anti-tumor response of DNA-based anti-HER2 antibodies. *Oncotarget* 9, 13623-13636, doi:10.18632/oncotarget.24426 (2018).

17 Repp, R. et al. Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *Journal of immunological methods* 373, 67-78, doi:10.1016/j.jim.2011.08.003 (2011).

18 Unverdorben, F. et al. Pharmacokinetic properties of IgG and various Fc fusion proteins in mice. *mAbs* 8, 120-128, doi:10.1080/19420862.2015.1113360 (2016).

19 Smith, T. R. F. et al. Development of an intradermal DNA vaccine delivery strategy to achieve single-dose immunity against respiratory syncytial virus. *Vaccine* 35, 2840-2847, doi:10.1016/j.vaccine.2017.04.008 (2017).

20 Coates, H. V., Alling, D. W. & Chanock, R. M. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Am J Epidemiol* 83, 299-313

(1966).

21 Prince, G. A. et al. Efficacy and safety studies of a recombinant chimeric respiratory syncytial virus FG glycoprotein vaccine in cotton rats. *Journal of virology* 74, 10287-10292 (2000).

22 Prince, G. A. et al. Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin-inactivated virus. *Journal of virology* 57, 721-728 (1986).

23 Patel, A. et al. In Vivo Delivery of Synthetic Human DNA-Encoded Monoclonal Antibodies Protect against Ebolavirus Infection in a Mouse Model. *Cell reports* 25, 1982-1993.e1984, doi:10.1016/j.celrep.2018.10.062 (2018).

24 Iizuka, K., Machida, T. & Hirafuji, M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *Journal of pharmacological sciences* 125, 125-131 (2014).

25 Mir, L. M., Bureau, M. F., Rangara, R., Schwartz, B. & Scherman, D. Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 321, 893-899 (1998).

26 Maruyama, H. et al. Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats. *Gene therapy* 8, 461-468, doi:10.1038/sj.gt.3301412 (2001).

27 Rose, E. B., Wheatley, A., Langley, G., Gerber, S. & Haynes, A. Respiratory Syncytial Virus Seasonality - United States, 2014-2017. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 67, 71-76, doi:10.15585/mmwr.mm6702a4 (2018).

28 Robbie, G. J., Zhao, L., Mondick, J., Losonsky, G. & Roskos, L. K. Population Pharmacokinetics of Palivizumab, a Humanized Anti-Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, in Adults and Children. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 4927-4936, doi:10.1128/aac.06446-11 (2012).

29 Griffin, M. P. et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of MEDI8897, the Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-Targeting Monoclonal Antibody with an Extended Half-Life, in Healthy Adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 61, e01714-01716, doi:10.1128/AAC.01714-16 (2017).

30 Unverdorben, F. et al. Pharmacokinetic properties of IgG and various Fc fusion proteins in mice. *mAbs* 8, 120-128, doi:10.1080/19420862.2015.1113360 (2015).

31 Kontermann, R. E. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 23, 93-109, doi:10.2165/00063030-200923020-00003 (2009).

32 Wu, H. et al. Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *Journal of molecular biology* 368, 652-665, doi:10.1016/j.jmb.2007.02.024 (2007).

33 Tiwari, P. M. et al. Engineered mRNA-expressed antibodies prevent respiratory syncytial virus infection. *Nature communications* 9, 3999-3999, doi:10.1038/s41467-018-06508-

3 (2018).

34 Pardi, N. et al. Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun* 8, 14630, doi:10.1038/ncomms14630 (2017).

35 Pardi, N. et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 217, 345-351, doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.007 (2015).

36 Thran, M. et al. mRNA mediates passive vaccination against infectious agents, toxins, and tumors. *EMBO molecular medicine*, doi:10.15252/emmm.201707678 (2017).

37 Dismuke, D. J., Tenenbaum, L. & Samulski, R. J. Biosafety of recombinant adeno-associated virus vectors. *Current gene therapy* 13, 434-452 (2013).

### Пример 2

В данном документе описывается сконструированный одноцепочечный переменный фрагмент анти-PCB-F (scFv) DMAb (Таблица 1). Доставка *in vivo* гена этого антительного конструкта приводила к устойчивым системным уровням антител в сыворотке мышей. Эквивалентные уровни были связаны с защитой от заболеваний нижних дыхательных путей, вызванных инфицированием PCB. У хлопковых крыс, являющихся золотым стандартом при моделировании человеческого заболевания, вызванного инфекцией PCB, наблюдается поддержание сывороточной экспрессии DMAb до 60 дней после доставки. Антитела также были обнаружены в образцах лаважа легких, что свидетельствует об эффективном биораспределении. Кроме того, сыворотка животных, несущих PCB-F scFv DMAb, была функционально активна в отношении связывания антигена и нейтрализации живого вируса. Эти результаты подтверждают важность роли dMAb как перспективной платформы для внедрения иммунопрофилактики на основе моноклональных антител в качестве экономичного и эффективного варианта борьбы с инфекционными заболеваниями.

Таблица 1 Плазмиды PCB DMAb

<b>DMAb</b>	<b>описание</b>	<b>Fc/конформация</b>	<b>Протокол доставки</b>
<b>9206</b>	Мотавизумаб	человеч. IgG	30мин пре-tx Sigma-HYA
<b>9368</b>	Паливизумаб	человеч. IgG	Ко-формуляция Intropharma HYA
<b>9369</b>	Паливизумаб	человеч. IgG sc-Fv	Ко-формуляция Intropharma HYA
<b>9370</b>	Паливизумаб	мыш. IgG	Ко-формуляция Intropharma HYA
<b>9371</b>	Паливизумаб	мыш. IgG sc-Fv	Ко-формуляция Intropharma HYA
<b>9283</b>	ADImab	человеч. IgG	Ко-формуляция гиалуронидазы

### Пример 3

В описании представлены данные о сконструированном анти-PCB-F dMAb, а также оптимизированный протокол доставки. Кинетика и величина системной экспрессии dMAb измеряются как концентрация dMAb sc-FV IgG в сыворотке животных. Биораспределение исследуют путем измерения образцов лаважа легких животных,

подверженных лечению. DMAb, экспрессируемые *in vivo*, также тестировали на функциональность связывания и нейтрализующей способности.

Представленные в данном документе данные раскрывают создание плазмидной ДНК, кодирующей sc-Fv анти-PCV, с улучшенным профилем экспрессии *in vivo* по сравнению с полноразмерным человеческим IgG. Для дальнейшего повышения системной экспрессии использовали оптимизированный протокол доставки. Оптимизированный состав увеличивает дисперсию плазмидной ДНК за счет модификации внеклеточного матрикса ткани-мишени. Электропорация увеличивает клеточное поглощение молекул ДНК клетками-мишенями. Функциональность экспрессируемого *in vivo* человеческого sc-Fv в сыворотке мышей, подверженных лечению, на предмет связывания с со слитым белком PCV (PCV-F) и нейтрализации живого вируса PCV-A была подтверждена *in vitro*. Помимо экспрессии на сывороточном уровне, экспрессируемый *in vivo* человеческий sc-Fv также был обнаружен в легких - месте локализации естественной PCV-инфекции. Затем способ дозирования и доставки был испытан на хлопковых крысах - стандартной доклинической модели при разработке PCV-профилактики.

Доставка этого dMAb *in vivo* приводила к устойчивым системным уровням антител в сыворотке мышей (Фигура 12). Соответствующие уровни рекомбинантного павилизумаба обеспечивают защиту от заболеваний нижних дыхательных путей после инфицирования PCV. У хлопковых крыс, являющихся золотым стандартом при моделировании человеческого заболевания, вызванного инфекцией PCV, наблюдается системная сывороточная экспрессия DMAb до 60 дней после доставки (Фигура 13). Антитела также были обнаружены в образцах лаважа легких, что свидетельствует об эффективном биораспределении (Фигура 12). Кроме того, сыворотка животных, несущих PCV-F DMAb, была функционально активна в отношении связывания антигена и нейтрализации живого вируса (Фигура 12 и Фигура 14).

Описанные результаты предполагают, что человеческий анти-PCV sc-Fv dMAb может быть эффективной альтернативой серийным инъекциям mAb-белка в течение PCV-сезона. PCV-dMAb потенциально может преодолеть некоторые препятствия, связанные с пассивной иммунизацией.

#### Пример 4

Представленные в данном документе данные демонстрируют эффективность PCV dMAb на модели хлопковых крыс, инфицированных человеческим PCV.

Далее описаны материалы и способы.

#### **Внутримышечная доставка пДНК**

Мышам и хлопковым крысам брили шерсть по линии мышц задних ног. Плазмидную ДНК PCV-F dMAb ко-формулировали совместно с 128,5 ед./мл гиалуронидазы для мышей и 117,8 ед./мл для хлопковых крыс в 1x растворе цитрата и хлорида натрия.

Мышам вводили 30 мкл, а хлопковым крысам - 200 мкл внутримышечно (Фигура 15). Глубину инъекции контролировали на 2мм у мышей и 5мм у хлопковых крыс. Через

60 секунд после инъекции пДНК ЭП был доставлен в место инъекции с помощью CELLECTRA-3P®. Массив из трех игольчатых электродов с глубиной введения 3мм использовали для мышей и с глубиной введения 6мм для хлопковых крыс.

#### **Количественное определение dMAb РСВ-F человека в сыворотке животных**

В 96-луночные планшеты для анализа (Thermo Scientific™ Nunc™) добавляли 1 мкг/лунку козьего антитела против человеческого IgG Fc-фрагмента (Bethyl, Техас) в 1х DPBS (ThermoFisher, Массачусетс) и инкубировали в течение ночи при 4 °С. На следующий день планшеты промывали 0,2% (об./об.) TWEEN в 1хФСБ промывочном буфере и блокировали 10% (об./об.) ФБС в 1хDPBS в течение 1 часа при комнатной температуре.

Образцы сыворотки разводили в 1% (об./об.) ФБС в 0,2% (об./об.) TWEEN-1хФСБ, и 100 мкл этой смеси добавляли в аналитический планшет после следующего этапа промывки. Кроме того, в буфере для разведения готовили стандартные разведения очищенной легкой каппа-цепи человека (Bethyl, Техас) и добавляли в каждый аналитический планшет. Образцы и стандарт инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки, планшеты инкубировали в разведении 1: 10000 козьего антитела против человеческого IgG-каппа-фрагмента легкой цепи HRP (Bethyl, Техас) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для детекции к промытым планшетам добавляли раствор SureBlue Substrate (KPL, Мэриленд). Реакцию останавливали, добавляя в аналитические планшеты стоп-раствор ТМВ (KPL, Мэриленд) через 6 минут. Оптическую плотность измеряли при 450 нм. Уровень экспрессии в сыворотке интерполировали по стандартной кривой с использованием сигмоидальной четырехпараметрической логистической кривой, подходящей для log концентрации.

#### **Исследование хлопковых крыс**

##### *Животные:*

Пятнадцать (15) инбредных самок хлопковых крыс *Sigmodon hispidus* в возрасте от 6 до 8 недель (Источник: Sigmovir Biosystems, Inc., Роквилль, Мэриленд) испытывали и содержали под ветеринарным контролем. Хлопковых крыс помещали в прозрачные поликарбонатные клетки по одному и снабжали стандартным кормом для грызунов (Harlan # 7004) и водопроводной водой ad lib.

##### *Испытуемый вирус:*

Для снижения дефектных частиц, прототип длинного штамма РСВ/А (АТСС, Манассас, Виргиния) размножали в клетках HEp-2 после серийной очистки бляшек. В данном эксперименте in vivo использовали пул вируса, обозначенный как hPCV/A/Long Lot № 021413, приготовленный в стабилизирующей сахарозной среде и содержащий приблизительно  $2 \times 10^7$  БОЕ/мл. Стоковый материал вируса хранится в условиях минус 80°C и охарактеризован in vivo на модели хлопковых крыс для репликации верхних и нижних дыхательных путей.

##### *Процедура:*

15 взрослых самок хлопковых крыс (6-8 недель) были разделены на три группы по

пять животных в каждой. Животных группы РСВ-dMAb обрабатывали, как описано выше, на 0 день эксперимента. Животным контрольной группы паливизумаба вводили внутримышечно по 0,1 мл 15 мг/кг паливизумаба на 6-й день эксперимента. Третью группу животных оставили без лечения.

На 7-й день всем животным вводили  $10^5$  БОЕ РСВ/A/Long (BM) в объеме 0,1 мл. Всех животных умерщвляли на 12 день. Носовые ткани собирали для дальнейшей титрации вируса. Легкие собирали единым блоком и разделяли на три части, левая часть использовалась для титрования вируса, а язычковый сегмент использовали для проведения количественного ПЦР.

#### *Титрация вируса из носовых и легочных тканей*

Гомогенаты легких и носовых тканей очищали центрифугированием и разбавляли в ЕМЕМ. Конфлюентные монослои HEp-2 инфицировали в двух повторах разбавленными гомогенатами в 24-луночных планшетах. После одного часа инкубации при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>, лунки заполняли 0,75% метилцеллюлозной средой. После 4 дней инкубации верхний слой удаляли и клетки фиксировали 0,1% кристаллическим фиолетовым красителем в течение одного часа, а затем промывали и высушивали на воздухе. Бляшки подсчитывали и титр вируса выражали в бляшкообразующих единицах на грамм ткани. Вирусные титры рассчитывали для всех животных в группе в данный момент времени как среднее геометрическое + стандартная ошибка.

#### *ПЦР в реальном времени*

Суммарную РНК экстрагировали из гомогенизированной легочной ткани с использованием набора RNeasy purification kit (QIAGEN). Один мкг суммарной РНК использовали для приготовления кДНК с использованием Super Script II RT (Invitrogen) и олиго dT праймера (1 мкл, Invitrogen). Для реакций ПЦР в реальном времени использовался Bio-Rad iQTM SYBR Green Supermix с конечным объемом 25 мкл и с конечной концентрацией праймера 0,5 мкМ. Реакции проводили в двух повторах в 96-луночных блоках. Амплификацию проводили с использованием iCycler Bio-Rad при следующих параметрах: 1 цикл при 95°C в течение 3 минут, затем 40 циклов при 95°C в течение 10 с, 60°C в течение 10 с и 72°C в течение 15 с. Циклы базовой линии и пороговое значение цикла (Ct) рассчитывали с помощью программного обеспечения iQ5 в режиме подбора базовой линии с вычитанием кривой ПЦР. Относительное количественное определение ДНК применялось ко всем образцам. Стандартные кривые получают с использованием серийно разведенного образца кДНК, наиболее обогащенного интересующим транскриптом (например, легкие на 4-й день после первичной инфекции РСВ). Значения Ct нанесены на график против log<sub>10</sub> фактора разведения кДНК. Эти кривые используются для преобразования значений Ct, полученных для разных образцов, в относительные единицы экспрессии. Эти относительные единицы экспрессии затем нормализуют до уровня б-актина мРНК («гена домашнего хозяйства»), экспрессируемого в соответствующем образце. Во время исследований на животных, уровни мРНК выражают как среднее геометрическое ± СПСВ для всех животных в группе в данный

момент времени.

Далее описаны результаты.

### **Экспрессия dMAb РСВ-F *in vivo* у хлопковых крыс**

Хлопковые крысы приблизительно в 4-5 раз больше тяжелее мышей. Для адаптации этих более крупных грызунов, в протоколе лечения объем инъекции был изменен на больший - 200 мкл, а так же была использована большая глубина инъекции и проникновения электродов для электропорации, как описано это в предыдущем исследовании РСВ-F вакцины для хлопковых крыс (Smith et al., 2017, Vaccine 35 (21): 2840-47).

Для достижения более высоких системных уровней РСВ-dMAb количество участков доставки было увеличено до 6 на одно животное, где общая доза, которую доставляли, составляла 2,4 мг dMAb pDNA. Средний уровень dMAb в сыворотке был измерен через 7 дней после доставки указанной оптимальной дозы и дня заражения живым вирусом, который был равен 1384,5 нг/мл (Ст.откл. = 189,1, n=4). Экспрессия РСВ-dMAb оставалась стабильной до конца экспериментального заражения. На 12 день после обработки сыворотка хлопковой крысы содержала среднюю концентрацию dMAb =1455,5 нг/мл (ст. откл. = 345,7, n=4) (Фигура 15).

Для сравнения, средний сывороточный уровень человеческого IgG через день после инъекции 15 мг/кг паливизумаба составил 15290,3 нг/мл (ст.откл. = 6486,7, n=4) и снизился до средней сывороточной концентрации 10096,6 нг/мл (ст.откл. = 2110,7, n=5) через 5 дней после инъекции.

### **Экспрессированный *in vivo* РСВ-dMAb обеспечивает защиту от заболеваний нижних дыхательных путей**

При заражении живым вирусом РСВ-A хлопковые крысы, обработанные dMAb, были аналогичным образом защищены от инфекции нижних дыхательных путей, хотя уровень экспрессии РСВ-dMAb был почти в 10 раз ниже, чем уровни в сыворотке после инъекции паливизумаба (Фигура 16). Легкие крыс, обработанные dMAb, содержали среднюю вирусную нагрузку в 250 БОЕ (СПСВ=50, n=4) через 5 дней после интраназального заражения. Аналогичная вирусная нагрузка была измерена в легких хлопковых крыс, обработанных паливизумабом: 200 БОЕ (СПСВ=0, n=5). Для сравнения, легкие необработанных хлопковых крыс содержали высокую вирусную нагрузку в 27520 БОЕ (СПСВ=8408,9, n=5).

Такая же тенденция к уменьшению инфицирования ткани нижних дыхательных путей была обнаружена при измерении числа копий вирусного генома с помощью ПЦР в реальном времени с использованием праймера, нацеленного на неструктурный белок 1 (NS1) РСВ. Средние уровни РСВ мРНК для dMAb (среднее значение мРНК РСВ= 0,181, СПСВ= 0,050, n=4) и паливизумаба (среднее значение мРНК РСВ= 0,032, СПСВ=0,004, n=5) подверженных обработке хлопковых крыс были снижены по сравнению с неподверженными лечению животными (среднее значение мРНК РСВ=1,175, СПСВ=0,306, n=5).

## **Заключение**

Хлопковая крыса является золотым стандартом для моделирования РСВ-инфекции человека. Эти животные восприимчивы к неадаптированному человеческому РСВ и проявляют многие особенности вирус-специфической патологии человека, включая симптомы болезни, усиленной вакциной (VED), после иммунизации формалин-инактивированной вакциной против РСВ 1960 года.

Паливизумаб (Synagis) в настоящее время является единственным одобренным FDA профилактическим средством для защиты младенцев, входящих в группу высокого риска от РСВ-ассоциированного заболевания нижних дыхательных путей и госпитализации. Как и большинство способов лечения на основе моноклональных антител, лечение паливизумабом является дорогостоящим и, из-за повышенной термочувствительности, его применение в основном ограничено условиями с наличием высокоразвитой инфраструктуры.

Протеин-паливизумаб и оптимизированная конструкция dMAb на основе паливизумаба продемонстрировали аналогичную защиту от инфекции нижних дыхательных путей после РСВ-инфекции на наиболее подходящей доклинической модели. В общем, производство конструкций dMAb является рентабельным, а плазмидные ДНК устойчивы к температуре.

Моноклональные антитела на основе ДНК в сочетании с оптимизированными протоколами доставки становятся выгодной альтернативой белковым моноклональным антителам.

Понятно, что приведенное выше подробное описание и сопровождающие примеры являются только иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения, который определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Различные изменения и модификации раскрытых вариантов воплощения будут очевидны специалистам в данной области техники. Такие изменения и модификации, включая, помимо прочего, те, которые относятся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным соединениям, синтезу, композициям, рецептурам или способам использования изобретения, могут быть сделаны без отступления от его сущности и объема.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая одно или более синтетических антител, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одно положение, выбранное из группы, состоящей из: а) нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело против респираторно-синцитиального вируса (РСВ); б) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент синтетического антитела против РСВ;

в) нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело ScFv против РСВ; и

г) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент синтетического антитела ScFv против РСВ.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что одно или более синтетических антител связываются с антигеном РСВ.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.2, отличающаяся тем, что антиген выбран из группы, состоящей из РСВ-F, РСВ-G, РСВ-Ga, РСВ-Gb, РСВ-M2-1, РСВ M2-2 и любой их комбинации.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело против РСВ.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.5, отличающаяся тем, что она содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID № 7, и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID №: 1-6; или фрагмент аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID № 7 и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.6, отличающаяся тем, что она содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID № 1-6, или фрагмент нуклеотидной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичный SEQ ID № 1-6.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность.

9. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из п.п.1-8 формулы изобретения, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит вектор экспрессии.

10. Композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 1-9

формулы изобретения.

11. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

12. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что дополнительно содержит гиалуронидазу.

13. Моноклональное антитело против РСВ, включающее аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID № 7, и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID №: 1-6; или фрагмента аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90% гомологичного аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID № 7 и аминокислотной последовательности, кодируемой одной из SEQ ID № 1-6.

14. Способ предотвращения или лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 1-9 или композиции по любому из п.п. 10-12.

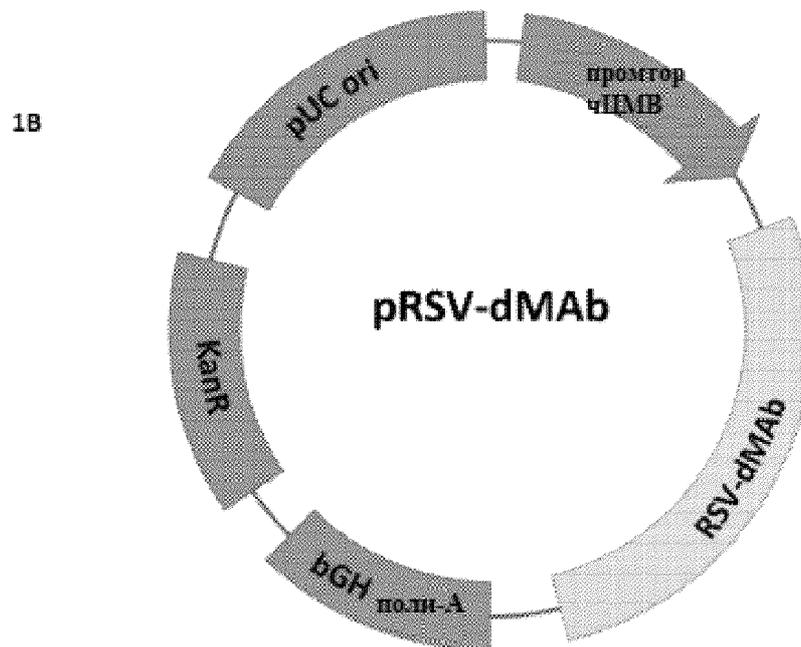
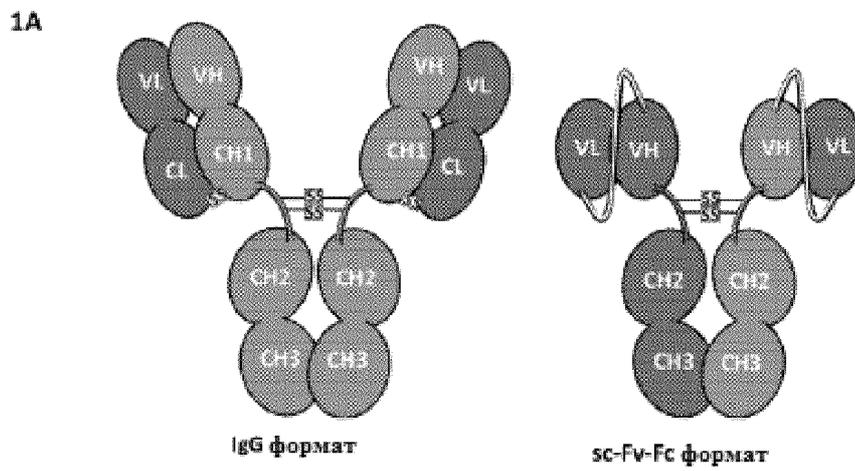
15. Способ по п.13, отличающийся тем, что заболевание представляет собой инфекцию респираторно-синцитиального вируса.

16. Состав, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

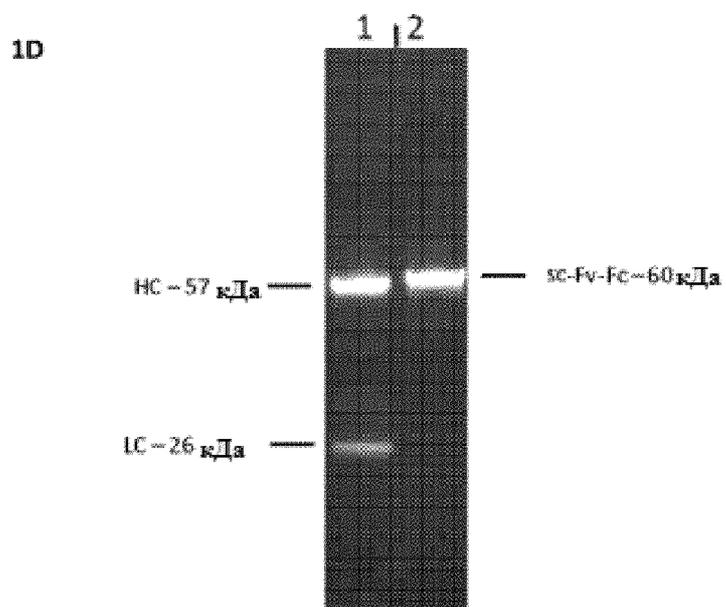
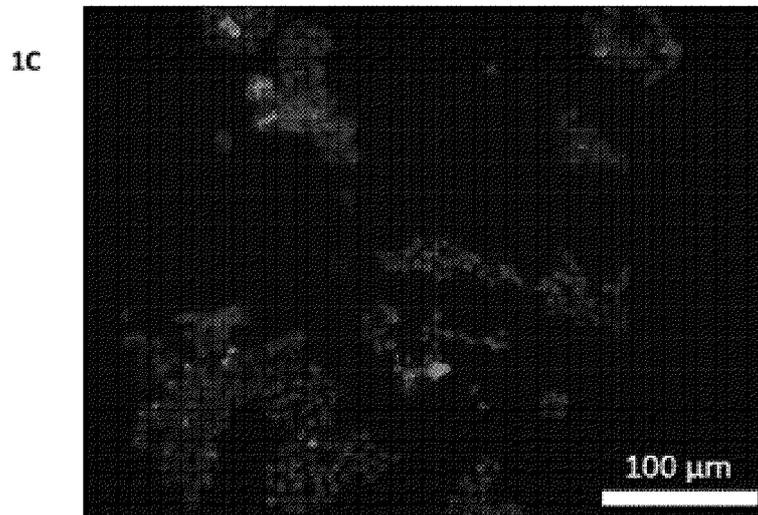
17. Состав по п.16 формулы изобретения, отличающийся тем, что дополнительно содержит гиалуронидазу.

По доверенности

1/20

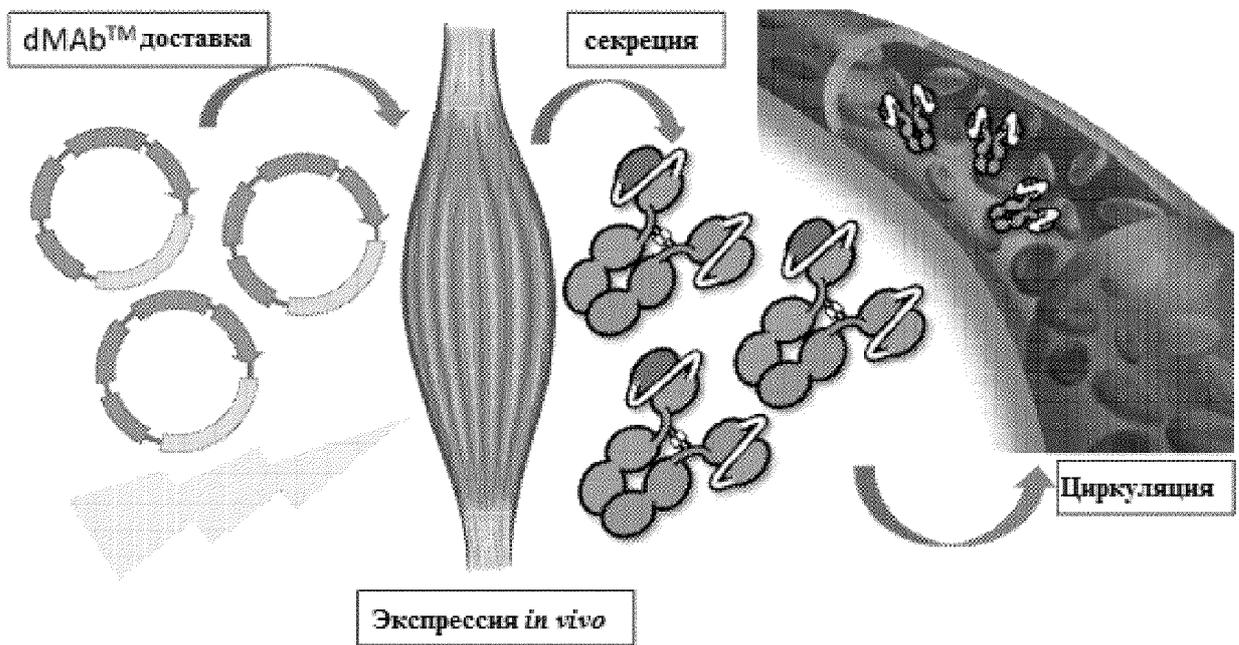


Фигура 1

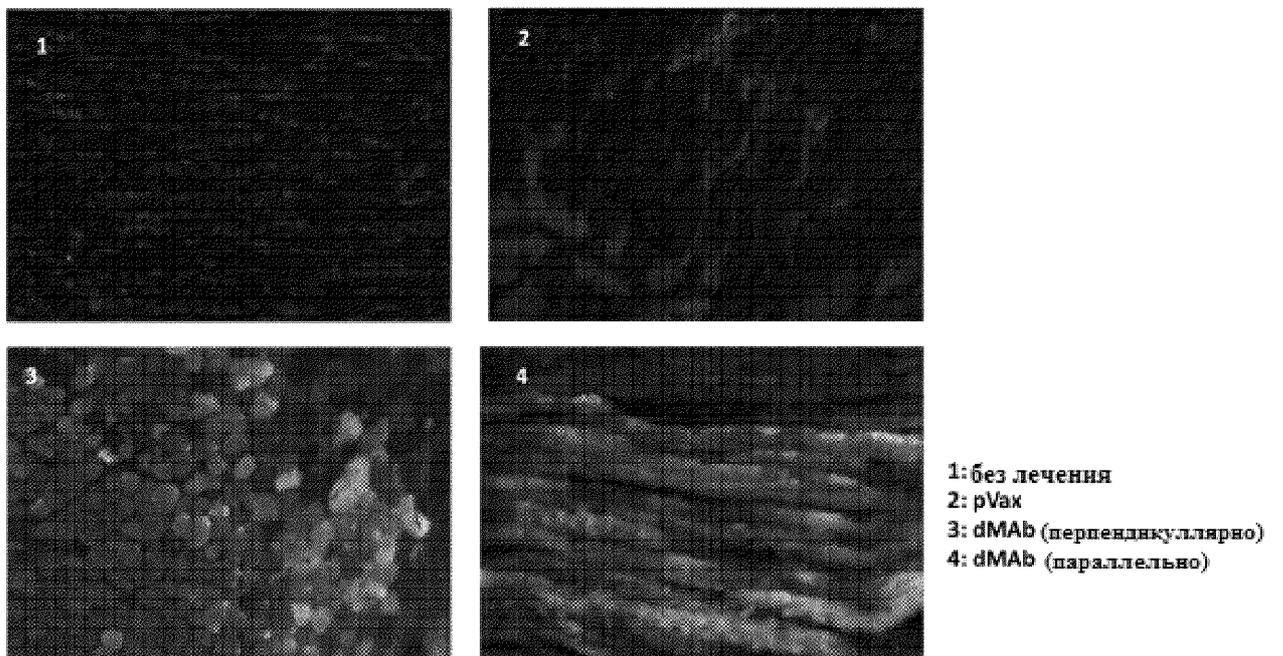


Фигура 1 (продолжение)

2A

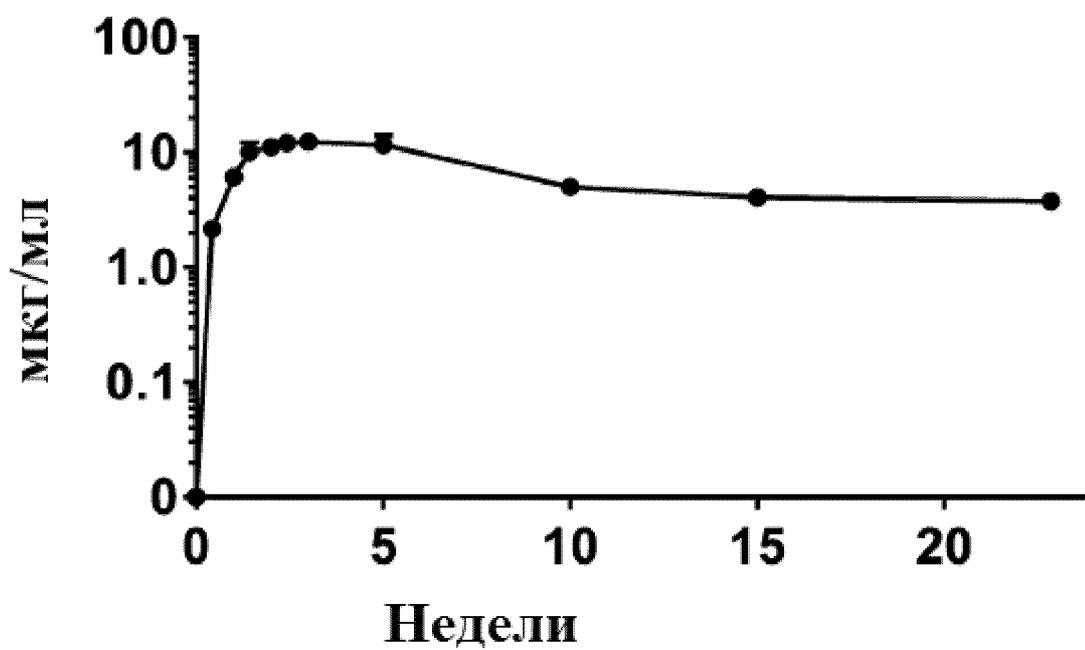


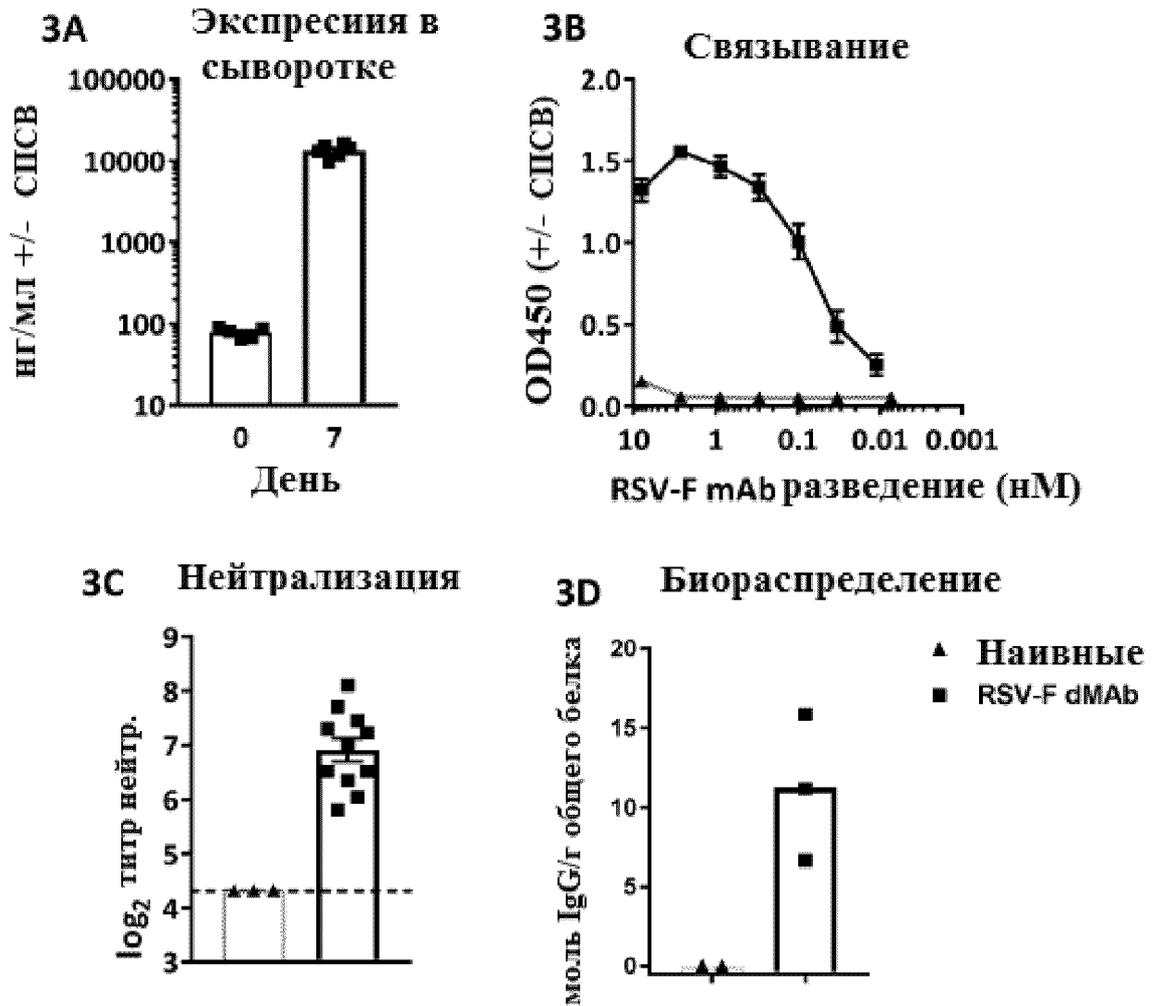
Фигура 2



**Фигура 2 (продолжение)**

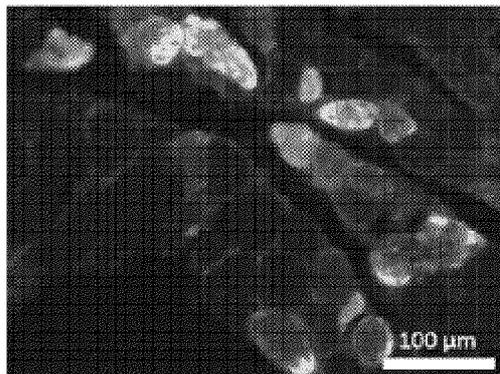
2С

**Фигура 2 (продолжение)**

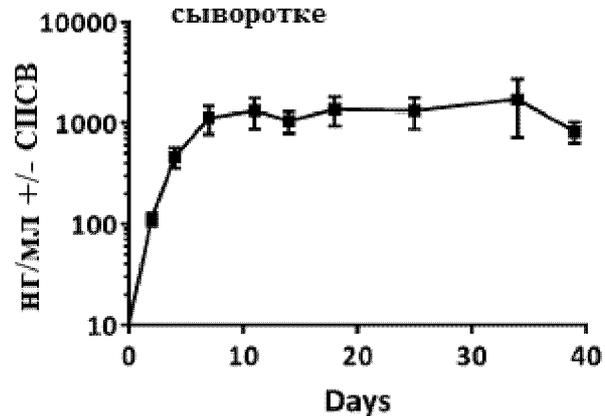


Фигура 3

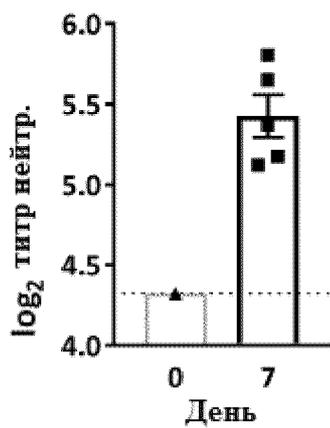
4А Экспрессия в тканях



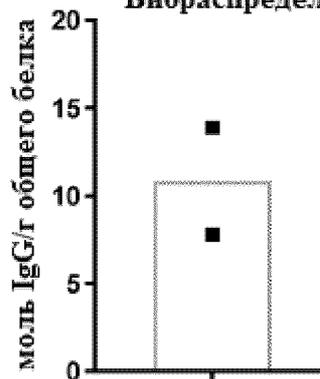
4В Кинетика экспрессии в сыворотке



4С Нейтрализация

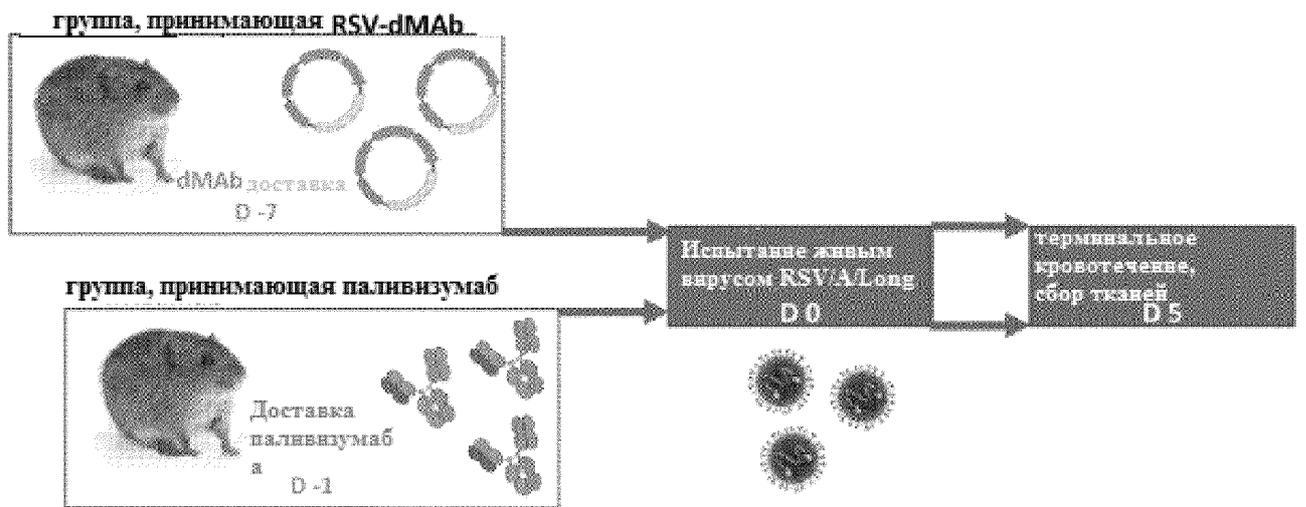


4D Биораспределение

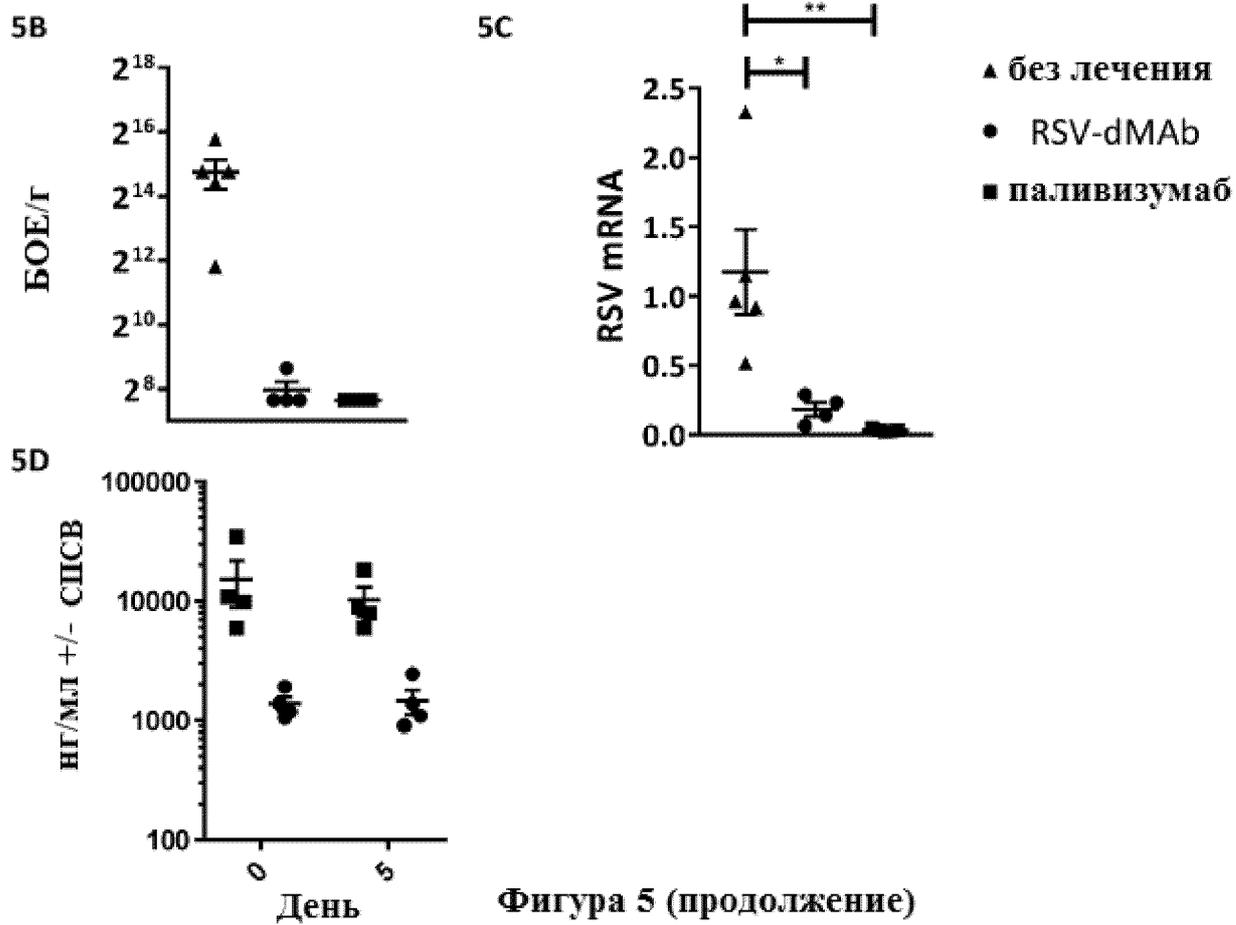


Фигура 4

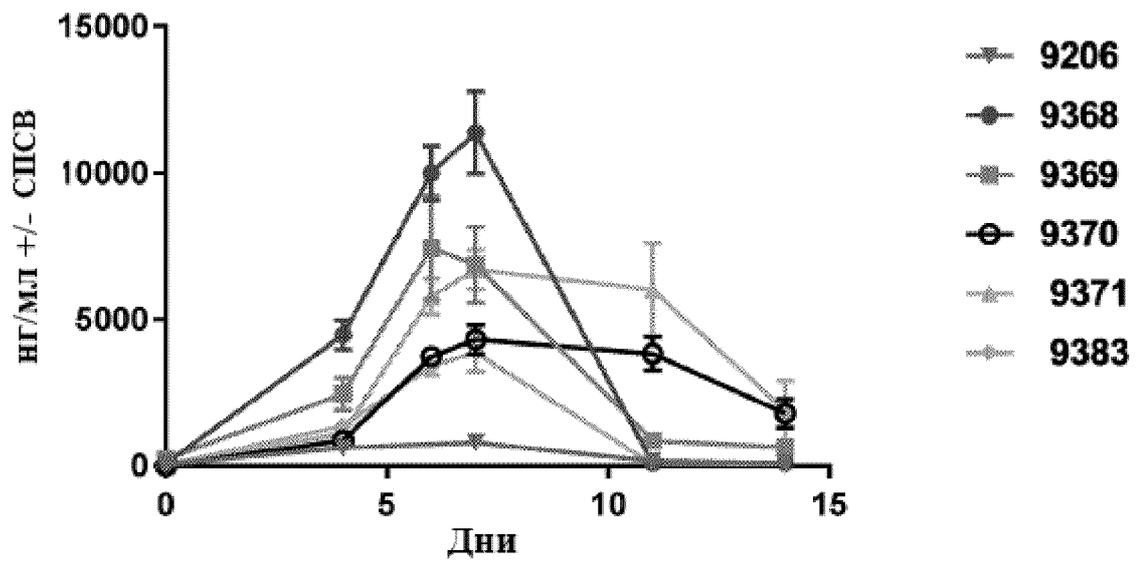
5A



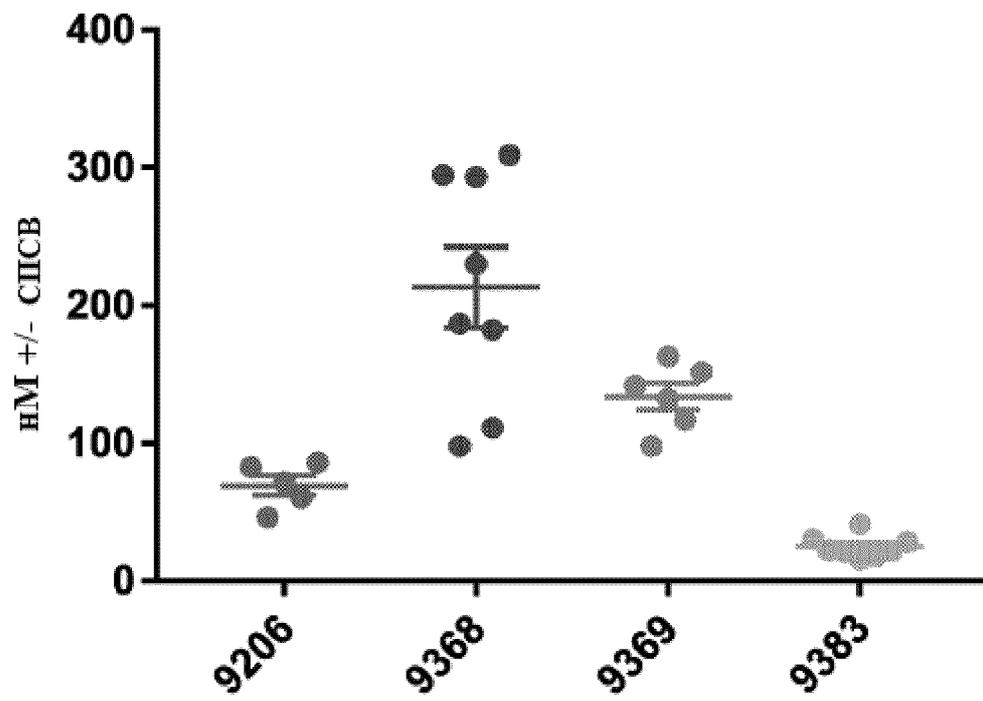
Фигура 5

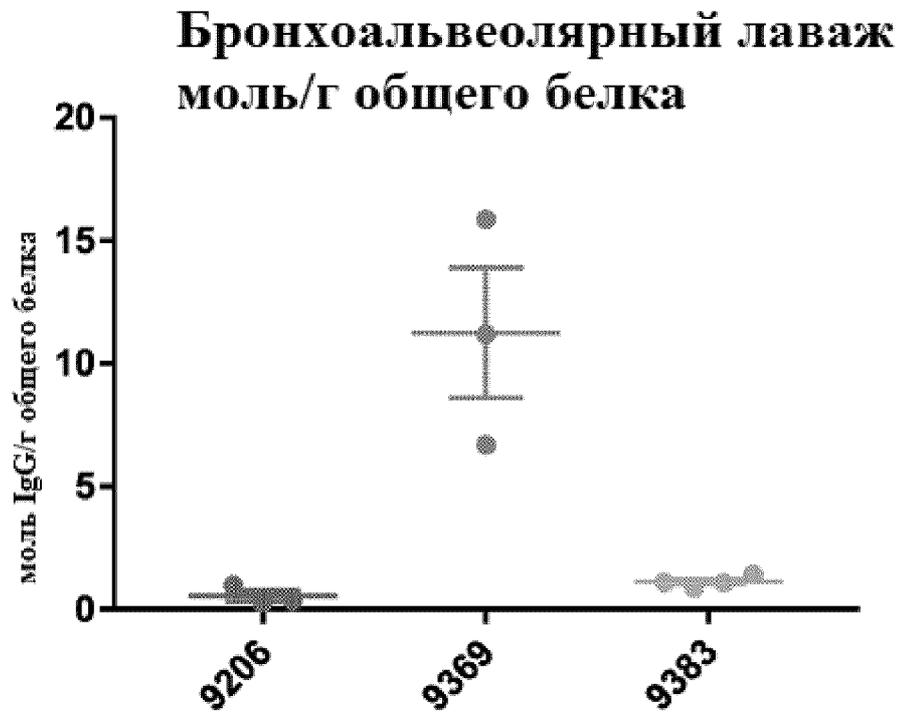


## Фармакокинетика РСВ DMAb (50 мкг доза)

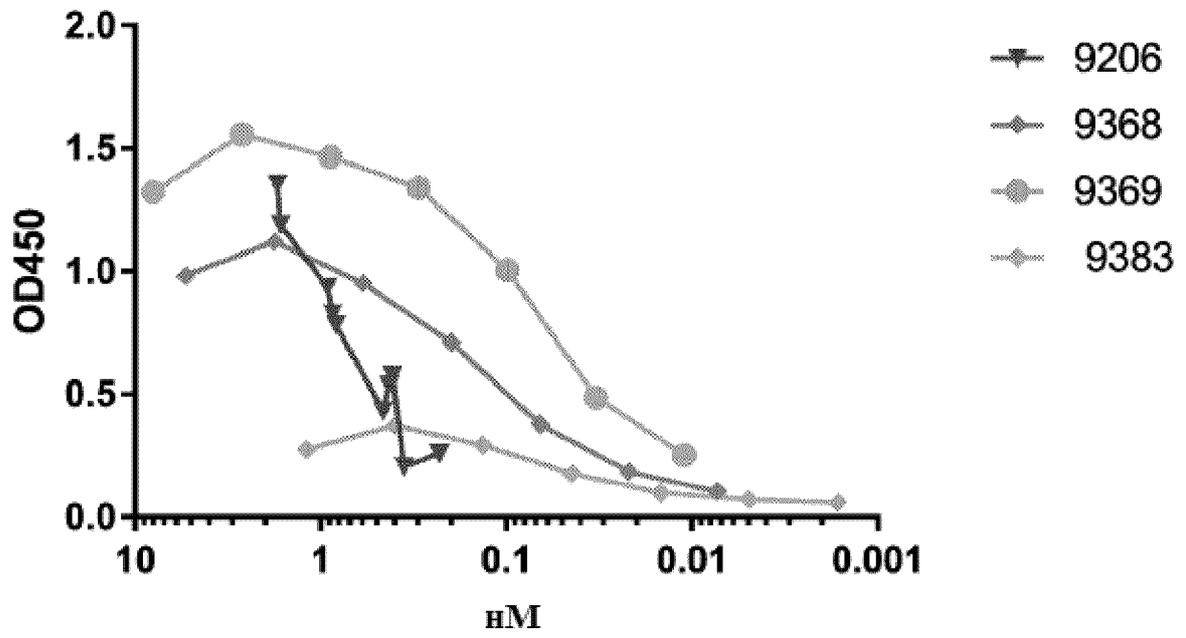


Фигура 6

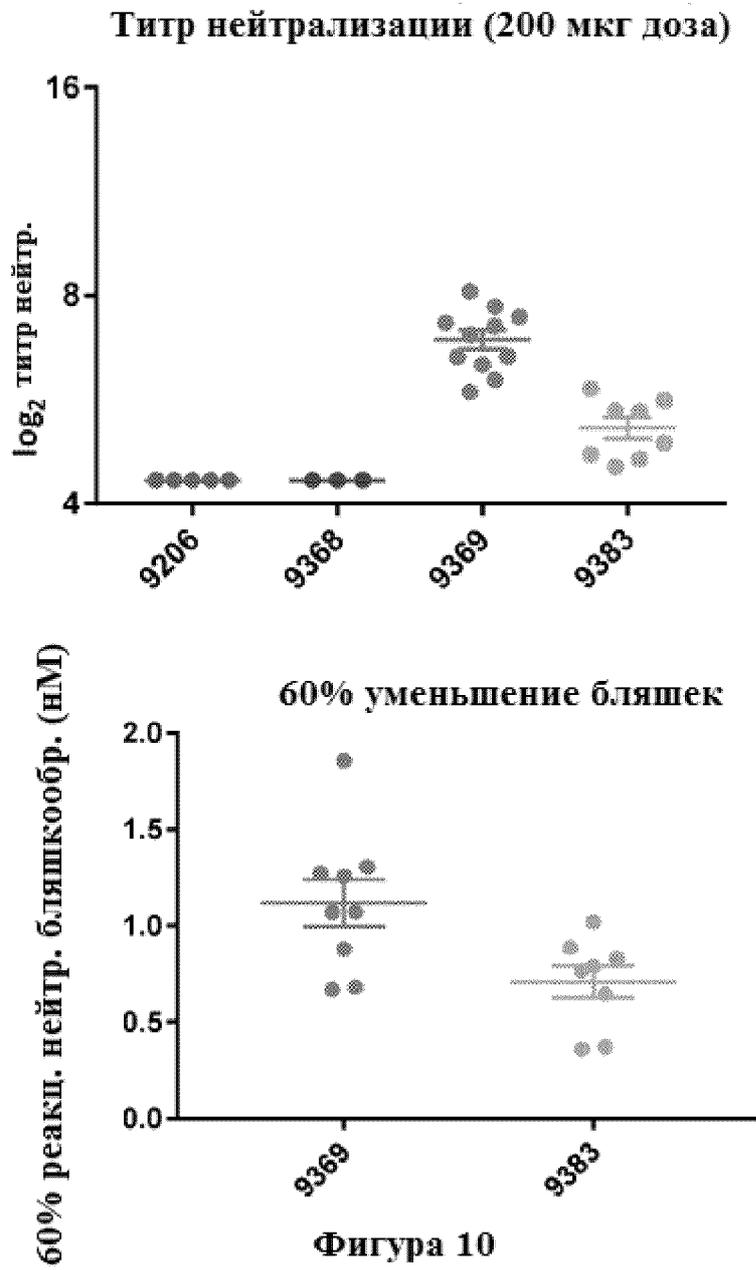
**Пик экспрессии D7 (200 мкг доза)****Фигура 7**



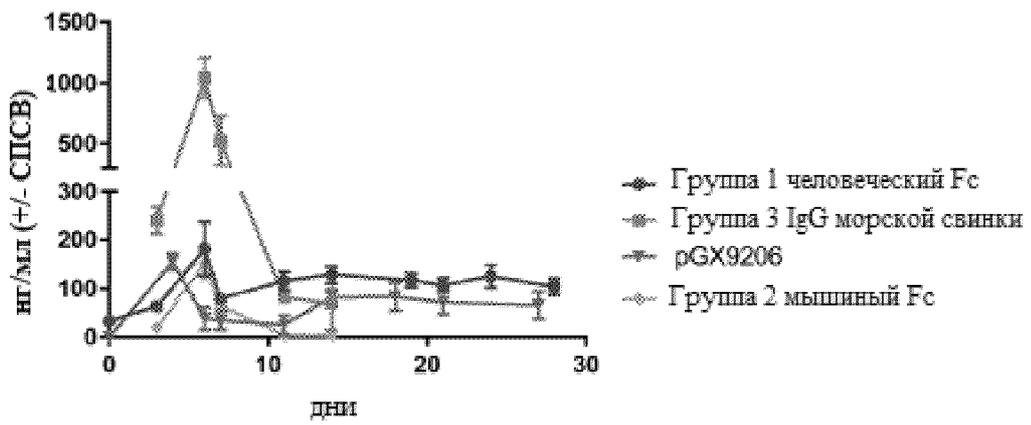
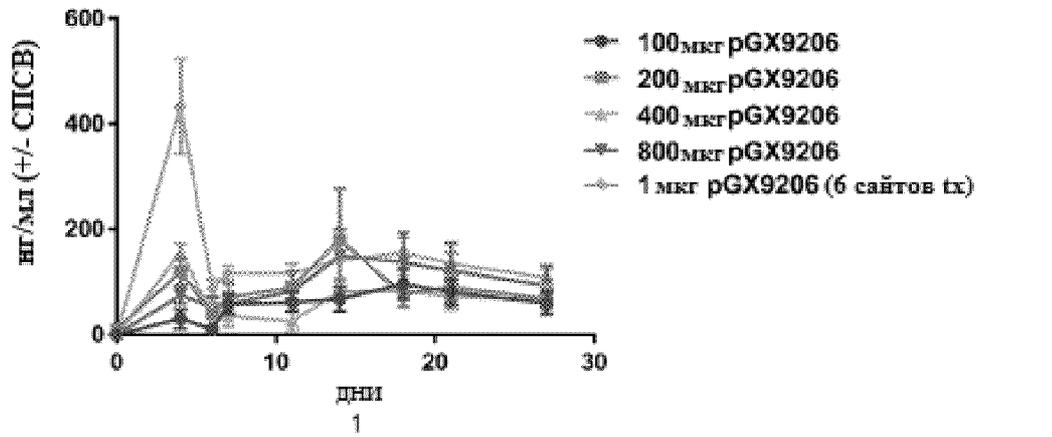
Фигура 8



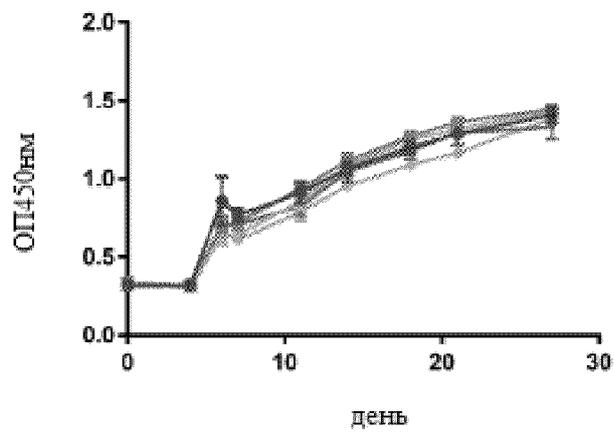
Фигура 9



Sigma-HYA 30 мин пре-tx

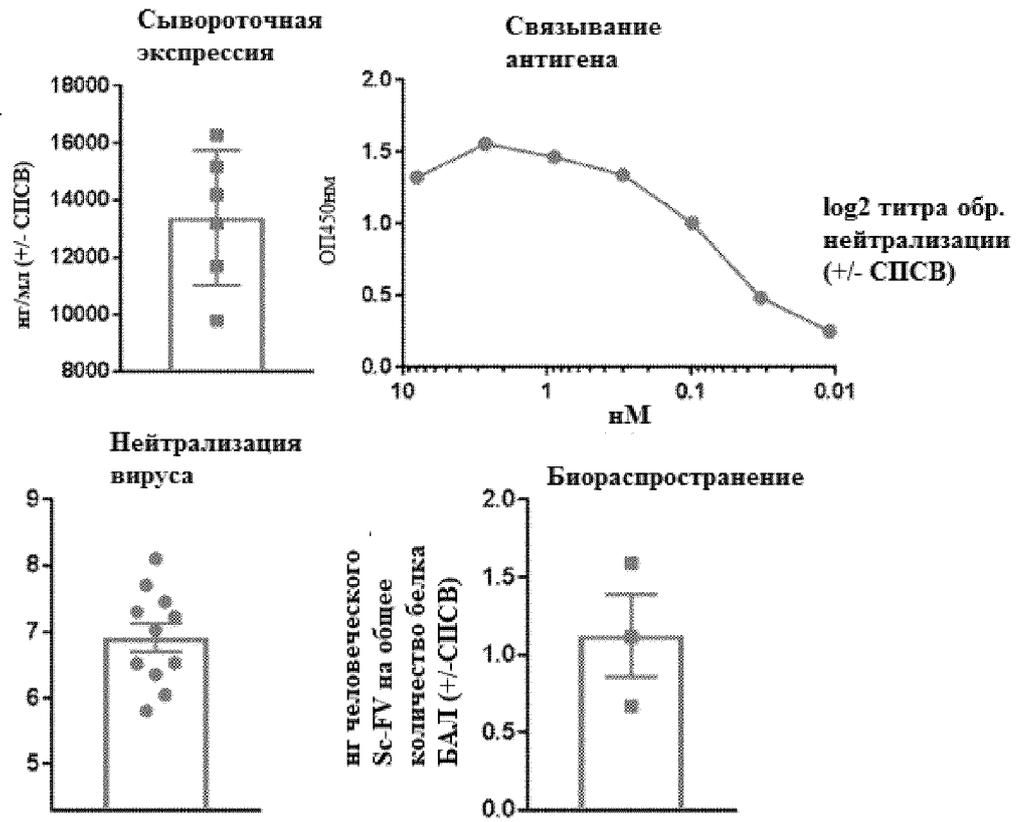


ADA

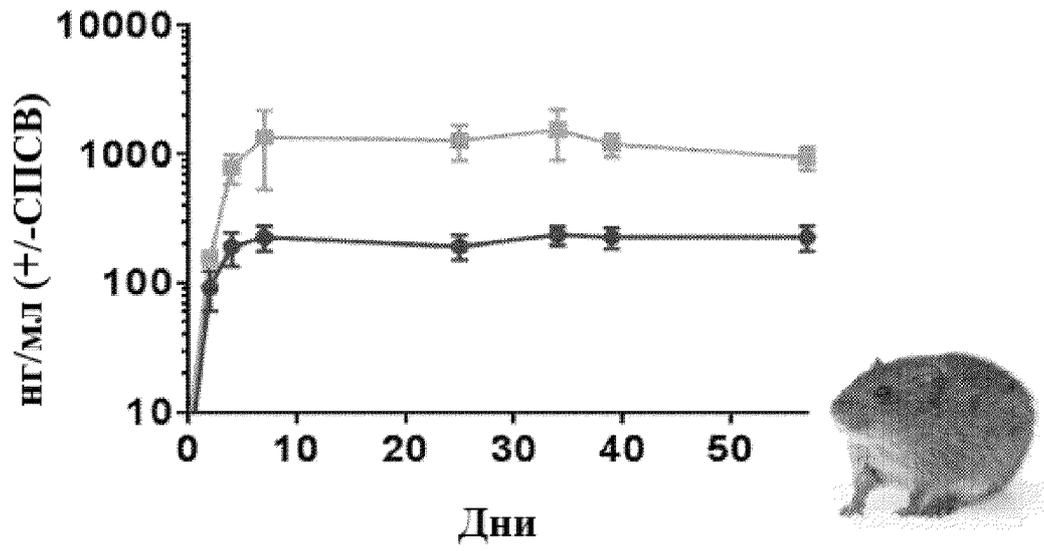


Фигура 11

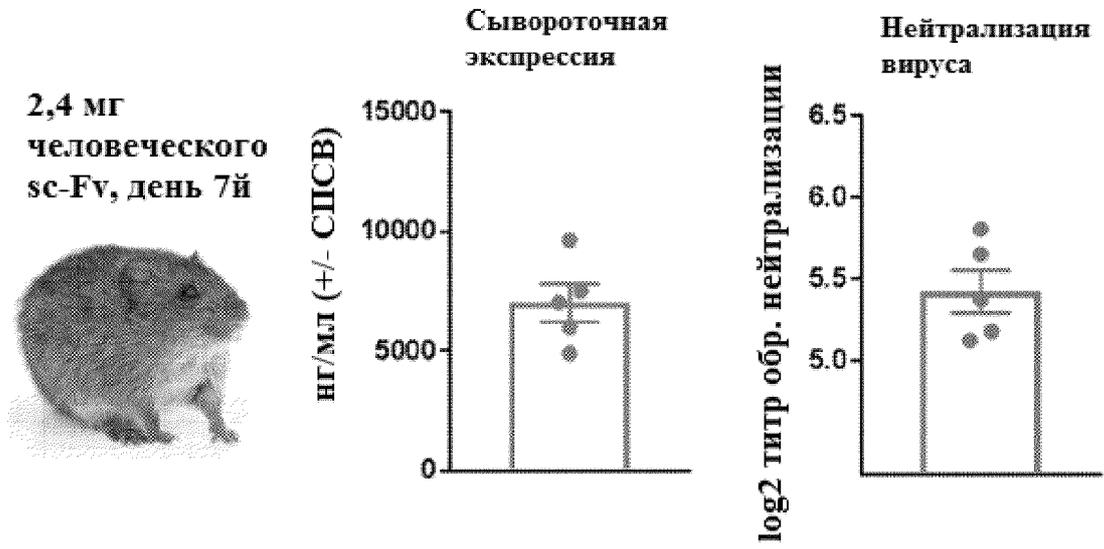
200 мкг  
человеческого  
анти-PCV sc-  
FV, день 7й



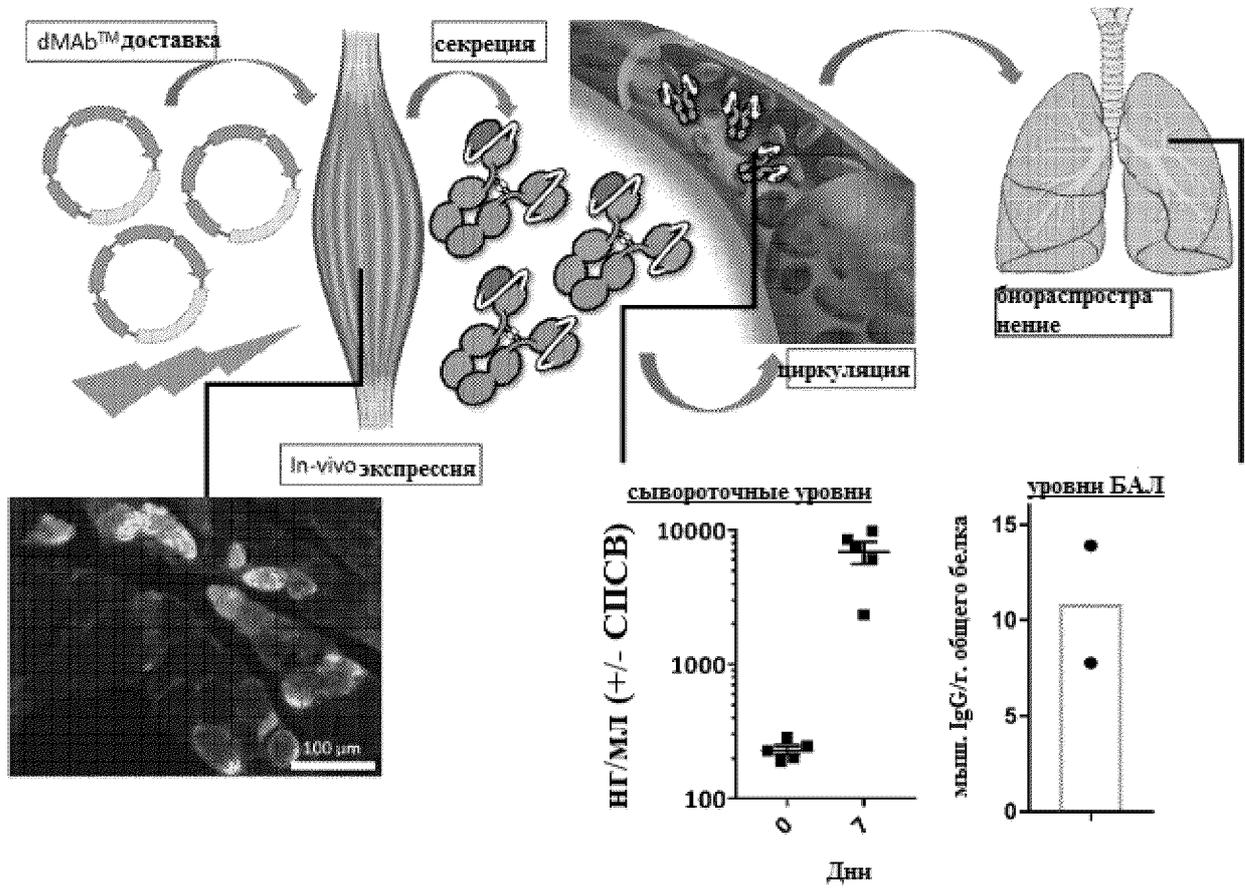
Фигура 12



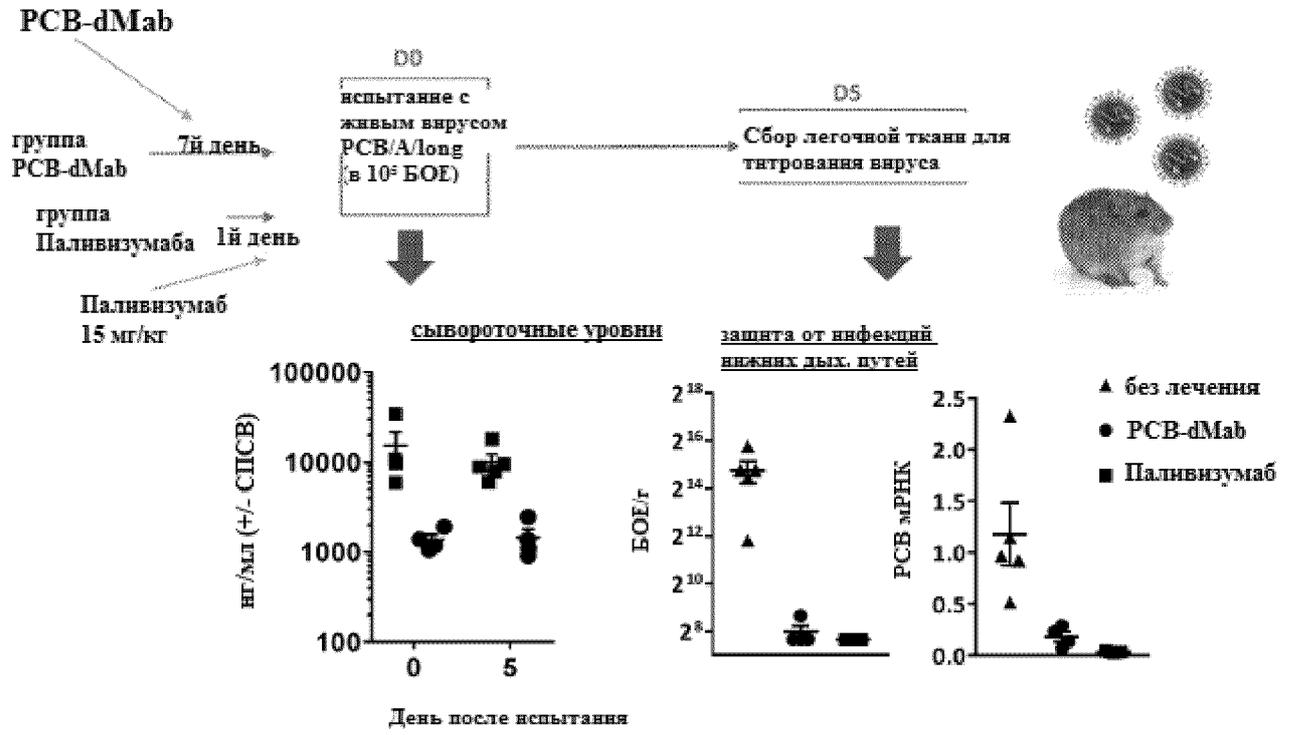
Фигура 13



Фигура 14



Фигура 15



Фигура 16