

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037980**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.18

(51) Int. Cl. *A61P 31/12* (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(21) Номер заявки
201692293

(22) Дата подачи заявки
2015.05.13

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫЙ ВИРУС

(31) **61/992,649**

(56) US-A1-20120232133
WO-A1-2010151673
US-A1-20140037637
US-B1-6780639

(32) **2014.05.13**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/US2015/030533**

(87) **WO 2015/175639 2015.11.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:
**Уилсон Джеймс М., Третьякова Анна
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (AAV) для экспрессии в клетке двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности. Также описан рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) для экспрессии двух функциональных моноспецифических антител и биспецифического антитела в клетке. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для экспрессии двух разных функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, в клетке, к способу доставки двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, субъекту, а также к композиции для доставки двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, субъекту.

B1**037980****037980****B1**

Включение с помощью ссылки материала, поданного в электронной форме

Заявитель включает в данный документ с помощью ссылки перечень последовательностей материалов, поданный в электронной форме. Данный файл имеет название "14-7032PCT Seq Listing_ST25.txt".

Предпосылки изобретения

Моноклональные антитела были признаны эффективными терапевтическими средствами против рака и других заболеваний. Современная терапия антителами, как правило, включает повторное введение и продолжительные схемы лечения, связанные с рядом недостатков, таких как нестабильные уровни в сыворотке, ограниченная продолжительность эффективности за введение, что обуславливает необходимость частого повторного введения, и высокая стоимость. В последние годы применение антител в качестве инструмента для диагностики и способов терапевтического воздействия нашло более широкое использование. Первое утвержденное FDA моноклональное антитело для лечения рака, Rituxan® (ритуксимаб), было одобрено в 1997 году для лечения пациентов с неходжкинской лимфомой, а вскоре после этого, в 1995 году было одобрено гуманизированное моноклональное антитело, Herceptin®, для лечения пациентов с метастатическим раком молочной железы. Многочисленные виды терапии на основе антител, которые находятся на разных стадиях клинических испытаний, являются перспективными. Учитывая успех видов терапии на основе разных моноклональных антител, предусматривается, что новое поколение биофармацевтических препаратов будет включать "коктейли", т.е. смеси антител.

Одно из ограничений для широкого применения в медицинской практике технологии с антителами состоит в том, что, как правило, для терапевтической эффективности необходимы большие количества антител, а затраты, связанные с производством, являются значительными. Клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки SP20 и клетки миеломы NS02 являются наиболее распространенными линиями клеток млекопитающих для получения в промышленных масштабах гликозилированных человеческих белков, таких как антитела. Выходы продукта, полученные в результате продукции с помощью линии клеток млекопитающих, как правило, находятся в диапазоне 50-250 мг/л для 5-7-дневной культуры в ферментере периодического действия или 300-1000 мг/л в случае 7-12 дней в ферментере периодического действия с подпиткой.

Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой желаемый вектор для доставки терапевтических генов в связи с его профилем безопасности и способностью к длительной экспрессии генов *in vivo*. Рекombинантные векторы на основе AAV (rAAV) ранее применяли для экспрессии одной цепи и полноразмерных антител *in vivo*. В связи с ограниченной пакующей емкостью AAV в отношении трансгена, техническая сложность состояла в том, чтобы иметь четко регулируемую систему для экспрессии тяжелой и легкой цепей антитела с использованием одного вектора на основе AAV для получения полноразмерных антител.

В данной области остается потребность в доставке двух антител в одной композиции для терапевтического применения.

Краткое описание изобретения

В данном документе представлен рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) с капсидом AAV, который содержит в себе запакованную гетерологичную нуклеиновую кислоту, экспрессирующую в клетке два функциональных антитела.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (AAV) для экспрессии в клетке двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, причем рекомбинантный AAV имеет капсид AAV и запакованную в нем молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты, где молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты рекомбинантный AAV содержит

инвертированный 5'-концевой повтор (ITR) AAV;

первую кассету экспрессии, которая кодирует первую иммуноглобулиновую цепь, под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют ее экспрессией;

вторую кассету экспрессии, которая кодирует вторую иммуноглобулиновую цепь, линкер и третью иммуноглобулиновую цепь, под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют ее экспрессией; и

3'-ITR AAV,

где кодируемые иммуноглобулиновые цепи представляют собой легкую цепь, первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, которая имеет другую специфичность, чем первая тяжелая цепь, где легкая цепь и первая тяжелая цепь образуют первое моноспецифическое антитело и легкая цепь и вторая тяжелая цепь образуют второе моноспецифическое антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный AAV дополнительно экспрессирует биспецифическое антитело, содержащее каждую из кодируемых иммуноглобулиновых цепей.

В следующем варианте осуществления изобретения первая кассета экспрессии кодирует легкую цепь антитела, вторая кассета экспрессии кодирует первую тяжелую цепь антитела и вторую тяжелую цепь антитела.

В еще одном варианте осуществления изобретения первая кассета экспрессии кодирует первую

тяжелую цепь антитела, вторая кассета экспрессии кодирует легкую цепь антитела и вторую тяжелую цепь антитела.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный AAV дополнительно содержит энхансер, функционирующий в двух направлениях, расположенный между первой кассетой экспрессии и второй кассетой экспрессии.

В следующем варианте осуществления изобретения линкер во второй кассете включает линкер, выбранный из IRES или F2A.

В другом варианте осуществления изобретения регуляторные последовательности для первой кассеты экспрессии и/или второй кассеты содержат минимальный промотор.

В еще одном варианте осуществления изобретения регуляторные последовательности для первой кассеты экспрессии и/или второй кассеты экспрессии содержат минимальную или синтетическую polyA-последовательность.

В одном из вариантов осуществления изобретения первая кассета экспрессии дополнительно кодирует линкер между кодирующей последовательностью для первой иммуноглобулиновой цепи и кодирующей последовательностью для четвертой иммуноглобулиновой цепи.

В следующем варианте осуществления изобретения каждая из иммуноглобулиновых цепей содержит scFv.

В другом варианте осуществления изобретения вектор дополнительно содержит polyA-последовательность, которая функционирует в двух направлениях, расположенную между первой кассетой экспрессии и второй кассетой экспрессии.

В еще одном варианте осуществления изобретения первая кассета экспрессии содержит энхансер и минимальный промотор.

В одном из вариантов осуществления изобретения вторая кассета экспрессии содержит энхансер и минимальный промотор.

Изобретение также относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (AAV) для экспрессии двух функциональных моноспецифических антител и биспецифического антитела в клетке, причем рекомбинантный AAV имеет капсид AAV и запакованную в нем молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты, где рекомбинантный AAV экспрессирует первое моноклональное антитело, характеризующееся первым типом специфичности, второе моноклональное антитело, характеризующееся специфичностью, отличной от таковой первого моноклонального антитела, и биспецифичное антитело, и где молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты содержит:

инвертированный 5'-концевой повтор (ITR) AAV;

открытую рамку считывания (ORF) для легкой цепи иммуноглобулина,

ORF для первой тяжелой цепи иммуноглобулина,

линкер,

ORF для второй тяжелой цепи иммуноглобулина, при этом

каждая из открытых рамок считывания находится под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией иммуноглобулиновых цепей, кодируемых ими, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь являются различными; и

3' ITR AAV, и

где легкая цепь и первая тяжелая цепь образуют первое моноклональное антитело, легкая цепь и вторая тяжелая цепь, которая имеет другую специфичность, чем первая тяжелая цепь, образуют второе моноклональное антитело, и легкая цепь и тяжелые цепи образуют биспецифическое антитело.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для экспрессии двух разных функциональных моноспецифических антител, имеющих разные специфичности, в клетке, содержащей рекомбинантный AAV по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу доставки двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные специфичности, субъекту, при этом указанный способ предусматривает введение рекомбинантного AAV по изобретению субъекту.

Настоящее изобретение также относится к композиции для доставки двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, субъекту, содержащей два функциональных антитела, характеризующихся разными типами специфичности, где каждое из антител имеет одну и ту же легкую цепь и отличную тяжелую цепь, где легкая цепь является гетерологичной в отношении тяжелой цепи для одного или обоих моноспецифических антител и где антитела получают экспрессией рекомбинантного AAV по изобретению.

Еще другие аспекты и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой изображение, на котором показана иллюстративная схема вектора, экспрессирующего две конструкции моноспецифических антител, содержащих первую и вторую тяжелые цепи и легкую цепь, которая может происходить из антитела, гетерологичного в отношении одного или обоих антител, из которых происходят первая и вторая тяжелые цепи, и третье биспецифическое антите-

ло. В данной схеме применяют общий энхансер, который функционирует в двух направлениях и разделяет первую кассету экспрессии и вторую кассету экспрессии. Проиллюстрированы три открытые рамки считывания (ORF). L обозначает линкер. pA1 обозначает первую polyA, и pA2 обозначает вторую polyA. MP1 обозначает первый минимальный промотор, и MP2 обозначает второй минимальный промотор. polyA и MP могут быть одинаковыми или разными для каждой кассеты экспрессии.

Фиг. 1B представляет собой изображение, на котором показана альтернативная иллюстративная схема вектора, экспрессирующего две конструкции антител, содержащих первую и вторую тяжелые цепи и легкую цепь, которая может происходить из антитела, гетерологичного в отношении одного или обоих антител, из которых происходят первая и вторая тяжелые цепи, и третье биспецифическое антитело. В данной схеме применяют общую polyA. E1 обозначает первый энхансер, и E2 обозначает второй энхансер. Они могут представлять собой одинаковые или разные энхансеры для каждой из кассет экспрессии. Аналогично MP1 и MP2 могут быть одинаковыми или разными.

На фиг. 2 показана молекула нуклеиновой кислоты, которая содержится в плазмиде, предназначенной для упаковки в капсид AAV, который применяется для совместной экспрессии тяжелой цепи антитела к TSG 101, тяжелой цепи антитела FI6 к антигенам вируса гриппа и легкой цепи антитела FI6. В этих цепях антитела используется гетерологичная лидерная последовательность из интерлейкина 2 (IL2). Энхансер CMV человека использовали в сочетании с промоторами CMV. Бицистронная кассета экспрессии содержит сайт распознавания фурина и линкерную последовательность 2A, разделяющую ORF, которая содержит участки, кодирующие VL и CL FI6, от ORF, содержащей кодирующий тяжелую цепь FI6 участок. polyA для кассеты экспрессии справа представляет собой укороченную polyA тимидинкиназы. polyA для кассеты экспрессии слева представляет собой синтетическую polyA-последовательность.

На фиг. 3 показана связывающая способность антитела FI6v3k2, совместно экспрессированного с антителом C05 из рекомбинантного AAV8, полученного как описано в данном документе. Из результатов видно ожидаемое связывание FI6 с полноразмерным HA и с отличительным признаком в виде "ствола" HA и связывание C05 с HA и отличительным признаком в виде "головки" HA отдельно (не "стволом").

На фиг. 4A, B показана связывающая способность антитела FI6v3k2, совместно экспрессированного с антителом 1A6 (к TSG 101) из рекомбинантного AAV8, полученного как описано в данном документе. На фиг. 4A представлена столбчатая диаграмма, показывающая связывание с белком A, который захватывает общее моноклональное антитело в смеси (отрицательный контроль представлен столбиком слева, смесь антител представлена столбиком справа). Фиг. 4B представляет собой график, на котором показано, что посредством связывания с пептидом TSG101 происходит захват только МАВ, содержащего тяжелую цепь 1A6 (верхняя линия). Эти данные демонстрируют, что в случае совместной экспрессии с FI6v3k2 антитело 1A6 сохраняет специфичность связывания антитела, из которого происходят его тяжелые цепи.

На фиг. 5 показаны уровни общей экспрессии у мышей, которым вводили FI6, совместно экспрессированное из вектора на основе AAV с другим антителом, в дозах 1×10^{11} геномных копий (GC) или 1×10^{10} GC.

На фиг. 6A, B показаны результаты оценки AAV9.BiD.FI6v3_CR8033mAb, доставленного внутримышечным (IM) путем в дозе 1×10^{11} GC, в отношении защиты от контрольного заражения штаммом PR8 вируса гриппа. Фиг. 6A представляет собой линейный график, на котором показано изменение веса в процентах. Кружок представляет конструкцию на основе AAV9 с промотором, функционирующим в двух направлениях, которая экспрессирует синтетические моноклональные антитела FI6v3 и CR8033 с одинаковой гетерологичной легкой цепью. Квадрат представляет положительный контроль, т.е. AAV9, экспрессирующий одно антитело типа FI6, также введенное в дозе 1×10^{11} GC, а треугольник представляет необработанных животных. На фиг. 6B показано выживание после контрольного заражения.

На Фиг. 7A, B показаны результаты оценки AAV9.BiD.FI6v3_CR8 033mAb, доставленного внутримышечным (IM) путем в дозе 1×10^{11} GC, в отношении защиты от контрольного заражения штаммом V/Lee/40 вируса гриппа. Фиг. 7A представляет собой линейный график, на котором показано изменение веса в процентах. Кружок представляет конструкцию на основе AAV9 с промотором, функционирующим в двух направлениях, которая экспрессирует синтетические моноклональные антитела FI6 и CR8033 с одинаковой гетерологичной легкой цепью. Квадрат представляет положительный контроль, т.е. AAV9, экспрессирующий одно антитело типа CR8033, также введенное в дозе 1×10^{11} GC, а треугольник представляет необработанных животных. На фиг. 7B показано выживание после контрольного заражения.

Фиг. 8A представляет собой диаграмму, на которой показаны результаты в отношении защиты на мышинной модели после введения AAV, экспрессирующего как FI6v3, так и TCN моноклональные антитела, выраженные по весу мыши на протяжении определенного количества дней. Верхняя линия (ромбы) представляет дозу, которая составляет 25 микрограмм (мкг/мл), а нижняя линия представляет 0,4 мкг/мл.

Фиг. 8B представляет собой диаграмму, на которой показаны результаты в отношении защиты на мышинной модели после введения AAV, экспрессирующего как FI6v3, так и 1A6 моноклональные антитела, выраженные по весу мыши на протяжении определенного количества дней. Верхняя линия (ромбы) представляет дозу, которая составляет 263,2 мкг (мкг/мл), а нижняя линия представляет 36,5 мкг/мл.

Фиг. 8С представляет собой диаграмму, на которой показаны результаты в отношении защиты на мышинной модели после введения AAV, экспрессирующего как F16v3, так и CR8033 моноклональные антитела, выраженные по весу мыши на протяжении определенного количества дней. Верхняя линия (ромбы) представляет дозу, которая составляет 126,3 мкг (мкг/мл), а нижняя линия представляет 6,9 мкг/мл.

Подробное описание изобретения

В данном документе представлен вектор, который доставляет по меньшей мере два функциональных антитела посредством совместной экспрессии двух разных тяжелых цепей и одной легкой цепи, которые в результате экспрессии в клетке образуют два функциональных антитела с разными типами специфичности, т.е. которые распознают разные антигены (или лиганды). Также может быть экспрессировано третье функциональное антитело, и оно является биспецифическим, с тяжелой цепью каждого из двух моноспецифических антител. Как правило, третье антитело экспрессируется на более низком уровне по сравнению с двумя моноспецифическими антителами. Вектор можно применять *in vivo* для эффективного получения композиций, в которых будет использовано по меньшей мере два антитела, или клетка-хозяин, продуцирующая антитело, может быть сконструирована так, чтобы содержать кассеты экспрессии для двух разных тяжелых цепей и одного типа легкой цепи. Таким образом, настоящее изобретение также охватывает клетку-хозяина, экспрессирующую смесь двух моноспецифических антител, где каждое антитело характеризуется отличной специфичностью, но содержит одинаковую легкую цепь, и третье антитело, которое является биспецифическим. В одном желательном варианте осуществления вектор сконструирован для доставки трех разных конструкций антител субъекту, которому вводят вектор.

В одном варианте осуществления вектор представляет собой рекомбинантный AAV, имеющий запакетованную в капсид AAV молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности, кодирующие две разные тяжелые цепи и одну легкую цепь, которые при совместной экспрессии образуют два функциональных моноспецифических антитела, т.е. первое антитело с первой тяжелой цепью и легкой цепью и второе антитело со второй тяжелой цепью и легкой цепью, и третье антитело, имеющее одну из каждой тяжелых цепей и ту же легкую цепь, с образованием биспецифического антитела.

"Функциональное антитело" может представлять собой антитело или иммуноглобулин, которые связываются с выбранной мишенью (например, антигеном на раковой клетке или патогеном, таким как вирус, бактерия или паразит) с аффинностью связывания, достаточной для проявления необходимого физиологического результата, который может быть защитным (например, пассивная иммунизация) или терапевтическим.

Представленный в данном документе вектор на основе AAV может содержать 1, 2 или 3 открытые рамки считывания (ORF) для не более чем десяти доменов иммуноглобулина. В контексте данного документа "домен иммуноглобулина" относится к домену тяжелой цепи или легкой цепи антитела, согласно определению относительно стандартного полноразмерного антитела. Более конкретно, полноразмерное антитело содержит полипептид тяжелой (H) цепи, содержащий четыре домена: один N-концевой вариабельный (VH) участок и три C-концевых константных (CH1, CH2 и CH3) участка, и полипептид легкой (L) цепи, содержащий два домена: один N-концевой вариабельный (VL) участок и один C-концевой константный (CL) участок. Fc-участок содержит два домена (CH2-CH3). Fab-участок может содержать один константный и один вариабельный домен для каждой из тяжелой и легкой цепей.

Из вектора на основе AAV, описанного в данном документе, могут экспрессироваться два полноразмерных полипептида тяжелой цепи (каждый из 4 доменов) и полипептид легкой цепи (два домена). В одном желательном варианте осуществления полипептиды двух тяжелых цепей характеризуются разными типами специфичности, т.е. направлены на разные мишени. Таким образом, векторы являются пригодными отдельно или в комбинации для экспрессии смеси антител.

В контексте данного документа термин "разные типы специфичности" означает, что упомянутые конструкции иммуноглобулинов (например, полноразмерное антитело, тяжелая цепь или вторая конструкция, способные связываться с конкретной мишенью) связываются с отличным целевым сайтом. Соответственно в экспрессирующей антитела с двумя типами специфичности конструкции два типа специфичности не перекрываются и/или не противодействуют и необязательно могут усиливать одна другую. Конструкции двух антител (иммуноглобулинов), описанные в данном документе, обеспечивают разную специфичность благодаря связыванию с другим целевым сайтом того же патогена или с отличным целевым сайтом (например, вирусным белком или опухолевым антигеном). Такие разные целевые антигены могут быть разными штаммами одного и того же типа вируса (например, двумя разными штаммами вируса гриппа) или двумя разными антигенами (например, среди прочего, противовирусным и противораковым, двумя разными противораковыми конструкциями). Например, полипептид первой тяжелой цепи можно объединять с легкой цепью с образованием конструкции антитела, которая характеризуется первым типом специфичности, полипептид второй тяжелой цепи можно объединять с легкой цепью с образованием второй конструкции антитела, которая характеризуется вторым типом специфичности, и первую и вторую тяжелые цепи можно объединять с легкой цепью с образованием биспецифического антитела. Оба антитела могут быть необязательно направлены на разные антигенные детерминанты (эпитопы) на одной мишени (например, разные целевые сайты на выбранном патогене вирусного, бактериального, грибкового или паразитарного происхождения) или на разные мишени. Например, тяжелые цепи из

двух антител могут быть направлены на вирус гриппа, могут совместно экспрессироваться с образованием двух моноспецифических антител (например, можно выбирать тяжелые цепи из антител FI6, CR8033 и C05 к антигенам вируса гриппа) и экспрессироваться с выбранной легкой цепью, и биспецифического антитела. Примеры пригодных антител к антигенам вируса гриппа и других конструкций антител к патогенам, которые передаются воздушно-капельным путем, и способы их доставки описаны, например, в WO 2012/145572A1. Антитела также могут быть направлены на разные мишени (например, антитело к антигенам вирусов, в том числе вирусов, которые вызывают хронические инфекции, вирусов, которые вызывают инфекции, связанные с видами рака, или антитело к разным поверхностным белкам опухолевой клетки) или другие мишени. Примеры пригодных вирусных мишеней включают, среди прочего, белок-гемагглютинин вируса гриппа или другие вирусные белки, вирус иммунодефицита человека (HIV), папилломавирус человека (HPV), вирус Эпштейна-Барра, герпесвирус человека, респираторно-синцитиальный вирус. Таким образом, настоящее изобретение особенно подходит для применения в вариантах терапии и для пассивной иммунизации, для которых желательными являются комбинации антител.

Термин "иммуноглобулин", используемый в данном документе, включает антитела и их функциональные фрагменты. Антитела могут существовать в различных формах, в том числе, например, в форме поликлональных антител, моноклональных антител, однодоменных верблужьих антител, внутриклеточных антител ("интраантител"), рекомбинантных антител, полиспецифических антител (биспецифических), фрагментов антител, таких как Fv, Fab, F(ab)₂, F(ab)₃, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, однопочечные вариабельные фрагменты антител (scFv), тандемные/bis-scFv, Fc, pFc', scFvFc (или scFv-Fc), стабилизированные дисульфидными связями Fv (dsfv), биспецифических антител (bc-scFv), таких как антитела BiTE; антител верблюда, антител с измененной поверхностью, гуманизированных антител, полных антител человека, однодоменного антитела (sdAb, также известного как NANOBODY®), химерных антител, химерных антител, которые содержат по меньшей мере один константный участок антитела человека, и т.п. "Фрагмент антитела" относится по меньшей мере к части вариабельного участка иммуноглобулина, который связывается с его мишенью, например опухолевой клеткой. В одном варианте осуществления иммуноглобулин представляет собой IgG. Тем не менее, могут быть выбраны другие типы иммуноглобулинов. В другом варианте осуществления выбранный подтип IgG представляет собой IgG1. Тем не менее, могут быть выбраны другие изотипы. Кроме того, могут быть выбраны любые аллотипы IgG1.

Термин "гетерологичный" в случае использования в отношении белка или нуклеиновой кислоты указывает на то, что белок или нуклеиновая кислота содержат две или больше последовательностей или подпоследовательностей, которые не находятся в такой же связи между собой в природе. Например, нуклеиновая кислота, как правило, полученная рекомбинантным путем, имеет две или больше последовательности из неродственных генов, расположенные с получением новой функциональной нуклеиновой кислоты. Например, в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота имеет промотор из одного гена, расположенный с возможностью управления экспрессией кодирующей последовательности из другого гена. Таким образом, промотор является гетерологичным в отношении кодирующей последовательности. Термин "гетерологичная легкая цепь" касается легкой цепи, содержащей вариабельный домен и/или константный домен из антитела, которое характеризуется специфичностью в отношении мишени, отличной от специфичности тяжелой цепи.

Две или более ORF, которые содержатся в молекуле нуклеиновой кислоты, упакованной в вектор, могут экспрессироваться из двух кассет экспрессии, одна или обе из которых могут быть бицистронными. Поскольку кассеты экспрессии содержат тяжелые цепи из двух разных антител, желательным является внесение отличия в отношении последовательности между последовательностями двух тяжелых цепей с целью сведения к минимуму возможности гомологичной рекомбинации. Как правило, достаточным является отличие между вариабельными доменами двух антител (VH- Ab1 и VH-Ab2). Тем не менее, желательно обеспечить достаточное отличие в кодирующей последовательности между константными участками первого антитела (Ab1) и второго антитела (Ab2), наиболее предпочтительно в каждом из CH1, CH2 и CH3-участков. Например, в одном варианте осуществления константные участки тяжелой цепи первого антитела могут иметь последовательность длиной 1-705 нуклеотидов SEQ ID NO: 1 (которая кодирует аминокислоты 1-233 SEQ ID NO:2) или последовательность, идентичную ей на приблизительно 95-99% без какого-либо введения любых аминокислотных изменений. В одном варианте осуществления различие в последовательности этих участков вводят в форме синонимичных кодонов (т.е. различия последовательности нуклеиновой кислоты вводят без каких-либо изменений на уровне аминокислот). Например, вторая тяжелая цепь может содержать константные участки, которые отличаются по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 35% (т.е. на приблизительно 65-85% идентичны) в отношении CH1, CH2 и/или CH3.

После того как мишень и иммуноглобулин выбраны, можно получать и/или синтезировать кодирующие последовательности для выбранного иммуноглобулина (например, для тяжелой (тяжелых) и/или легкой (легких) цепи (цепей)). Способы секвенирования нуклеиновой кислоты (например, РНК и ДНК) известны специалистам в данной области. После того как последовательность нуклеиновой кислоты стала известной, можно расшифровывать аминокислотную последовательность, и затем, с помощью дос-

тупных в сети Интернет и коммерчески доступных компьютерных программ, а также компаний, которые предоставляют соответствующие услуги, можно транслировать аминокислотные последовательности обратно в кодирующие последовательности нуклеиновых кислот. См., например, backtranseq от EMBOSS, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>; Gene Infinity (http://www.geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html); ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>). В одном варианте осуществления кодирующие РНК и/или кДНК последовательности конструируют для оптимальной экспрессии в клетках человека. Способы синтеза нуклеиновых кислот известны специалистам в данной области и могут быть использованы для всех, или частей, конструкций нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Кодон-оптимизированные кодирующие участки можно конструировать с помощью разнообразных способов. Эту оптимизацию можно выполнять с помощью способов, доступных в режиме реального времени (например, GeneArt,), опубликованных способов или доступных от компании, предоставляющей услуги по оптимизации кодонов, например DNA2.0 (Menlo Park, Калифорния). Один из алгоритмов оптимизации кодонов описан, например, в заявке на выдачу патента США № WO 2015/012924, включенной в данный документ с помощью ссылки. См. также, например, публикацию патента США № 2014/0032186 и публикацию патента США № 2006/0136184. Соответственно модифицируют полную длину открытой рамки считывания (ORF) для продукта. Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления можно изменять только фрагмент ORF. При использовании одного из этих способов можно применять таблицы частоты встречаемости кодонов в отношении любой данной полипептидной последовательности и получать фрагмент нуклеиновой кислоты кодон-оптимизированного кодирующего участка, который кодирует полипептид.

Ряд возможностей доступен для выполнения конкретных изменений в отношении кодонов или для синтеза кодон-оптимизированных кодирующих участков, сконструированных как описано в данном документе. Такие модификации или синтез можно осуществлять с помощью стандартных и общепринятых в области молекулярной биологии манипуляций, хорошо известных специалистам в данной области. Согласно одному подходу с помощью стандартных способов синтезируют серию комплементарных пар олигонуклеотидов, длиной 80-90 нуклеотидов каждый, которые перекрывают по длине желаемую последовательность. Эти пары олигонуклеотидов синтезируют таким образом, что при комплементарном связывании они образуют двухнитевые фрагменты из 80-90 пар оснований, содержащие "липкие" концы, например, каждый олигонуклеотид в паре синтезируют с удлинением на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше оснований за пределами участка, комплементарного другому олигонуклеотиду в паре. Одонитевые концы каждой пары олигонуклеотидов сконструированы для комплементарного связывания с одонитевым концом другой пары олигонуклеотидов. Парам олигонуклеотидов дают возможность комплементарно связаться, и примерно пяти-шести из этих двухнитевых фрагментов затем дают возможность комплементарно связаться вместе с помощью "липких" одонитевых концов, а затем осуществляют их совместное лигирование и клонируют в стандартный бактериальный вектор для клонирования, например вектор TOPO®, доступный от Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния. Затем конструкцию секвенируют с помощью стандартных способов. Некоторые из этих конструкций, состоящих из 5-6 фрагментов из фрагментов длиной 80-90 пар оснований, лигируют вместе, т.е. получают фрагменты длиной приблизительно 500 пар оснований, таким образом вся желаемая последовательность представлена в виде серии плазмидных конструкций. Вставки в виде таких плазмид затем разрезают соответствующими рестрикционными ферментами и осуществляют совместное лигирование с образованием конечной конструкции. Конечную конструкцию затем клонируют в стандартный бактериальный вектор для клонирования и секвенируют. Дополнительные способы будут тем самым очевидны специалисту в данной области. Кроме того, синтез генов является легкодоступным на коммерческой основе.

Необязательно аминокислотные замены можно вводить в константный участок тяжелой цепи с целью увеличения различия последовательностей между двумя тяжелыми цепями антитела и/или для другой цели. Способы и компьютерные программы для получения таких выравниваний доступны и хорошо известны специалистам в данной области. Замены также могут быть записаны как (аминокислота, обозначенная с помощью однобуквенного кода) - № положения - (аминокислота, обозначенная с помощью однобуквенного кода), где первая аминокислота представляет собой замещаемую аминокислоту, а вторая аминокислота представляет собой замещающую аминокислоту в определенном положении. Термины "замена", и "замена аминокислоты", и "аминокислотная замена", используемые в данном документе, означают замещение аминокислоты в аминокислотной последовательности другой аминокислотой, где последняя отличается от замещаемой аминокислоты. Способы замещения аминокислоты хорошо известны специалисту в данной области и включают без ограничения мутации нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность. Способы внесения аминокислотных замен в IgG описаны, например, в WO 2013/046704, включенной с помощью ссылки для рассмотрения методик аминокислотных модификаций.

Предусматривается, что термин "аминокислотная замена" и его синонимы, описанные выше, охватывают модификацию аминокислотной последовательности путем замещения аминокислоты другой, замещающей аминокислотой. Замена может представлять собой консервативную замену. Предусматривается, что термин "консервативная", касательно двух аминокислот, означает, что аминокислоты имеют

общее свойство, выявляемое специалистом в данной области. Предусматривается, что термин "неконсервативная", касательно двух аминокислот, означает, что аминокислоты отличаются по меньшей мере по одному свойству, выявляемому специалистом в данной области. Например, такие свойства могут включать аминокислоты с гидрофобными некислыми боковыми цепями, аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями (которые дополнительно могут быть разделены на кислые и некислые), аминокислоты с алифатическими гидрофобными боковыми цепями, аминокислоты с ароматическими гидрофобными боковыми цепями, аминокислоты с полярными нейтральными боковыми цепями, аминокислоты с электрически заряженными боковыми цепями, аминокислоты с электрически заряженными кислыми боковыми цепями и аминокислоты с электрически заряженными основными боковыми цепями. Как встречающиеся в природе аминокислоты, так и не встречающиеся в природе аминокислоты известны из уровня техники и могут быть использованы как замещающие аминокислоты в вариантах осуществления. Таким образом, консервативная аминокислотная замена может включать изменение первой аминокислоты с гидрофобной боковой цепью на другую аминокислоту с гидрофобной боковой цепью; тогда как неконсервативная аминокислотная замена может включать изменение первой аминокислоты с кислой гидрофобной боковой цепью на другую аминокислоту с отличной боковой цепью, например, основной гидрофобной боковой цепью или гидрофильной боковой цепью. Еще другие консервативные или неконсервативные изменения могут быть определены специалистом в данной области. В еще других вариантах осуществления замена в заданном положении будет осуществляться в отношении аминокислоты или одной из групп аминокислот, что будет очевидно специалисту в данной области, для достижения цели, определенной в данном документе.

Для экспрессии выбранного домена иммуноглобулина можно сконструировать молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит кодоны, которые были выбраны для оптимальной экспрессии полипептидов иммуноглобулина у выбранного вида млекопитающего, например человека. Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную лидерную последовательность для каждой тяжелой цепи и легкой цепи выбранного антитела, которая кодирует сигнальный лидерный пептид IL-2 дикого типа или мутантный сигнальный лидерный пептид IL-2, слитый выше относительно полипептидов тяжелой цепи, которые состоят из переменных и константных участков. Тем не менее, один или оба сигнальных пептида IL-2 могут быть заменены другой гетерологичной лидерной последовательностью. Сигнальные/лидерные пептиды могут быть одинаковыми или разными для каждой тяжелой цепи и легкой цепи конструкций иммуноглобулинов. Они могут представлять собой сигнальные последовательности, которые находятся в иммуноглобулине в естественных условиях (например, IgG) или могут происходить из гетерологичного источника. Такие гетерологичные источники могут представлять собой среди прочего цитокин (например, IL-2, IL12, IL18 и т.п.), инсулин, альбумин, β -глюкуронидазу, щелочную протеазу или секреторные сигнальные пептиды фибронектина.

В контексте данного документа "кассета экспрессии" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит, по меньшей мере, первую открытую рамку считывания (ORF) и необязательно вторую ORF. ORF может содержать два, три или четыре домена антитела. Например, ORF может содержать полноразмерную тяжелую цепь. Альтернативно ORF может содержать один или два домена антитела. Например, ORF может содержать переменный домен тяжелой цепи и один константный домен тяжелой цепи. В другом примере ORF может содержать переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Таким образом, кассета экспрессии может быть сконструирована так, что она является бицистронной, т.е. содержит регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией ORF в ее пределах, из общих регуляторных последовательностей. В этом случае две ORF, как правило, разделены линкером. Пригодные линкеры, такие как внутренний сайт связывания рибозимов (IRES) и/или пептидный линкер фурина-2а, который самостоятельно отщепляется (F2a) (см., например, Radcliffe and Mitrophanous, *Gene Therapy* (2004), 11, 1673-1674), известны из уровня техники. Соответственно ORF функционально связана с регуляторными контрольными последовательностями, которые управляют экспрессией в целевой клетке. Такие регуляторные контрольные последовательности могут включать polyA, промотор и энхансер. Для содействия совместной экспрессии из вектора на основе AAV по меньшей мере одно из энхансера и/или polyA-последовательности может быть общим для первой и второй кассеты экспрессии.

В одном варианте осуществления gAAV в выбранном капсиде AAV содержит запакрованную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую 5'-ITR, первую кассету экспрессии, энхансер, функционирующий в двух направлениях, и вторую кассету экспрессии, где энхансер, функционирующий в двух направлениях, разделяет первую и вторую кассеты экспрессии, и 3'-ITR. Фиг. 1А представлена в данном документе в качестве примера этого варианта осуществления. Например, в таком варианте осуществления первый промотор для первой кассеты экспрессии расположен слева от энхансера, функционирующего в двух направлениях, за которым расположена, по меньшей мере, первая открытая рамка считывания и polyA-последовательность, и второй промотор. Кроме того, второй промотор для второй кассеты экспрессии расположен справа от энхансера, функционирующего в двух направлениях, за которым расположена, по меньшей мере, вторая открытая рамка считывания и polyA. Первый и второй промоторы и первая и вторая polyA-последовательности могут быть одинаковыми или разными. Минимальный про-

мотор и/или минимальная polyA могут быть выбраны с целью экономии пространства. Как правило, в этом варианте осуществления каждый промотор расположен так или иначе смежно (или слева, или справа (или 5', или 3')) с энхансерной последовательностью, и polyA-последовательности расположены смежно с ITR, с ORF между ними. Хотя фиг. 1А является иллюстративной, порядок ORF может варьировать, как и для доменов иммуноглобулинов, закодированных в них. Например, константные и вариабельные последовательности легкой цепи могут быть расположены слева от энхансера, а две тяжелые цепи могут быть закодированы в ORF, расположенных справа от энхансера. Альтернативно одна из последовательностей тяжелых цепей может быть расположена слева от энхансера, а вторая тяжелая цепь и легкая цепь могут быть закодированы в ORF, расположенных справа от энхансера. Альтернативно возможной является обратная конфигурация, и кассета экспрессии слева от энхансера может быть бицистронной. Альтернативно, в зависимости от того, какие домены кодируются, обе кассеты экспрессии могут быть моноцистронными (например, кодирующие два иммуноадгезина) или обе могут быть бицистронными (например, кодирующие два полных FАВ).

В другом варианте осуществления gAAV в капсиде выбранного AAV содержит запакрованную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую 5'-ITR, первую кассету экспрессии, polyA, которая функционирует в двух направлениях, и вторую кассету экспрессии, где polyA, которая функционирует в двух направлениях, разделяет первую и вторую кассету экспрессии и функционирует по отношению к обеим из них, и 3'-ITR. Фиг. 1В представлена в данном документе в качестве примера этого варианта осуществления. В этом варианте осуществления первый энхансер и первый промотор (или комбинация энхансер/промотор) расположены справа относительно 5'-ITR, за которыми расположена(расположены) ORF и polyA, которая функционирует в двух направлениях. Вторая кассета экспрессии отделена от первой кассеты экспрессии с помощью polyA, которая функционирует в двух направлениях, и транскрибируется в противоположной ориентации. В этой кассете экспрессии энхансер и промотор (или комбинация энхансер/промотор) расположены смежно с 3'-ITR, а ORF расположена (расположены) смежно с polyA, которая функционирует в двух направлениях. Хотя фиг. 1В является иллюстративной, порядок ORF может варьировать, как и для доменов иммуноглобулинов, закодированных в них. Например, константные и вариабельные последовательности легкой цепи могут быть расположены слева от polyA, а две тяжелые цепи могут быть закодированы в ORF, расположенной(расположенных) справа от polyA. Альтернативно одна из последовательностей тяжелых цепей может быть расположена слева от polyA, а ORF справа от polyA кодируют вторую тяжелую цепь и легкую цепь. Альтернативно возможной является обратная конфигурация, и кассета экспрессии слева от polyA может быть бицистронной. Альтернативно, в зависимости от того, какие домены кодируются, обе кассеты экспрессии могут быть моноцистронными (например, кодирующие два иммуноадгезина) или обе могут быть бицистронными.

Необязательно конфигурация вектора экспрессии, проиллюстрированная на фиг. 1А и В и описанная в данном документе, может быть использована для совместной экспрессии других конструкций иммуноглобулинов. Например, два иммуноадгезина (IA) могут быть экспрессированы из двух моноцистронных кассет экспрессии. Иммуноадгезин включает форму антитела, которая экспрессируется в виде одной открытой рамки считывания, содержащей единицу одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) (т.е. VH, связанную с VL, или VL, связанную с VH), слитую с Fc-доменом (CH2-CH3) (например, VH-VL-CH2-CH3 или VL-VH-CH2-CH3). Альтернативно из двух бицистронных кассет экспрессии может экспрессироваться до четырех scFvs. В другом альтернативном варианте IA может совместно экспрессироваться с полноразмерным антителом. В другом альтернативном варианте один полный FАВ может совместно экспрессироваться с полноразмерным антителом или могут совместно экспрессироваться два полных FАВ. В еще другом варианте осуществления могут совместно экспрессироваться другие комбинации полноразмерного антитела, IA или FАВ-фрагмента.

Пригодные регуляторные контрольные последовательности могут быть выбраны и получены из разнообразных источников. В одном варианте осуществления минимальный промотор и/или минимальная polyA могут быть использованы с целью экономии емкости.

В контексте данного документа термин "минимальный промотор" означает короткую последовательность ДНК, содержащую ТАТА-бокс и другие последовательности, которые служат для определения сайта инициации транскрипции, к которой добавлены регуляторные элементы для контроля экспрессии. В одном варианте осуществления промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая содержит минимальный промотор и регуляторные элементы, способные осуществлять контроль экспрессии кодирующей последовательности или функциональной РНК. Промоторная последовательность этого типа состоит из проксимальных и более дистальных элементов, расположенных выше по последовательности, при этом последние элементы часто называют энхансерами. В одном варианте осуществления минимальный промотор представляет собой минимальный промотор цитомегаловируса (CMV). В другом варианте осуществления минимальный промотор получают из CMV человека (hCMV), как, например, минимальный промотор, полученный из предраннего промотора hCMV (см. патент США 20140127749 и Gossen and Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 5547-5551), включенные в данный документ с помощью ссылок). В другом варианте осуществления минимальный промотор получают из источника вирусного происхождения, такого как, например, ранние или поздние промоторы SV40, предранние

промоторы цитомегаловируса (CMV) или ранние промоторы вируса саркомы Payca (RSV); или из промоторов клеток эукариот, например промотор бета-актина (Ng, *Nuc. Acid Res.* 17:601-615, 1989; Quitsche et al., *J. Biol. Chem.* 264:9539-9545, 1989), промотор GADPH (Alexander, M.C. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:5092-5096, 1988, Ercolani, L. et al., *J. Biol. Chem.* 263:15335-15341, 1988), промотор TK-1 (тимидинкиназы), промоторы HSP (белка теплового шока), промотор UbB или UbC, PGK, промотор Efl-альфа или любой промотор эукариот, содержащий ТАТА-бокс (опубликованная заявка на выдачу патента США № 2014/0094392). В другом варианте осуществления минимальный промотор включает мини-промотор, такой как мини-промотор CLDN5, описанный в опубликованной заявке на выдачу патента США № 2014/0065666. В другом варианте осуществления минимальный промотор представляет собой промотор тимидинкиназы (TK). В одном варианте осуществления минимальный промотор является специфичным для ткани, как, например, один из промоторов, специфичных для мышечных клеток, минимальный промотор TnISlow, минимальный промотор TnIFast или промотор креатинкиназы мышц (опубликованная заявка на выдачу патента США № 2012/0282695). Каждый из этих документов включен в данный документ с помощью ссылки.

В одном варианте осуществления сигнал полиаденилирования (poly(A)) представляет собой минимальный poly(A)-сигнал, т.е. минимальную последовательность, необходимую для эффективного полиаденилирования. В одном варианте осуществления минимальная poly(A) представляет собой синтетическую poly(A), как, например, описанная в Levitt et al, *Genes Dev.*, 1989 Jul, 3(7):1019-25 и Xia et al, *Nat Biotechnol.* 2002 Oct; 20(10):1006-10. Электронная публикация 16 сентября 2002 года. В другом варианте осуществления poly(A) получают из poly(A) гена бета-глобина кролика. В одном варианте осуществления polyA действует в двух направлениях (An et al., 2006, *PNAS*, 103(49): 18662-18667. В одном варианте осуществления poly(A) получают из ранней сигнальной последовательности poly A SV40. Каждый из этих документов включен в данный документ с помощью ссылки.

Как описано в данном документе, в одном варианте осуществления один энхансер или один и тот же энхансер может регулировать транскрипцию нескольких гетерологичных генов в плазмидной конструкции. Разнообразные энхансеры, пригодные для применения по настоящему изобретению, известны из уровня техники и включают, например, ранний энхансер CMV, энхансер Нохс8, nPE1 и nPE2. Дополнительные энхансеры, подходящие с точки зрения данного документа, описаны в Andersson et al, *Nature*, 2014 March, 507 (7493) :455-61, включенной в данный документ с помощью ссылки. Еще другие энхансерные элементы могут включать, например, энхансер аполипопротеинов, энхансер из данио-рерио, энхансерный элемент GFAP и специфичные для тканей энхансеры, как, например, описанные в WO 2013/1555222, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка. Кроме того или альтернативно, могут быть выбраны другие, например гибридный промотор на основе промотора цитомегаловируса человека (HCMV)-предраннего промотора (IE)-промотора PDGR, или другие промотор-энхансерные элементы. Для усиления экспрессии другими элементами могут быть интроны (как интрон от Promega или химерный интрон на основе интрона глобина курицы-интрона иммуноглобулина человека). Другие промоторы и энхансеры, подходящие с точки зрения данного документа, можно найти в базе данных промоторов/энхансеров млекопитающих по адресу <http://promoter.cdb.riken.jp/>.

Конструкции, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать другие контрольные или регуляторные для экспрессии последовательности, такие как те, которые включают соответствующие, например, последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторные и энхансерные последовательности; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (polyA); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусную последовательность Kozak); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые усиливают секрецию закодированного продукта. Промотор может быть выбран из конститутивного промотора, специфичного для ткани промотора, специфичного для клетки промотора, промотора, отвечающего на физиологические стимулы, или регулируемого промотора (см., например, WO 2011/126868 и WO 2013/049492).

Эти контрольные последовательности "функционально связаны" с последовательностями генов конструкций иммуноглобулинов. В контексте данного документа термин "функционально связанный" относится как к контрольным для экспрессии последовательностям, расположенным смежно с геном, представляющим интерес, так и контрольным для экспрессии последовательностям, которые являются трансдействующими или действуют на расстоянии для контроля гена, представляющего интерес.

Примеры конститутивных промоторов, пригодных для контролирования экспрессии доменов антигенов, включают без ограничения промоторы β-актина курицы (CB) или бета-актина из других видов, промотор цитомегаловируса (CMV) человека, ранний и поздний промоторы вируса обезьян 40 (SV40), промотор U6, промоторы металлотинонеина, промотор EFla, промотор убиквитина, промотор гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), промотор дигидрофолатредуктазы (DHFR) (Scharfmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4626-4630 (1991), промотор аденозиндеаминазы, промотор фосфоглицерокиназы (PGK), промотор пируваткиназы, промотор фосфоглицеромутаза, промотор β-актина (Lai et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 86: 10006-10010 (1989), UbB, UbC, длинных концевых повторов (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса и другие конститутивные промоторы, известные специалистам в данной области. Примеры специфичных для ткани или клетки промоторов, пригодных для применения по настоящему изобретению, включают без ограничения промоторы эндотелина-I (ET-I) и Flt-I, которые являются специфичными для эндотелиальных клеток, FoxJ1 (который целенаправленно действует на реснитчатые клетки).

Индукцибельные промоторы, пригодные для контроля экспрессии доменов антител, включают промоторы, отвечающие на экзогенные средства (например, фармакологические средства) или физиологические стимулы. Элементы ответа включают без ограничения элемент ответа на гипоксию (HRE), который связывает HIF-1 α и β , элемент ответа на ионы металлов, такой как описанный Mayo et al. (1982, Cell 29:99-108); Brinster et al. (1982, Nature 296:39-42) и Searle et al. (1985, Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489); или элемент ответа на тепловой шок, такой как описанный Nouer et al. (в Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., pp167-220, 1991)

В одном варианте осуществления экспрессия открытой рамки считывания контролируется регулируемым промотором, который обеспечивает четкий контроль транскрипции ORF (гена), например, фармакологическим средством или транскрипционными факторами, которые активируются фармакологическим средством, или, в альтернативных вариантах осуществления, физиологическими стимулами. Примеры регулируемых промоторов, которые представляют собой комплексы лиганд-зависимый транскрипционный фактор, которые могут быть подходящими, включают без ограничения представителей суперсемейства ядерных рецепторов, которые активируются их соответствующими лигандами (например, глюкокортикоидом, эстрогеном, прогестинном, ретиноидом, экдизоном и их аналогами и миметиками), и tTTA, который активируется тетрациклином. Примеры таких систем включают без ограничения технологию для транскрипции ARGENT™ (ARIAD Pharmaceuticals, Кембридж, Массачусетс). Примеры таких систем промоторов описаны, например, в WO 2012/145572, включенном в данный документ с помощью ссылки.

Еще другие промоторы могут включать, например, предранний энхансер/промотор цитомегаловируса (CMV) человека, ранний энхансер/промотор SV40, промотор полиомавируса JC, промоторы основного белка миелина (MBP) или глиофибрилярного кислого белка (GFAP), связанный с латентностью промотор (LAP) вируса простого герпеса (HSV-1), промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV), промотор, специфичный для нейронов (NSE), промотор фактора роста тромбоцитов (PDGF), hSYN, промотор меланинконцентрирующего гормона (MCH), CBA, промотор глиофибрилярного кислого белка (GFAP), промотор металлопротеина матрикса (MPP) и промотор бета-актина курицы. Промоторы могут быть одинаковыми или разными для каждой кассеты экспрессии.

Для применения при получении вирусного вектора на основе AAV (например, рекомбинантного (r) AAV) кассеты экспрессии могут содержаться в любом пригодном векторе, например, плазмиде, которая доставляется в пакующую клетку-хозяина. Плазмиды, подходящие в данном изобретении, могут быть сконструированы таким образом, что они являются пригодными для репликации и упаковки в клетки прокариот, клетки млекопитающих или и те, и другие. Пригодные методики трансфекции и пакующие клетки-хозяева известны и/или могут быть легко разработаны специалистом в данной области.

Способы создания и выделения AAV, пригодных для применения в качестве векторов, известны из уровня техники. В общих чертах см., например, Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10:717-733; и ссылки, приведенные ниже, каждая из которых включена в данный документ с помощью ссылки в полном объеме. Для упаковки трансгена в вирионы ITR являются единственными компонентами AAV, которые необходимы в цис-положении в той же конструкции, что и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кассеты экспрессии. Гены сар и гер могут находиться в транс-положении.

Как описано выше, термин "приблизительно" в случае использования для варьирования числового значения означает колебание на $\pm 10\%$, если не указано иное.

Как используется по всему данному описанию и всей формуле изобретения, термины "включать" и "содержать" и их варианты, в том числе "включает", "включающий", "содержит" и "содержащий", среди других вариантов охватывают другие компоненты, элементы, целые числа, стадии и т.п. Термин "состоит из" или "состоящий из" не учитывает другие компоненты, элементы, целые числа, стадии и т.п.

Термины "идентичный" или процентная "идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей касаются двух или более последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. идентичными на приблизительно 70%, идентичными предпочтительно на 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше) в отношении определенного участка (например, какой-либо одной из модифицированных ORF, представленных в данном документе, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в

окне сравнения или сконструированном участке), как измерено с помощью алгоритмов для сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или с помощью выравнивания вручную и путем визуального осмотра (см., например, веб-сайт NCBI и т.п.). В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с помощью Fasta, программы в GCG версии 6.1. Fasta обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей участков наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска. Например, процентная идентичность последовательностей между последовательностями нуклеиновых кислот может быть определена с помощью Fasta с ее параметрами по умолчанию (длина сегмента б и NOPAM-фактор для матрицы замен), представленной в GCG версии 6.1, включенной в данный документ с помощью ссылки. В целом эти программы используют с настройками по умолчанию, но при необходимости специалист в данной области может менять эти настройки. Альтернативно специалист в данной области может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которые обеспечивают, по меньшей мере, такой же уровень идентичности или выравнивания, который обеспечивают упомянутые алгоритмы и программы. Это определение также относится к комплементарной последовательности для последовательности или может применяться в отношении нее. Определение также включает последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, а также такие, которые имеют замены. Как описано ниже, предпочтительные алгоритмы могут учитывать гэпы и т.п.

Предпочтительно идентичность имеет место в пределах участка длиной по меньшей мере приблизительно 25, 50, 75, 100, 150, 200 аминокислот или нуклеотидов и часто в пределах участка длиной 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500 аминокислот или нуклеотидов или в пределах полноразмерных аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот. Как правило, при выполнении выравнивания по аминокислотной последовательности выравнивание содержит вставки и делеции, определенные по отношению к эталонной последовательности AAV, и нумерация аминокислотных остатков основывается на эталонной шкале, предусмотренной для выравнивания. Тем не менее, любая данная последовательность AAV может иметь меньше аминокислотных остатков, чем эталонная шкала. В данном изобретении при обсуждении исходной последовательности термин "то же положение" или "соответствующее положение" относится к аминокислоте, расположенной по тому же номеру остатка в каждой из последовательностей, в отношении эталонной шкалы для выравниваемых последовательностей. Тем не менее, вне выравнивания каждый из белков может иметь эти аминокислоты, расположенные под различными номерами. Выравнивание выполняют с помощью любой из разнообразных программ для множественного выравнивания последовательностей в открытом доступе или коммерчески доступных. Программы для выравнивания последовательностей доступны для аминокислотных последовательностей, например, программы "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" и "Match-Box". В целом, любую из этих программ используют с настройками по умолчанию, но при необходимости специалист в данной области может менять эти настройки. Альтернативно специалист в данной области может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которые обеспечивают по меньшей мере такой же уровень идентичности или выравнивания, который обеспечивают упомянутые алгоритмы и программы. См., например, J.D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27 (13) :2682-2690 (1999).

В одном варианте осуществления описанные в данном документе кассеты экспрессии встроены в генетический элемент (например, челночную плазмиду), который переносит последовательности конструкций иммуноглобулинов, которые в них содержатся, в пакующую клетку-хозяина для продуцирования вирусного вектора. В одном варианте осуществления выбранный генетический элемент может быть доставлен в пакующую AAV клетку с помощью любого пригодного способа, в том числе трансфекции, электропорации, липосомной доставки, методик слияния мембран, высокоскоростных частиц, покрытых ДНК, вирусной инфекции и слияния протопластов. Можно также получать пакующие AAV стабильные клетки. Альтернативно кассеты экспрессии можно применять для создания вирусного вектора, отличного от AAV, или для получения смесей антител *in vitro*. Способы, применяемые для получения таких конструкций, известны специалистам в области манипуляции с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и методики синтеза. См., например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

Векторы на основе AAV

Рекомбинантный вектор на основе AAV (вирусных частиц AAV) может содержать запакованную в капсид AAV молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую 5'-ITR AAV, кассеты экспрессии, описанные в данном документе, и 3'-ITR AAV. Как описано в данном документе, кассета экспрессии может содержать регуляторные элементы для открытой рамки считывания (открытых рамок считывания) в каждой кассете экспрессии, и молекула нуклеиновой кислоты может необязательно содержать дополнительные регуляторные элементы.

Вектор на основе AAV может содержать полноразмерный 5'-инвертированный концевой повтор (ITR) AAV и полноразмерный 3'-ITR. Был описан укороченный вариант 5'-ITR, называемый AITR, в котором удалены D-последовательность и сайт концевого разрешения (trs). Сокращение "sc" означает самокомплементарный. "Самокомплементарный AAV" относится к конструкции, в которой кодирующий

участок, который содержится в последовательности нуклеиновой кислоты рекомбинантного AAV, был сконструирован для образования внутримолекулярной двухнитевой ДНК-матрицы. После инфицирования вместо того, чтобы ждать, пока произойдет опосредованный клеткой синтез второй нити, две комплементарные половины scAAV свяжутся с образованием единицы одной двухнитевой ДНК (dsDNA), готовой для непосредственной репликации и транскрипции. См., например, D.M. McCarty et al., "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254. Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США №№ 6596535; 7125717 и 7456683, каждый из которых включен в данный документ с помощью ссылки в полном объеме.

Если нужно получить псевдотипированный AAV, ITR выбирают из источника, отличного от источника капсида AAV. Например, ITR AAV2 могут быть выбраны для применения с капсидом AAV, который характеризуется особой эффективностью в отношении выбранного клеточного рецептора, целевой ткани или вируса-мишени. В одном варианте осуществления последовательности ITR из AAV2 или их укороченный вариант (AITR) применяют для удобства и ускорения получения разрешения регуляторного органа. Тем не менее, могут быть выбраны ITR из других AAV-источников. Если источником ITR является AAV2, а капсид AAV происходит из источника, которым является другой AAV, полученный вектор может быть назван псевдотипированным. Тем не менее, можно использовать другие источники ITR AAV.

Был описан ряд капсидов AAV. Способы создания векторов на основе AAV подробно описаны в литературе и патентных документах, в том числе, например, в WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Источник капсидов AAV может быть выбран из AAV, который целенаправленно действует на желаемую ткань. Например, пригодные AAV могут включать, например, AAV9 (US 7906111; US 2011-0236353-A1), rh10 (WO 2003/042397) и/или hu37 (см., например, US 7906111; US 2011-0236353-A1). Тем не менее, другие AAV включают, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 (патент США 7790449; патент США 7282199) и другие. Тем не менее, могут быть выбраны другие источники капсидов AAV и другие вирусные элементы, как и другие конструкции иммуноглобулинов и другие векторные элементы.

Представлен вирусный вектор на основе одонитевого AAV. Способы создания и выделения вирусных векторов на основе AAV, пригодных для доставки субъекту, известны из уровня техники. См., например, патент США 7790449; патент США 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689 и US 7588772 B2. Согласно одной системе клеточная линия-производитель транзигентно трансфицирована конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный ITR, и конструкцией (конструкциями), которая (которые) кодирует (кодируют) гер и сар. Согласно второй системе пакующую клеточную линию, которая стабильно вырабатывает гер и сар, подвергают транзигентной трансфекции конструкцией, кодирующей трансген, фланкированный ITR. В каждой из этих систем вирионы AAV продуцируются в ответ на инфекцию хелперными аденовирусом или герпесвирусом, что требует отделения гAAV от контаминирующего вируса. В последнее время были разработаны системы, которые не требуют инфекции хелперным вирусом для восстановления AAV - необходимые хелперные функциональные элементы (т.е. E1, E2a, VA и E4 аденовируса или UL5, UL8, UL52 и UL29 герпесвируса) также обеспечены системой в транс-положении. В этих более новых системах хелперные функциональные элементы могут быть обеспечены путем транзигентной трансфекции клеток конструкциями, кодирующими необходимые хелперные функциональные элементы, или клетки могут быть сконструированы таким образом, что стабильно содержат гены, кодирующие хелперные функциональные элементы, экспрессия которых может контролироваться на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. В еще другой системе фланкированный ITR трансген и гены гер/сар вводят в клетки насекомых путем инфицирования векторами на основе бакуловирусов. Для ознакомления с этими системами продуцирования в общих чертах см., например, Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," *Human Gene Therapy* 20:922-929, содержание каждого из которых включено в данный документ с помощью ссылки в полном объеме. Способы получения и применения этих и других систем продуцирования AAV также описаны в следующих патентах США, содержание которых включено в данный документ с помощью ссылки в полном объеме: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823 и 7439065.

Пути применения и схемы

гAAV, предпочтительно суспендированный в физиологически совместимом носителе, можно вводить пациенту-человеку или пациенту-млекопитающему, отличному от человека. Пригодные носители легко могут быть выбраны специалистом в данной области с учетом показания, для которого предназначен вирус-переносчик. Например, один пригодный носитель включает солевой раствор, который может быть составлен с разными буферными растворами (например, забуференный фосфатом солевой раствор). Другие иллюстративные носители включают стерильный солевой раствор, лактозу, сахарозу, мальтозу и воду. Выбор носителя не является ограничением настоящего изобретения. Необязательно композиции по настоящему изобретению могут содержать, кроме гAAV и носителя(носителей), другие общепринятые фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы.

Способы применения этих гAAV, например, для пассивной иммунизации описаны, например, в WO 2012/145572. Другие способы доставки и пути применения будут очевидны для специалиста в данной области. Например, схема, описанная в данном документе, может предусматривать кроме одной или нескольких комбинаций, описанных в данном документе, дополнительно комбинацию с одним или несколькими из биологического лекарственного средства, лекарственного средства на основе малых молекул, химиотерапевтического средства, иммуностимуляторов, облучения, оперативного вмешательства и т.п. В биологических лекарственных средствах, описанных в данном документе, за основу берут пептид, полипептид, белок, фермент, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор (в том числе вирусные векторы) и т.п.

При комбинированной терапии описанную в данном документе конструкцию иммуноглобулина, доставляемую с помощью AAV, вводят до, во время или после начальной терапии другим средством, а также предусматривается любая их комбинация, т.е. до и во время, до и после, во время и после или до, во время и после начальной терапии. Например, AAV можно вводить за 1-30 дней, предпочтительно 3-20 дней, более предпочтительно 5-12 дней до начальной лучевой терапии. В другом варианте осуществления настоящего изобретения химиотерапию применяют одновременно или, более предпочтительно, последовательно в отношении опосредованной AAV терапии иммуноглобулином (антителом). В еще других вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению можно комбинировать с другими биологическими препаратами, например лекарственными средствами на основе рекомбинантных моноклональных антител, конъюгатами антитело-лекарственное средство и т.п. Кроме того, комбинации разных конструкций иммуноглобулинов, доставляемых с помощью AAV, как, например, описанных выше, можно применять для таких схем.

Можно применять любой пригодный способ или путь введения содержащих AAV композиций, описанных в данном документе, и необязательно для совместного введения других активных лекарственных средств или терапевтических средств в сочетании с описанными в данном документе антителами, опосредованными AAV. Пути введения включают, например, системное, пероральное, внутривенное, внутривентрикулярное, подкожное или внутримышечное введение.

Мишени для конструкций иммуноглобулинов, описанных в данном документе, могут быть выбраны из ряда патогенов, в том числе, например, возбудителей инфекции бактериального, вирусного, грибкового и паразитарного происхождения. Пригодные мишени могут дополнительно включать антигены рака или антигены, связанные с раком, и т.п. Еще другие мишени могут включать аутоиммунное состояние, такое как ревматоидный артрит (RA) или рассеянный склероз (MS).

Примеры вирусных мишеней включают вирус гриппа из семейства Orthomyxoviridae, которое включает вирус гриппа А, вирус гриппа В и вирус гриппа С. Вирусы типа А наиболее вирулентны для человека патогены. Серотипы вируса гриппа А, связанные с пандемиями, включают H1N1, который вызвал испанский грипп в 1918 году и свиной грипп в 2009 году; H2N2, который вызвал азиатский грипп в 1957 году; H3N2, который вызвал гонконгский грипп в 1968 году; H5N1, который вызвал птичий грипп в 2004 году; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3 и H10N7.

Были описаны неспецифические нейтрализующие антитела против вируса гриппа А. В контексте данного документа выражение "неспецифические нейтрализующие антитела" относится к нейтрализующему антителу, способному нейтрализовать большое количество штаммов многих подтипов. Например, CR6261 (The Scripps Institute/ Crucell) было описано как моноклональное антитело, которое связывается с широким спектром вирусов гриппа, в том числе "испанского гриппа" 1918 года (SC1918/H1) и вирусом класса H5N1 птичьего гриппа, который был перенесен от кур к человеку во Вьетнаме в 2004 году (Viet04/H5). CR6261 распознает высококонсервативный спиральный участок проксимального к мембране "ствола" гемагглютинаина, основного белка поверхности вируса гриппа. Это антитело описано в WO 2010/130636, включенной в данный документ с помощью ссылки. Другое нейтрализующее антитело, F10 [XOMA Ltd], было описано как такое, которое является пригодным против H1N1 и H5N1. [Sui et al, Nature Structural and Molecular Biology (Sui, et al. 2009, 16(3):265-73)]. Могут быть выбраны другие антитела против вируса гриппа, например Fab28 и Fab49. См., например, WO 2010/140114 и WO 2009/115972, которые включены с помощью ссылки. Могут быть легко выбраны еще другие антитела, как, например, те, которые описаны в WO 2010/010466, публикации патента США US/2011/076265 и WO 2008/156763.

Другие целевые патогенные вирусы включают аренавирусы (в том числе Хунин, Мачупо и Ласса), филовирусы (в том числе Марбург и Эбола), хантавирусы, Picornaviridae (в том числе риновирусы, эховирус), коронавирусы, парамиксовирус, морбилливирус, респираторно-синцитиальный вирус, тогавирус, вирус Коксаки, парвовирус B19, паравирус гриппа, аденовирусы, реовирусы, вирус натуральной оспы (*Variola major* (черная оспа)), вирус осповакцины (коровья оспа) семейства поксвирусов и вирус ветряной оспы (псевдобешенство).

Вирусные геморрагические лихорадки вызываются представителями семейства аренавирусов (лихорадка Ласса), семейство которых также связано с лимфоцитарным хориоменингитом (LCM), филовирусом (вирусом Эбола) и хантавирусом (Пуумала). Представители пикорнавирусов (подсемейство риновирусов) связаны с простудой у людей. Семейство коронавирусов, которое включает ряд вирусов, не поражающих человека, таких как вирус инфекционного бронхита (сельскохозяйственные птицы), вирус

трансмиссивного гастроэнтерита свиней (свинья), гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней (свинья), вирус инфекционного перитонита кошек (кошка), коронавирус, вызывающий кишечные заболевания у кошек (кошка), коронавирус собак (собака). Респираторные коронавирусы человека, вероятно, связаны с простудой, гепатитом, который не относится к типам А, В или С, и тяжелым острым респираторным синдромом (SARS). Семейство парамиксовирусов включает вирус парагриппа 1 типа, вирус парагриппа 3 типа, бычий вирус парагриппа 3 типа, представителей рода рубулавирюсов (вирус эпидемического паротита), вирус парагриппа 2 типа, вирус парагриппа 4 типа, вирус болезни Ньюкасла (куры), вирус чумы крупного рогатого скота, морбилливирусы, которые включают вирус кори и вирус чумы собак, и пневмовирусы, которые включают респираторно-синцитиальный вирус (RSV). Семейство парвовирусов включает парвовирус кошек (энтерит кошек), вирус панлейкопении кошек, парвовирус собак и парвовирус свиней. Семейство аденовирусов включает вирусы (EX, AD7, ARD, O.B.), которые вызывают респираторные заболевания.

Также для применения по настоящему изобретению может быть выбрана конструкция нейтрализующих антител против патогена бактериального происхождения. В одном варианте осуществления конструкция нейтрализующего антитела направлена против бактерии как таковой. В другом варианте осуществления конструкция нейтрализующего антитела направлена против токсина, который продуцируют бактерии. Примеры бактериальных патогенов, которые передаются воздушно-капельным путем, включают, например, *Neisseria meningitidis* (менингит), *Klebsiella pneumoniae* (пневмония), *Pseudomonas aeruginosa* (пневмония), *Pseudomonas pseudomallei* (пневмония), *Pseudomonas mallei* (пневмония), представителей рода Ацинетобактер (пневмония), *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella lacunata*, *Alkaligenes*, представителей рода Кардиобактерии, *Haemophilus influenzae* (грипп), *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis* (коклюш), *Francisella tularensis* (пневмония/лихорадка), *Legionella pneumoniae* (легионеллез), *Chlamydia psittaci* (пневмония), *Chlamydia pneumoniae* (пневмония), *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулез (TB)), *Mycobacterium kansasii* (TB), *Mycobacterium avium* (пневмония), *Nocardia asteroides* (пневмония), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), *Staphylococcus aureus* (пневмония), *Streptococcus pyogenes* (скарлатина), *Streptococcus pneumoniae* (пневмония), *Corynebacteria diphtheria* (дифтерия), *Mycoplasma pneumoniae* (пневмония).

Возбудителем сибирской язвы является токсин, продуцируемый *Bacillus anthracis*. Описаны нейтрализующие антитела против защитного антигена (РА), одного из трех пептидов, которые формируют токсин. Другие два полипептида включают летальный фактор (LF) и фактор, вызывающий отек (EF). Нейтрализующие антитела к РА описаны как эффективные при пассивной иммунизации против сибирской язвы. См., например, патент США № 7442373; R. Sawada-Hirai et al, J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2: 5. (в режиме реального времени, 12 мая 2004 года). Еще другие нейтрализующие антитела к токсинам сибирской язвы были описаны и/или могут быть созданы. Аналогично нейтрализующие антитела к другим бактериям и/или бактериальным токсинам можно применять для создания конструкции против патогена, которую доставляют с помощью AAV, описанной в данном документе.

Другие инфекционные заболевания могут быть вызваны грибами, которые передаются воздушно-капельным путем, включая, например, виды *Aspergillus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor plumbeus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, видами *Penicillium*, *Micropolyspora faeni*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Alternaria alternate*, видами *Cladosporium*, *Helminthosporium* и видами *Stachybotrys*.

Кроме того, пассивную иммунизацию можно применять для предупреждения грибковых инфекций (например, эпидермофитии стопы), дерматофитии или заражения вирусами, бактериями, паразитами, грибами и другими патогенами, которые могут передаваться при непосредственном контакте. Кроме того, ряда состояний, которые поражают домашних любимцев, крупный рогатый скот, других сельскохозяйственных животных и других животных. Например, у собак инфицирование верхних дыхательных путей синоназальным аспергиллезом собак вызывает серьезное заболевание. У кошек заболевание верхних дыхательных путей или комплекс респираторных заболеваний кошек, возникающий в носу, при отсутствии лечения приводят к осложнениям и смерти. Крупный рогатый скот склонен к инфицированию бычьим инфекционным ринотрахеитом (называемым, как правило, IBR или "красный нос"), который представляет собой острое контагиозное вирусное заболевание крупного рогатого скота. Кроме того, крупный рогатый скот склонен к инфицированию бычьим респираторно-синцитиальным вирусом (BRSV), который вызывает респираторное заболевание от умеренной до тяжелой степени и может ослабить устойчивость к другим заболеваниям. Еще другие патогены и заболевания будут очевидны для специалиста в данной области. См., например, US 5811524, в котором описывается создание нейтрализующих антител к респираторно-синцитиальному вирусу (RSV). Методики, описанные в данном документе, применимы к другим патогенам. Такое антитело можно применять интактным, или его последовательности (каркас) модифицируют с получением искусственной или рекомбинантной конструкции нейтрализующего антитела. Такие способы были описаны (см., например, WO 2010/13036; WO 2009/115972; WO 2010/140114).

Противоопухолевые иммуноглобулины, описанные в данном документе, могут быть направлены на рецептор эпидермального фактора роста человека (HER), такой как HER2. Например, трастузумаб пред-

ставляет собой рекомбинантный IgG1/каппа, гуманизированное моноклональное антитело, которое в клеточном анализе избирательно связывается с высокой аффинностью ($K_d=5$ нМ) с внеклеточным доменом белка-рецептора эпидермального фактора роста человека. Коммерчески доступный продукт получают в культуре клеток CHO. См., например, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>. Аминокислотные последовательности легких цепей 1 и 2 и тяжелых цепей 1 и 2 трастузумаба, а также последовательности, полученные при исследовании структуры трастузумаба с помощью рентгенографии, представлены в этой базе данных под номером доступа DB00072, при этом последовательности включены в данный документ с помощью ссылки. См., также 212-Pb-TCMC-трастузумаб (Areva Med, Бетесда, Мэриленд). Другое антитело, представляющее интерес, включает, например, пертузумаб, рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, направленное на внеклеточный домен димеризации (субдомен II) белка-рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). Оно состоит из двух тяжелых цепей и двух легких цепей из 448 и 214 остатков соответственно. Одобрено FDA 8 июня 2012 года. Аминокислотные последовательности его тяжелой цепи и легкой цепи представлены, например, в базе данных по адресу www.drugbank.ca/drugs/DB06366 (синонимы включают 2C4, MOAB 2C4, моноклональное антитело 2C4 и rhuMAb-2C4) под номером доступа DB06366. Помимо HER2 могут быть выбраны другие HER-мишени.

Например, MM-121/SAR256212 представляет собой полное моноклональное антитело человека, направленное на рецептор HER3 (Merrimack's Network Biology), и которое, как сообщалось, подходит для лечения немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака молочной железы и рака яичников. SAR256212 представляет собой экспериментальное полное моноклональное антитело человека, направленное на рецептор HER3 (ErbB3) (Sanofi Oncology). Другое антитело к Her3/EGFR представляет собой RG7597 (Genentech), описанное как подходящее при формах рака головы и шеи. Также можно применять другое антитело, маргетуксимаб (или MGAH22), Fc-оптимизированное моноклональное антитело (mAb) нового поколения, направленное на HER (MacroGenics).

Альтернативно мишенями могут быть другие поверхностные маркеры эпителиальных клеток человека и/или другие рецепторы или антигены опухолей. Примеры других маркеров-мишеней клеточной поверхности включают, например, 5T4, CA-125, CEA (например, являющийся мишенью лабетузумаба), CD3, CD19, CD20 (например, являющийся мишенью ритуксимаба), CD22 (например, являющийся мишенью эспратузумаба или велтузумаба), CD30, CD33, CD40, CD44, CD51 (также интегрин $\alpha_v\beta_3$), CD133 (например, клеток глиобластомы), CTLA-4 (например, ипилимумаб, применяемый для лечения, например, нейробластомы), рецептор 2 хемокинов (мотив C-X-C) (CXCR2) (экспрессируемый в разных участках мозга; например, антитело к CXCR2 (внеклеточному) № ACR-012 (Alomene Labs)); ЕpCAM, белок активации фибробластов (FAP) (см., например, WO 2012020006 A2, формы рака головного мозга), рецептор фолиевой кислоты альфа (например, эпендимомы мозга у детей, формы рака головы и шеи), рецептор 1 фактора роста фибробластов (FGFR1), см. WO 2012125124 A1, что касается рассмотрения лечения форм рака антителами к FGFR1), FGFR2 (см., например, антитела, описанные в WO 2013076186 A и WO 2011143318 A2), FGFR3 (см., например, антитела, описанные в US 8187601 и WO 2010111367 A1), FGFR4 (см., например, антитела к FGFR4, описанные в WO 2012138975 A1), фактор роста гепатоцитов (HGF) (см., например, антитела, описанные в WO 2010119991 A3), интегрин $\alpha_5\beta_1$, рецептор IGF-1, ганглиозид GD2 (см., например, антитела, описанные в WO 2011160119 A2), ганглиозид GD3, трансмембранный гликопротеин NMB (GPNMB) (связанный, среди прочего, с глиомами, и который представляет собой мишень антитела глембатуумаба (CR011)), муцин, MUC1, фосфатидилсерин (например, мишень бавитуксимаба, Peregrine Pharmaceuticals, Inc), клетки карциномы предстательной железы, PD-L1 (например, ниволумаб (BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538), полный IgG4 человека (например, метастатическая меланома), рецептор фактора роста тромбоцитов, альфа (PDGFR α) или CD140, ассоциированный с опухолью гликопротеин 72 (TAG-72), тенасцин С, рецептор фактора некроза опухоли (TNF) (TRAIL-R2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)-А (например, являющийся мишенью бевацизумаба) и VEGFR2 (например, являющийся мишенью рамуциумаба)).

Другие антитела и их мишени включают, например, APN3 01 (hul4.19-IL2), моноклональное антитело (злокачественная меланома и нейробластома у детей, Apeiron Biologics, Вена, Австрия). Также см., например, моноклональное антитело, 8H9, которое было описано как подходящее для лечения солидных опухолей, в том числе метастатического рака головного мозга. Моноклональное антитело 8H9 представляет собой IgG1-антитело мыши со специфичностью к антигену B7H3 (United Therapeutics Corporation). Это антитело мыши может быть гуманизированным. Еще другие конструкции иммуноглобулинов, направленные на антиген B7-H3 и/или B7-H4, могут быть применимы по настоящему изобретению. Другое антитело представляет собой S58 (к GD2, нейробластома). Cotara™ (Peregrine Pharmaceuticals) представляет собой моноклональное антитело, описанное для лечения рецидивирующей глиобластомы. Другие антитела могут включать, например, авастин, фиклатузумаб, medi-575 и оларатумаб. Для применения по настоящему изобретению могут быть выбраны еще другие конструкции иммуноглобулинов или моноклональных антител. См., например, Medicines in Development Biologies, 2013 Report, pp. 1-87, публикация службы по предоставлению информации и по связям с общественностью от PhRMA, (202) 835-3460, которая включена в данный документ с помощью ссылки.

Например, иммуногены могут быть выбраны из различных семейств вирусов. Примером семейств вирусов, против которых было бы желательным формирование иммунного ответа, включают семейство пикорнавирусов, которое включает род риновирусов, которые обуславливают приблизительно 50% случаев простуды; род энтеровирусов, которые включают полиовирусы, вирусы Коксаки, эховирусы и энтеровирусы человека, такие как вирус гепатита А; и род афтовирусов, которые обуславливают заболевания, связанные с ящуром, преимущественно у животных, отличных от человека. Среди вирусов семейства пикорнавирусов целевые антигены включают VP1, VP2, VP3, VP4 и VPg. Другое семейство вирусов включает семейство калицивирусов, которое охватывает группу норовирусов, которые являются важными возбудителями эпидемического гастроэнтерита. Еще другое семейство вирусов, желательное для применения в качестве целевых антигенов для стимулирования иммунных ответов у людей и животных, отличных от человека, представляет собой семейство тогавирусов, которое включает род альфавирусов, который включает вирус Синдбис, вирус лихорадки Росс-ривер и вирусы венесуэльского, восточного и западного энцефалита коней, и рубивирусов, в том числе вирус краснухи. Семейство Flaviviridae включает вирусы лихорадки Денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, американского энцефалита и клещевого энцефалита. Другие целевые антигены могут быть получены из вируса гепатита С или семейства коронавирусов, которое включает ряд вирусов, которые не поражают человека, такие как вирус инфекционного бронхита (сельскохозяйственные птицы), вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (свинья), гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней (свинья), вирус инфекционного перитонита кошек (кошки), коронавирус, который вызывает кишечные заболевания у кошек (кошка), коронавирус собак (собака) и респираторных коронавирусов человека, которые могут вызвать простуду и/или гепатит, который не относится к типам А, В или С. Среди вирусов семейства коронавирусов целевые антигены включают Е1 (также называемый М или матричный белок), Е2 (также называемый S или белок Spike), гликопротеин Е3 (также называемый HE или гемагглютинин эстераза), присутствующий не у всех коронавирусов, или N (нуклеокапсид). Еще другие антигены могут быть мишенями против семейства рабдовирусов, которое включает род везикуловирусов (например, вирус везикулярного стоматита) и род лиссавирусов (например, вирус бешенства).

Среди вирусов семейства рабдовирусов пригодные антигены могут быть получены из белка G или белка N. Семейство Filoviridae, которое включает вирусы геморрагической лихорадки, такие как вирус Марбург и Эбола, могут быть пригодными источниками антигенов. Семейство парамиксовирусов включает вирус парагриппа 1 типа, вирус парагриппа 3 типа, бычий вирус парагриппа 3 типа, представителей рода рубулавирусов (вирус эпидемического паротита), вирус парагриппа 2 типа, вирус парагриппа 4 типа, вирус болезни Ньюкасла (куры), вирус чумы крупного рогатого скота, морбилливирусы, которые включают вирус кори и вирус чумы собак, и пневмовирусы, которые включают респираторно-синцитиальный вирус. Вирус гриппа принадлежит к семейству ортомиксовирусов и представляет собой пригодный источник антигена (например, белок HA, белок N1). Семейство буньявирусов включает род буньявирусов (вирус калифорнийского энцефалита, вирус Ла Кросс), флебовирусов (вирус лихорадки Рифт-Валли), хантавирусов (вирус Пуумала представляет собой вирус геморрагической лихорадки), наиравирусов (вирус болезни найробийских овец) и ряд неопределенных буньявирусов. Семейство аренавирусов является источником антигенов к вирусу LCM и лихорадки Ласса. Семейство реовирусов включает род реовирусов, ротавирусов (которые вызывают острый гастроэнтерит у детей), орбивирусов и культивирусов (колорадская клещевая лихорадка, Лебомбо (у людей), цереброз коней, африканская картальная лихорадка).

Семейство ретровирусов включает под семейство Oncovirinae, которое охватывает такие заболевания человека и ветеринарные заболевания как вирусный лейкоз кошек, HTLV I и HTLV II, Lentivirinae (которое включает вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус инфекционной анемии коней и Spumavirinae).

Среди лентивирусов было описано большое количество пригодных антигенов, и они могут быть легко выбраны в качестве мишеней. Примеры пригодных антигенов HIV и SIV включают без ограничения белки gag, pol, Vif, Vpr, Vpr, Env, Tat, Nef и Rev, а также различные их фрагменты. Например, пригодные фрагменты белка Env могут включать любую из его субъединиц, таких как gp120, gp160, gp41 или их меньшие фрагменты, например длиной по меньшей мере приблизительно 8 аминокислот. Аналогично могут быть выбраны фрагменты белка tat. (См. патент США 5891994 и патент США 6193981.) См. также белки HIV и SIV, описанные в D.H. Barouch et al, J. Virol., 75 (5) :2462-2467 (March 2001) и R.R. Amara, et al, Science, 292:69-74 (6 April 2001). В другом примере иммуногенные белки или пептиды HIV и/или SIV можно применять для получения белков слияния или других иммуногенных молекул. См., например, белки слияния Tat и/или Nef HIV-1 и схемы иммунизации, описанные в WO 01/54719, опубликованной 2 августа 2001 года, и WO 99/16884, опубликованной 8 апреля 1999 года. Настоящее изобретение не ограничивается иммуногенными белками или пептидами HIV и/или SIV, описанными в данном документе. Кроме того, различные модификации в отношении этих белков были описаны, или они легко могут быть выполнены специалистом в данной области. См., например, модифицированный белок gag, описанный в патенте США 5972596.

Семейство паповавирусов включает подсемейство полиомавирусов (вирусы BKU и JCU) и под се-

мейство папилломавирусов (связанных с формами рака или злокачественным перерождением папилломы). Семейство аденовирусов включает вирусы (EX, AD7, ARD, O.B.), которые вызывают респираторные заболевания и/или энтерит. Семейство парвовирусов включает парвовирус кошек (энтерит кошек), вирус панлейкопении кошек, парвовирус собак и парвовирус свиней. Семейство герпесвирусов включает под семейство *Alphaherpesvirinae*, которое охватывает роды симплекс-вирусов (HSV1, HSV2), варицелловирусов (псевдобешенство, ветряная оспа), и подсемейство *Betaherpesvirinae*, которое включает род цитомегаловирусов (HCMV, муромегаловирус), и под семейство *Gammaherpesvirinae*, которое включает род лимфокриптовирусов, EBV (лимфома Беркитта), вирус инфекционного ринотрахеита, вирус болезни Марека и радиновирусы. Семейство поксвирусов включает под семейство *Chordopoxvirinae*, которое охватывает род ортопоксвирусов (вирус натуральной оспы (черная оспа) и вирус осповакцины (коровья оспа)), парапоксвирусов, авипоксвирусов, каприпоксвирусов, лепорипоксвирусов, суипоксвирусов, и под семейство *Entomopoxvirinae*. Семейство гепаднавирусов включает вирус гепатита В. Один неклассифицированный вирус, который может быть пригодным источником антигенов, представляет собой вирус гепатита дельта. Еще другие вирусные источники могут включать вирус инфекционного бурсита птиц и вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней. Семейство альфавирусов включает вирус артеита коней и ряд вирусов энцефалита.

Другие патогенные мишени для антител могут включать, например, бактерии, грибки, паразитические микроорганизмы или многоклеточных паразитов, которые инфицируют человека или позвоночных животных, отличных от человека, или могут происходить из раковой или опухолевой клетки. Примеры бактериальных патогенов включают патогенные грам положительные кокки, включающие пневмококки; стафилококки и стрептококки. Патогенные грамотрицательные кокки включают менингококк, гонококк. Патогенные кишечные грам отрицательные палочковидные бактерии включают *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas*, ацетатобактерии и *Eikenella*; бактерии, вызывающие мелиоидоз; *Salmonella*; *Shigella*; *Haemophilus*; *Moraxella*; *H. ducreyi* (вызывающая мягкий шанкр); *Brucella*; *Francisella tularensis* (вызывающая туляремию); *Yersinia (Pasteurella)*; *Streptobacillus moniliformis* и *Spirillum*; грамположительные палочковидные бактерии включают *Listeria monocytogenes*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Corynebacterium diphtheria* (дифтерия); бактерию, вызывающую холеру; *B. anthracis* (сибирская язва); бактерии, вызывающие донованоз (паховая гранулема); и бактерии, вызывающие бартонеллез. Заболевания, вызываемые патогенными анаэробными бактериями, включают столбняк; ботулизм; другие заболевания, вызываемые клостридиями; туберкулез; лепру и другие заболевания, вызываемые микобактериями. Заболевания, вызванные патогенными спирохетами, включают сифилис; трепонематозы: фрамбезию, пинту и эндемический сифилис; и лептоспироз. Другие инфекции, вызванные бактериями более высокой степени патогенности и патогенными грибами, включают актиномикоз; нокардиоз; криптококкоз, бластомикоз, гистоплазмоз и кокцидиоидомикоз; кандидоз, аспергиллез и мукоромикоз; споротрихоз; паракокцидиомикоз, алешериоз, торулопсоз, мицетому и хромомикоз и дерматофитоз. Инфекции, вызванные риккетсиями, включают сыпной тиф, пятнистую лихорадку Скалистых гор, Ку-лихорадку и риккетсиоз. Примеры инфекций, вызванных микоплазмой и хламидиями, включают: инфекции, вызванные *Mycoplasma pneumoniae*; венерическую лимфогранулему; орнитоз и перинатальные инфекции, вызванные хламидиями. Патогенные эукариоты охватывают патогенных простейших и гельминтов, и вызванные ими инфекции включают: амебиаз; малярию; лейшманиоз; трипанозомоз; токсоплазмоз; инфекции, вызванные *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; бабезиоз; лямблиоз; трихинеллез; филяриоз; шистосомоз; инфекции, вызванные нематодами; трематодами или сосальщиками и цестодами (ленточными червями).

Многие из этих организмов и/или продуцируемых ими токсинов были идентифицированы центрами по контролю заболеваний ((CDC), Министерство здравоохранения и социального обеспечения, США) как агенты, перспективные для применения для биологических атак. Например, некоторые из этих биологических агентов включают *Bacillus anthracis* (сибирская язва), *Clostridium botulinum* и его токсин (ботулизм), *Yersinia pestis* (чума), *Variola major* (черная оспа), *Francisella tularensis* (туляремия) и вирусы, вызывающие геморрагические лихорадки (филовирусы (например, Эбола, Марбург) и аренавирусы (например, Ласса, Мачупо)), все из которых на данный момент классифицируют как агенты категории А; *Coxiella burnetii* (Ку-лихорадка); виды *Brucella* (бруцеллез), *Burkholderia mallei* (can), *Burkholderia pseudomallei* (melioidоз), *Ricinus communis* и ее токсин (рициновый токсин), *Clostridium perfringens* и ее токсин (эпсилон токсин), виды *Staphylococcus* и их токсины (энтеротоксин В), *Chlamydia psittaci* (орнитоз), агенты, связанные с обезвоживанием (например, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*), сыпной тиф (*Richettsia powazekii*) и вирусный энцефалит (альфавирусы, например, венесуэльского энцефалита коней; восточного энцефалита коней; западного энцефалита коней), все из которых на данный момент классифицируют как агенты категории В; и вирус Нипа и хантавирусы, которые на данный момент классифицируют как агенты категории С. Кроме того, другие организмы, классифицированные таким образом или классифицированные другим образом, могут быть идентифицированы и/или применимы для таких целей в будущем. Будет легко понять, что вирусные векторы и другие конструкции, описанные в данном документе, подходят для нацеливания на антигены из этих организмов, вирусов, их токсинов или других продуктов обмена, которые будут предупреждать и/или лечить инфекцию или другие побочные реакции, связанные с этими биологическими агентами.

Следующие примеры являются только иллюстративными и не ограничивают настоящее изобретение, описанное в данном документе.

Пример 1. Создание векторов, содержащих кассеты совместной экспрессии полноразмерных антител.

Серию цис-плазмид получали для применения при создании вирусной частицы AAV, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты для доставки в целевую клетку-хозяина. Молекулы нуклеиновой кислоты содержат 5'- и 3'-ITR последовательности AAV2 на каждом конце, совместный энхансер CMV, фланкированный двумя кассетами экспрессии в противоположных направлениях, где первая кассета экспрессии находится под контролем первого минимального промотора CMV, а вторая кассета экспрессии находится под контролем второго минимального промотора CMV. Все последовательности, расположенные между ITR AAV2, были синтезированы de novo коммерческим поставщиком (GeneArt). Все кодирующие последовательности для переменных доменов иммуноглобулина были фланкированы уникальными сайтами распознавания рестрикционными ферментами для обеспечения возможности удобного перемещения желаемых переменных доменов. Для создания конструкций с гетерологичной последовательностью легкой цепи (kgl) кодирующую последовательность, кодирующую легкую цепь антитела зародышевой линии (IGKV4-1*01), синтезировали de novo и применяли для замены последовательности переменного домена легкой цепи FI6.

Иллюстративный челночный вектор для совместной экспрессии антител показан на фиг. 2. Челночный вектор содержит слева от энхансера первую кассету экспрессии, которая содержит, справа налево, минимальный промотор CMV, гетерологичную лидерную последовательность IL2, соединенную с переменным доменом тяжелой цепи (VH) антитела к TSG101 (1A6), CH1-домен и CH2-3 домен, который был оптимизирован для экспрессии у людей, и синтетическую polyA. Справа от энхансера расположены минимальный промотор CMV, гетерологичная лидерная последовательность IL2, переменный домен легкой цепи FI6k2 (антитела к вирусу гриппа) и константный домен легкой цепи, сайт расщепления фурином, линкер 2a из вируса ящура, лидерная последовательность IL2, VH, CH1, CH2-3 FI6v3 и короткая polyA-последовательность тимидинкиназы. Обозначение CH относится к известному аллотипу антитела G1m17,1.

SEQ ID NO: 1 предусматривает последовательности константных участков FI6. Аминокислотная последовательность аминокислотной легкой цепи FI6 представлена под SEQ ID NO: 2.

Цис-плазмиду с фиг. 2 применяли в способе тройной трансфекции, раньше описанной, например, в заявке на выдачу патента США № 12/226558, для создания векторов AAV8 и AAV9, которые применяли в последующих исследованиях, описанных в данном документе. Полученная плазида, pN509_ACE FI6-1A6 MAB p3160, составляла 7722 п.о. в длину, ее последовательность представлена под SEQ ID NO: 3, которая включена в данный документ с помощью ссылки вместе с ее признаками. Также представлены кодируемые последовательности для переменного домена легкой цепи (VL) FI6 (SEQ ID NO: 4), переменного домена тяжелой цепи FI6 (SEQ ID NO: 5), CH1 (SEQ ID NO: 6), CH2-3 (SEQ ID NO: 7).

Подобные цис-плазмиды для совместной экспрессии антител создавали путем субклонирования антитела к вирусу сезонного гриппа (CR8033), или антитела к вирусу пандемического гриппа (C05), или антитела к M2e (TCN-032) вместо переменного домена тяжелой цепи 1A6 на фиг. 2, с применением предварительно расположенных уникальных сайтов рестрикции, что позволяет легко переставлять переменные домены. В свою очередь, эти цис-плазмиды применяли для тройной трансфекции (например, осуществляемой, как описано в заявке на выдачу патента США № 12/226588) для создания векторов AAV8 и AAV9, применяемых для дальнейших исследований. Последовательности для челночного вектора pN510_ACE FI6-C05 MAB представлены под SEQ ID NO: 8; аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи представлена под SEQ ID NO: 9, константного домена легкой цепи представлена под SEQ ID NO: 10, переменного домена тяжелой цепи FI6 представлена под SEQ ID NO: 11, CH1 представлена под SEQ ID NO: 12, и CH2-3 представлена под SEQ ID NO: 13.

Последовательности для челночного вектора pN514_ACE FI6-C05 MAB представлены под SEQ ID NO: 19; аминокислотная последовательность константного домена легкой цепи представлена под SEQ ID NO: 20, переменного домена тяжелой цепи FI6 представлена под SEQ ID NO: 21, CH1 представлена под SEQ ID NO: 22 и CH2-3 представлена под SEQ ID NO: 23. Эти челночные векторы в свою очередь применяли для создания векторов AAV8 и AAV9, которые применяли для дальнейших исследований.

Пример 2. Определение характеристик продуктов, экспрессированных из векторов AAV8, совместно экспрессирующих моноклональное антитело (MAB) FI6 и MAB 1A6

После трансфекции в клетки HEK 293 проводили серию анализов ELISA для определения уровней экспрессии и оценки связывания MAB FI6, совместно экспрессированного с MAB 1A6 из цис-плазмиды, созданной как описано в примере 1. Пептид TSG101 синтезировали с помощью химического вещества f-Mos от Mimotopes. Все антигены вируса гриппа закупали у коммерческого поставщика, Immune Technologies, Inc. Белок A был приобретен у Sigma-Aldrich, и его применяли для проверки уровня экспрессии общего IgG1 человека. Выявление IgG1 человека в супернатантах культуры тканей определяли или с помощью антиген-специфического ELISA, или ELISA с иммобилизованным белком A. Планшеты для ELISA с высокой степенью связывания покрывали 2 мкг/мл белков или пептидов HA или 5 мкг/мл белка A, разведенного в PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки промывали 5-8 раз и блокировали

1 mM EDTA, 5% термоинактивированным PBS, 0,07% Tween 20 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Супернатанты культуры тканей добавляли в планшеты в разных разведениях в двух повторностях и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали, блокировали и добавляли антитело козы к IgG человека Affinipures, конъюгированное с Bio-SP, в разведении 1:10000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест Грив, Пенсильвания, США). Через 1 ч планшеты промывали и добавляли конъюгированную со стрептавидином пероксидазу хрена (HRP) в разведении 1:30000. Через один час планшеты промывали и добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB). Реакцию останавливали через 30 мин при комнатной температуре с помощью 2 н. серной кислоты и считывали планшеты при 450 нм с помощью планшет-ридера μ Quant от BioTek (Уинуски, Вермонт, США).

Как и ожидалось, не наблюдали связывание FI6 с пептидом TSG101, HA (B/Malaysia/2506/2/004) или HA (только участок, представляющий собой "головку" белка, штамма вируса гриппа A/Brisbane/59/2007). Связывание FI6 наблюдали для этого же штамма вируса гриппа при наличии полноразмерного HA, а также для штамма вируса гриппа с HA(dTM)(A/Beijing/01/2009, H1N1)). Как и ожидалось, связывание FI6 также наблюдали для белка А.

Согласно опубликованным данным FI6, полученное согласно способам из уровня техники, связывается с полноразмерным HA и "стволом" HA, но не отдельно с участком, представляющим собой "головку". Из этих данных видно, что совместно экспрессированное моноклональное антитело FI6 сохраняет свой характерный профиль связывания.

Пример 3. Определение характеристик продуктов, экспрессированных из векторов AAV8, совместно экспрессирующих моноклональное антитело (MAB) FI6 и MAB C05 к вирусу пандемического гриппа.

Возможность дифференциального выявления двух разных моноклональных антител оценивали в анализе захвата. Моноклональные антитела FI6 и C05, совместно экспрессированные из цис-плазмиды, полученной как описано в примере 1 и трансфицированной в клетки HEK293, оценивали в отношении связывания. Ожидалось, что FI6 будет связываться с полноразмерным HA и "стволом" HA, но не отдельно с участком, представляющим собой "головку". Из результатов исследования в отношении связывания, показанных на фиг. 3, видно, что совместно экспрессированные антитела сохраняют возможность своего характерного связывания. Более конкретно, наблюдали связывание FI6 с полноразмерным HA и отличительным признаком в виде "ствола" HA, а также наблюдали связывание C05 с HA и отличительным признаком в виде "головки" HA отдельно (не "стволом"). Анализы ELISA проводили как описано в примере 2.

Пример 4. Определение характеристик продуктов, экспрессированных из векторов AAV8, совместно экспрессирующих моноклональное антитело (MAB) FI6 и второе полноразмерное MAB.

Самцов мышей RAG KO возрастом 6-8 недель (The Jackson Laboratory Bar Harbor, Мэн, США) содержали в стерильных условиях в лабораториях прикладных исследований Пенсильванского университета. Все процедуры и протоколы в отношении животных одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных. Мышей умерщвляли путем асфиксии двуокисью углерода и подтверждали смерть путем цервикальной дислокации. Для введения вектора мышам анестезировали смесью из 70 мг/кг веса тела кетамина и 7 мг/кг веса тела ксилазина с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции. Векторы разводили в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) и выполняли IM инъекции с помощью шприца Гамильтона. Сыворотку собирали каждую неделю путем забора образцов крови из ретроорбитального синуса.

Выявление IgG1 человека в супернатантах культуры тканей определяли с помощью ELISA с иммобилизованным белком А. Планшеты для ELISA с высокой степенью связывания покрывали 5 мкг/мл белка А, разведенного в PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки промывали 5-8 раз и блокировали 1 mM EDTA, 5% термоинактивированным PBS, 0,07% Tween 20 в PBS. Образцы мышинной сыворотки инактивировали нагреванием, добавляли в планшеты в разных разведениях в двух повторностях и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали, блокировали и добавляли антитело козы к IgG человека Affinipures, конъюгированное с Bio-SP, в разведении 1:10000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест Грив, Пенсильвания, США). Через 1 ч планшеты промывали и инкубировали с конъюгированной со стрептавидином пероксидазой хрена (HRP) в разведении 1:30000. Через 1 ч планшеты промывали и добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB). Реакцию останавливали через 30 мин при комнатной температуре с помощью 2 н. серной кислоты и считывали планшеты при 450 нм с помощью планшет-ридера μ Quant от BioTek (Уинуски, Вермонт, США).

На фиг. 5 показаны уровни общей экспрессии относительно общего IgG1 человека у мышам, которым вводили вектор на основе AAV, который совместно экспрессирует FI6 с антителом IA6. Мышам внутримышечно инъецировали в дозах 1×10^{11} геномных копий (GC) или 1×10^{10} GC. Уровни экспрессии оценивали на 7, 15, 21, 28, 34, 42, 49 и 56 дни и измеряли в концентрации мкг/мл. Наблюдали зависимость от дозы повышение уровня экспрессии.

Пример 5. Определение характеристик продуктов, экспрессированных из векторов AAV8, совместно экспрессирующих моноклональное антитело (MAB) FI6 и три разных полноразмерных моноклональных антитела.

В таблицах ниже показаны уровни экспрессии у мышам, которым вводили вектор на основе AAV,

который совместно экспрессирует F16 с полноразмерным моноклональным антителом CR8033, C05 или 1A6. Нокаутным (KO) по RAG мышам внутримышечно инъектировали в дозах 1×10^{11} геномных копий (GC) или 1×10^{10} GC, как описано в предыдущем примере. Уровни экспрессии оценивали на 7, 15, 21, 28, 34, 42 и 49 дни и измеряли в концентрации мкг/мл. Для экспрессированных антител наблюдали зависимость от дозы повышение уровня экспрессии. Иммунизованный антиген, применяемый для анализа, представлял собой белок А для ELISA, как описано в предыдущем примере.

Исследуемый образец	Fi6v3k2 mAb+CR8033 mAb			
Доза	$1,00 \times 10^{11}$		$1,00 \times 10^{10}$	
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Среднее значение	Стандартное отклонение
0 день	0,00	0,00	0,00	0,00
7 день	2,92	0,48	0,04	0,07
14 день	18,30	4,79	1,24	0,66
21 день	33,69	7,45	2,09	0,88
28 день	43,38	10,92	2,84	1,81
35 день	66,45	16,61	4,47	1,86
42 день	64,25	12,06	4,37	2,35
49 день	51,36	11,90	3,57	1,52

Исследуемый образец	Fi6v3k2 mAb+C05 mAb			
Доза	$1,00 \times 10^{11}$		$1,00 \times 10^{10}$	
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Среднее значение	Стандартное отклонение
0 день	0,00	0,00	0,00	0,00
7 день	1,73	0,42	0,00	0,00
14 день	9,95	3,39	0,24	0,22
21 день	24,74	11,66	0,81	0,24
28 день	22,32	4,77	1,11	0,17
35 день	31,67	7,93	1,53	0,28
42 день	34,69	14,46	1,83	0,29
49 день	26,14	5,85	1,46	0,49

0 день	0	0	0	0
7 день	2,70	0,75	0	0
14 день	5,01	0,06	1,58	0,055
21 день	30,16	13,31	1,71	0,52
28 день	38,18	15,99	2,16	0,59
35 день	55,18	18,52	4,09	1,53
42 день	50,49	16,61	3,69	0,94
49 день	46,66	15,59	3,73	1,09

Пример 6. Противовирусный эффект обеспечивается полноразмерными антителами с двумя типами специфичности, экспрессированными с одного вектора AAV9 и/или AAV8, введенных внутримышечно.

А) AAV9.BiD.F16_CR8 033mAb и контрольное заражение вирусом гриппа А.

Мышам BALB/c внутримышечно инъецировали с доставкой AAV9.BiD.FI6 CR8033mAb, который был доставлен внутримышечно (IM) в дозе 1×10^{11} GC. Через две недели мышам проводили контрольное заражение путем интраназального введения 5LD50 адаптированного для мышей PR8 (вирус гриппа А). Кружок представляет конструкцию на основе AAV9 с промотором, функционирующим в двух направлениях, которая экспрессирует синтетические моноклональные антитела FI6 и CR8033 с одинаковой гетерологичной легкой цепью. Квадрат представляет положительный контроль, т.е. AAV9, экспрессирующий одно антитело типа FI6, также введенное в дозе 1×10^{11} GC, а треугольник представляет необработанных животных. На фиг. 6B показано выживание после контрольного заражения. Введение AAV9.BiD.FI6 CR8033mAb в дозе 10^{11} GC/мышь обеспечивало частичную защиту со значительной поддержкой в потере веса.

В) AAV9.BiD.FI6_CR8 033mAb и контрольное заражение вирусом гриппа В.

Для инъекции вектора на основе AAV9: самок мышей BALB/c анестезировали с помощью внутримышечной инъекции смеси 100 мг/кг кетамина/ 10 мг/кг ксилазина в PBS, и инъецировали вектор AAV9.BiD.FI6_CR8033mAb внутримышечно (IM) в дозе 1×10^{11} GC на мышь. Вектор BiD сравнивали с AAV9, экспрессирующим одно антитело типа CR8033, также доставленное в дозе 1×10^{11} GC, и отрицательным контролем (необработанные животные). На фиг. 7B показано выживание после контрольного заражения. Для контрольного заражения вирусом гриппа через две недели после обработки вектором, обработанных AAV и необработанных мышей BALB/c взвешивали и хвосты отмечали цветом, их анестезировали как описано выше, подвешивали за их верхние резцы, при этом задними конечностями они опирались на платформу, и вводили интраназально 5LD50 B/Lee/40 (вирус гриппа В) в общем объеме 50 мкл PBS, как описано выше. Затем мышей взвешивали каждый день и проверяли в отношении признаков заболевания или истощения. Животных, у которых проявлялись поведенческие признаки истощения или потеря 30% их исходного веса тела, подвергали эвтаназии путем асфиксии CO₂.

Фиг. 7A представляет собой линейный график, на котором показано изменение веса в процентах. Эти данные показывают, что полный защитный эффект обеспечивался экспрессированными антителами с двумя типами специфичности в данной дозе. На фиг. 7B показано выживание после контрольного заражения.

С) Векторы AAV8.FI6-TCN032, AAV8.FI6-1A6 и AAV8.FI6-CR8 033, вводимые IM, и контрольное заражение мышши адаптированным вирусом гриппа А PR8.

Эти векторы получали как описано в примере 1. Самцов мышей RAG KO возрастом 6-8 недель (The Jackson Laboratory Bar Harbor, Мэн, США) содержали в стерильных условиях в лабораториях прикладных исследований Пенсильванского университета. Все процедуры и протоколы в отношении животных одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных. Для введения вектора мышшей анестезировали смесью из 70 мг/кг веса тела кетамина и 7 мг/кг веса тела ксилазина с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции. Векторы разводили в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) и выполняли IM инъекции с помощью шприца Гамильтона. Сыворотку собирали каждую неделю путем забора образцов крови из ретроорбитального синуса.

Выявление IgG1 человека в супернатантах культуры тканей определяли с помощью ELISA с иммобилизованным белком А. Планшеты для ELISA с высокой степенью связывания покрывали 5 мкг/мл белка А, разведенного в PBS, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки промывали 5-8 раз и блокировали 1 mM EDTA, 5% термоинактивированным PBS, 0,07% Tween 20 в PBS. Образцы мышшиной сыворотки инактивировали нагреванием, и добавляли в планшеты в разных разведениях в двух повторностях, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Планшеты промывали, блокировали и добавляли антитело козы к IgG человека Affinipures, конъюгированное с Bio-SP, в разведении 1:10000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест Грив, Пенсильвания, США). Через 1 ч планшеты промывали и инкубировали с конъюгированной со стрептавидином пероксидазой хрена (HRP) в разведении 1:30000. Через 1 ч планшеты промывали и добавляли 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB). Реакцию останавливали через 30 мин при комнатной температуре с помощью 2 н. серной кислоты и считывали планшеты при 450 нм с помощью планшет-ридера μ Quant от BioTek (Уинуски, Вермонт, США).

Ссылаясь на фиг. 8C, на всех секциях уровней экспрессии указаны для 56 дня после введения вектора. Через пару дней после последнего забора образцов крови из ретроорбитального синуса на 56 день мышей взвешивали и хвосты отмечали цветом, их анестезировали как описано выше, подвешивали за их верхние резцы, при этом задними конечностями они опирались на платформу, и вводили интраназально 5LD₅₀ адаптированного для мышей PR8 (вирус гриппа А) в общем объеме 50 мкл PBS, как описано выше. Затем мышей взвешивали каждый день и проверяли в отношении признаков заболевания или истощения. Животных, у которых проявлялись поведенческие признаки истощения или потеря 30% их исходного веса тела, подвергали эвтаназии путем асфиксии CO₂ и подтверждали смерть путем цервикальной дислокации. На фиг. 8A показано, что общая экспрессия всего лишь 25 мкг/мл антитела к вирусу гриппа является достаточной для обеспечения защиты от контрольного заражения PR8, а экспрессии 0,4 мкг/мл недостаточно для защиты.

Д) AAV9. mAb FI6_1A6 и контрольное заражение вирусом гриппа А.

Вектор AAV9, экспрессирующий искусственное FI6 и иммуноадгезин к HIV, IA6, оценивали в отношении защиты против контрольного заражения вирусом гриппа А, как описано выше. На фиг. 8В показано, что экспрессия 36,5 мкг/мл антитела к вирусу гриппа является достаточной для обеспечения полной защиты против контрольного заражения PR8. На фиг. 8С показано, что экспрессия 6,9 мкг/мл антитела к вирусу гриппа не является достаточной для защиты против контрольного заражения PR8.

Пример 8. Создание векторов, содержащих кассеты совместной экспрессии двух иммуноадгезинов.

С применением челночного вектора, подобного такому, проиллюстрированному на фиг. 2, создавали векторы, содержащие два иммуноадгезина.

В одном варианте осуществления создавали вектор, содержащий иммуноадгезины FI6 и C05. Последовательности из плазмиды, содержащей кассеты экспрессии иммуноадгезинов FI6 и C05, представлены под SEQ ID NO: 36; с транслированными закодированными последовательностями, представленными под SEQ ID NO: 37 (вариабельный домен тяжелой цепи FI6), SEQ ID NO: 38 (вариабельный домен легкой цепи FI6) и SEQ ID NO: 39 (CH2-3). Эти последовательности и их признаки включены с помощью ссылки.

В другом варианте осуществления создавали вектор, содержащий иммуноадгезины FI6 и CR8033. Последовательности из плазмиды, содержащей кассеты экспрессии иммуноадгезинов FI6 и CR8033, представлены под SEQ ID NO:40; с транслированными закодированными последовательностями, представленными под SEQ ID NO: 41 (VH FI6) и SEQ ID NO: 42 (вариабельный домен легкой цепи FI6). Эти последовательности и их признаки включены с помощью ссылки.

AAV может быть создан из челночных плазмид, экспрессирующих иммуноадгезины, описанных выше, с помощью методик, известных специалистам в данной области.

Дополнительные иллюстративные челночные плазмиды представляют собой приведенные ниже.

Последовательность плазмиды pN512_ACE F16v3kg1-1A6 MAB p3184, содержащей легкую цепь каппа зародышевой линии, гетерологичную в отношении источника обоих тяжелых цепей, 1A6 и F16v3, представлена под SEQ ID NO: 14. Транслированные закодированные последовательности представлены под SEQ ID NO: 15 (константный домен легкой цепи), SEQ ID NO: 16 (вариабельный домен тяжелой цепи FI6), SEQ ID NO: 17 (CH1) и SEQ ID NO: 18 (CH2-3).

Последовательности промежуточного вектора, который содержит иммуноглобулины с тяжелой и легкой цепью TCN032, представлены под SEQ ID NO: 30. Транслированные аминокислотные последовательности, закодированные этой плазмидой, включают тяжелую цепь TCN032 под SEQ ID NO: 31; последовательность CH1 под SEQ ID NO: 32; цепь VH FI6 под SEQ ID NO: 33; последовательность CH1 под SEQ ID NO: 34 и последовательность CH2-3 под SEQ ID NO: 35.

Последовательность плазмиды, содержащей тяжелые цепи TCN032 и FI6 и совместно экспрессирующей два антитела с этими типами специфичности, представлена под SEQ ID NO: 43. Транслированные аминокислоты вариабельного домена тяжелой цепи TCN032 представлены под SEQ ID NO: 44, CH1 представлены под SEQ ID NO: 45, шарнир-CH2'-CH3' представлены под SEQ ID NO: 46, VH FI6 представлены под SEQ ID NO: 47, CH1 представлены под SEQ ID NO: 48, CH2-3 представлены под SEQ ID NO: 49 и ген устойчивости к ампициллину представлен под SEQ ID NO: 50. Эти последовательности и их признаки включены в данный документ с помощью ссылки.

Перечень последовательностей в произвольной форме

Следующая информация предусматривает последовательности, которые содержатся в произвольной форме под цифровым кодом <223>.

SEQ ID NO: (содержатся в произвольной форме)	Произвольная форма под <223>
1	<223> Синтетическая последовательность, кодирующая тяжелую цепь FI6 <220> <221> CDS <222> (1)..(705) <223> константный домен FI6
3	<223> плазида, содержащая антитела FI6 и 1A6 <220> <221> polyA_сигнал <222> (191)..(239) <223> синтетическая\polyA <220> <221> другой_признак <222> (246)..(914) <223> комплементарная последовательность - CH'2-3 <220> <221> другой_признак <222> (915)..(1235) <223> комплементарная последовательность - CH'1 <220> <221> другой_признак <222> (1236)..(1598) <223> комплементарная последовательность - 1A6\VN <220> <221> другой_признак <222> (1599)..(1655) <223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (1734)..(2202) <223> энхансер <220> <221> другой_признак <222> (2388)..(2444) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (2445)..(2777) <223> FI6\VL <220> <221> другой_признак <222> (3183)..(3242) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3243)..(3629) <223> FI6\VN <220> <221> CDS <222> (3630)..(3950) <223> CH1 <220> <221> CDS

	<222> (3951)..(4619) <223> CH2-3 <220> <221> polyA_сигнал <222> (4626)..(4703) <223> короткая ТКрА <220> <221> другой_признак <222> (6995)..(7283) <223> COL\E1\Происхождение
8	<223> Плазмида, кодирующая моноклональные антитела FI6 и C05 <220> <221> polyA_сигнал <222> (204)..(252) <223> синтетическая\polyA <220> <221> другой_признак <222> (259)..(927) <223> комплементарная последовательность - CH'2- 3 <220> <221> другой_признак <222> (928)..(1248) <223> комплементарная последовательность - CH'1 <220> <221> другой_признак <222> (1251)..(1668) <223> комплементарная последовательность - C05\VN <220> <221> другой_признак <222> (1669)..(1719) <223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (1729)..(1979) <223> комплементарная последовательность - CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (1798)..(2266) <223> Энхансер <220> <221> другой_признак <222> (2267)..(2392) <223> CMV\mp2 <220> <221> CDS <222> (2509)..(2841) <223> FI6\VL <220> <221> CDS <222> (2842)..(3162) <223> CL <220> <221> другой_признак <222> (3247)..(3306) <223> лидерная

	<220> <221> CDS <222> (3307)..(3693) <223> FI6\VN <220> <221> CDS <222> (3694)..(4014) <223> CH1 <220> <221> CDS <222> (4015)..(4683) <223> CH2-3 <220> <221> polyA_сигнал <222> (4690)..(4767) <223> короткая ТКрА
14	<223> Плазмида, кодирующая синтетические моноклональные антитела FI6 и 1A6 <220> <221> polyA_сигнал <222> (191)..(239) <223> синтетическая\polyA <220> <221> другой_признак <222> (246)..(914) <223> комплементарная последовательность - CH'2-3 <220> <221> другой_признак <222> (915)..(1235) <223> комплементарная последовательность - CH'1 <220> <221> другой_признак <222> (1236)..(1598) <223> комплементарная последовательность - 1A6\VN <220> <221> другой_признак <222> (1599)..(1655) <223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (1665)..(1733) <223> комплементарная последовательность - CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (1732)..(2202) <223> Энхансер <220> <221> другой_признак <222> (2203)..(2328) <223> CMV\mp1 <220> <221> другой_признак <222> (2388)..(2444) <223> лидерная <220> <221> другой_признак

	<222> (2445) .. (2789) <223> KGL <220> <221> CDS <222> (2784) .. (3104) <223> CL <220> <221> другой_признак <222> (3189) .. (3248) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3249) .. (3635) <223> FI6\VN <220> <221> CDS <222> (3636) .. (3956) <223> CH1 <220> <221> CDS <222> (3957) .. (4625) <223> CH2-3 <220> <221> polyA_сигнал <222> (4632) .. (4709) <223> короткая ТКpA
19	<223> Плазмида, содержащая моноклональные антитела FI6 и CR8033 <220> <221> polyA_сигнал <222> (173) .. (221) <223> синтетическая\polyA <220> <221> другой_признак <222> (228) .. (896) <223> комплементарная последовательность - CH'2- 3 <220> <221> другой_признак <222> (897) .. (1217) <223> комплементарная последовательность - CH'1 <220> <221> другой_признак <222> (1218) .. (1604) <223> комплементарная последовательность - CR8033\VN <220> <221> другой_признак <222> (1605) .. (1655) <223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (1665) .. (1733) <223> комплементарная последовательность - CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (1734) .. (2202) <223> Энхансер

	<220> <221> другой_признак <222> (2203)..(2328) <223> CMV\mp1 <220> <221> другой_признак <222> (2445)..(2789) <223> KGL <220> <221> CDS <222> (2784)..(3104) <223> CL <220> <221> другой_признак <222> (3189)..(3248) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3249)..(3635) <223> FI6\VN <220> <221> CDS <222> (3636)..(3956) <223> CH1 <220> <221> CDS <222> (3957)..(4625) <223> CH2-3 <220> <221> другой_признак <222> (3968)..(3968) <223> A -> T <220> <221> polyA_сигнал <222> (4632)..(4709) <223> короткая ТКрА
24	<220> <223> Плазмида, содержащая моноклональные антитела FI6 и CR8033 <220> <221> polyA_сигнал <222> (191)..(239) <223> синтетическая polyA <220> <221> другой_признак <222> (246)..(914) <223> комплементарная последовательность - CH'2-3 <220> <221> другой_признак <222> (915)..(1235) <223> комплементарная последовательность - CH'1 <220> <221> другой_признак <222> (1236)..(1622) <223> комплементарная последовательность - CR8033\VN <220> <221> другой_признак <222> (1623)..(1673)

	<223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (1683)..(1751) <223> CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (1752)..(2220) <223> Энхансер <220> <221> другой_признак <222> (2221)..(2346) <223> CMV\mp1 <220> <221> другой_признак <222> (2406)..(2462) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (2463)..(2795) <223> FI6\VL <220> <221> CDS <222> (2796)..(3116) <223> CL <220> <221> другой_признак <222> (3201)..(3260) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3261)..(3647) <223> FI6\VN <220> <221> CDS <222> (3648)..(3968) <223> CH1 <220> <221> CDS <222> (3969)..(4637) <223> CH2-3 <220> <221> другой_признак <222> (3980)..(3980) <223> A -> T <220> <221> polyA_сигнал <222> (4644)..(4721) <223> короткая ТКpA
30	<223> EcoRV <220> <221> polyA_сигнал <222> (201)..(252) <223> комплементарная последовательность - синтетическая\polyA <220> <221> другой_признак <222> (268)..(588) <223> комплементарная последовательность - CL

	<220> <221> другой_признак <222> (589)..(909) <223> комплементарная последовательность - TCN032\VL <220> <221> polyA_сигнал <222> (910)..(966) <223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (1026)..(1094) <223> комплементарная последовательность - CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (1095)..(1563) <223> Энхансер <220> <221> другой_признак <222> (1564)..(1689) <223> CMV\mp1 <220> <221> другой_признак <222> (1749)..(1805) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (1806)..(2165) <223> TCN032\VN <220> <221> CDS <222> (2166)..(2459) <223> CH1 <220> <221> другой_признак <222> (2460)..(3152) <223> шарнир-CH2'-CH3' <220> <221> другой_признак <222> (3239)..(3296) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3297)..(3683) <223> FI6\VN <220> <221> CDS <222> (3684)..(4004) <223> CH1 <220> <221> CDS <222> (4005)..(4673) <223> CH2-3 <220> <221> polyA_сигнал <222> (4693)..(4770) <223> короткая ТКрА
36	<223> иммуноадгезины FI6 и CO5

	<220> <221> polyA_сигнал <222> (201)..(432) <223> комплементарная последовательность - SV40\polyA <220> <221> другой_признак <222> (453)..(1121) <223> комплементарная последовательность - CH'2- 3 <220> <221> другой_признак <222> (1125)..(1457) <223> комплементарная последовательность - C05\VL <220> <221> другой_признак <222> (1458)..(1502) <223> SL\из\3bn201co <220> <221> другой_признак <222> (1503)..(1916) <223> комплементарная последовательность - C05\VN <220> <221> другой_признак <222> (1965)..(1973) <223> лидерная <220> <221> другой_признак <222> (2371)..(2412) <223> комплементарная последовательность - CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (2413)..(2881) <223> энхансер <220> <221> другой_признак <222> (2882)..(3007) <223> CMV\mp1 <220> <221> другой_признак <222> (3067)..(3055) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3124)..(3510) <223> FI6\VN <220> <221> другой_признак <222> (3511)..(3555) <223> SL\из\3bn201co <220> <221> CDS <222> (3556)..(3888) <223> FI6\VL <220> <221> CDS <222> (3892)..(4560)
--	--

	<223> CH2-3 <220> <221> polyA_сигнал <222> (4581)..(4812) <223> SV40\polyA
40	<223> иммуноадгезины FI6 и CR8033 <220> <221> polyA_сигнал <222> (201)..(432) <223> комплементарная последовательность - SV40\polyA <220> <221> другой_признак <222> (453)..(1121) <223> комплементарная последовательность - CH'2-3 <220> <221> другой_признак <222> (1125)..(1460) <223> комплементарная последовательность - 033\VL <220> <221> другой_признак <222> (1461)..(1505) <223> SL\из\3bn20lco <220> <221> другой_признак <222> (1506)..(1886) <223> комплементарная последовательность - 033\VN <220> <221> другой_признак <222> (1935)..(1946) <223> комплементарная последовательность - лидерная <220> <221> другой_признак <222> (2341)..(2382) <223> комплементарная последовательность - CMV\mp2 <220> <221> другой_признак <222> (2383)..(2851) <223> энхансер <220> <221> другой_признак <222> (2852)..(2977) <223> CMV\mp1 <220> <221> другой_признак <222> (3073)..(3045) <223> лидерная <220> <221> CDS <222> (3094)..(3480) <223> FI6\VN <220> <221> другой_признак <222> (3481)..(3525) <223> SL\из\3bn20lco

	<220> <221> CDS <222> (3526)..(3858) <223> FI6\VL <220> <221> другой_признак <222> (3862)..(4530) <223> CH2-3 <220> <221> polyA_сигнал <222> (4551)..(4782) <223> SV40\polyA
43	<223> Плазмида, содержащая моноклональные антитела TCN032 и Fi6 <220> <221> участок_повтора <222> (14)..(143) <220> <221> polyA_сигнал <222> (204)..(252) <223> синтетическая polyA <220> <221> другой_признак <222> (261)..(267) <223> кассета со стоп-кодоном (комплементарная последовательность) <220> <221> другой_признак <222> (268)..(588) <223> константный домен легкой цепи (на комплементарной нити) <220> <221> другой_признак <222> (967)..(971) <223> последовательность Kozak (расположенная на комплементарной нити) <220> <221> другой_признак <222> (972)..(1019) <223> с-тус 5'-UTR (расположенная на комплементарной нити) <220> <221> другой_признак <222> (1026)..(1094) <223> CMV\mp2 <220> <221> энхансер <222> (1026)..(1094) <220> <221> другой_признак <222> (1564)..(1689) <220> <221> другой_признак <222> (1696)..(1743) <223> с-тус 5'-UTR <220> <221> другой_признак <222> (1744)..(1748) <223> последовательность Kozak <220>

	<221> другой_признак
	<222> (1749)..(1805)
	<223> лидерная
	<220>
	<221> CDS
	<222> (1806)..(2165)
	<223> переменный домен тяжелой цепи TCN032
	<220>
	<221> участок_повтора
	<222> (1845)..(4974)
	<223> инвертированный концевой повтор
	<220>
	<221> участок_повтора
	<222> (1845)..(4974)
	<223> инвертированный концевой повтор (расположенный на комплементарной последовательности)
	<220>
	<221> CDS
	<222> (2166)..(2459)
	<223> CH1
	<220>
	<221> другой
	<222> (2166)..(2459)
	<223> CH1
	<220>
	<221> CDS
	<222> (2460)..(3152)
	<223> шарнир-CH2'-CH3'
	<220>
	<221> другой_признак
	<222> (3153)..(3164)
	<223> сайт расщепления фурином
	<220>
	<221> другой_признак
	<222> (3165)..(3236)
	<223> линкер F2A
	<220>
	<221> другой_признак
	<222> (3239)..(3296)
	<220>
	<221> другой_признак
	<222> (3239)..(3296)
	<220>
	<221> CDS
	<222> (3297)..(3683)
	<223> FI6 VH
	<220>
	<221> CDS
	<222> (3684)..(4004)
	<223> CH1
	<220>
	<221> CDS
	<222> (4005)..(4673)
	<223> CH2-3
	<220>
	<221> другой_признак
	<222> (4674)..(4680)
	<223> кассета со стоп-кодоном
	<220>

	<221> другой_признак <222> (4674) .. (4680) <220> <221> polyA_сигнал <222> (4693) .. (4770) <223> короткая ТКрА <220> <221> точка_начала репликации <222> (5151) .. (5606) <220> <221> CDS <222> (5737) .. (6594) <223> Amp-R <220> <221> другой_признак <222> (6768) .. (.7356) <223> col\E1\происхождение
--	---

Настоящее изобретение содержит последовательности и перечень последовательностей, которые включены в данный документ с помощью ссылки. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящей заявке, и предварительная заявка на выдачу патента США № 61/992649, поданная 13 мая 2014 года, приоритет которой заявляется, включены в данный документ с помощью ссылки в полном объеме, как если каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные с помощью ссылки. Не смотря на то, что настоящее изобретение было подробно описано в качестве иллюстрации и примера с целью ясности понимания, для специалистов в данной области согласно идеям данного изобретения будет очевидно, что могут быть сделаны определенные изменения и модификации в нем без отступления от сути или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV) для экспрессии в клетке двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, причем рекомбинантный AAV имеет капсид AAV и запакованную в нем молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты, где молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты рекомбинантного AAV содержит

инвертированный 5'-концевой повтор (ITR) AAV;

первую кассету экспрессии, которая кодирует первую иммуноглобулиновую цепь, под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют ее экспрессией;

вторую кассету экспрессии, которая кодирует вторую иммуноглобулиновую цепь, линкер и третью иммуноглобулиновую цепь, под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют ее экспрессией;

3'-ITR AAV,

где кодируемые иммуноглобулиновые цепи представляют собой легкую цепь, первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, которая имеет другой тип специфичности, чем первая тяжелая цепь, и где легкая цепь и первая тяжелая цепь образуют первое моноспецифическое антитело и легкая цепь и вторая тяжелая цепь образуют второе моноспецифическое антитело.

2. Рекомбинантный AAV по п.1, где рекомбинантный AAV дополнительно экспрессирует биспецифическое антитело, содержащее каждую из кодируемых иммуноглобулиновых цепей.

3. Рекомбинантный AAV по п.1, где первая кассета экспрессии кодирует легкую цепь антитела, вторая кассета экспрессии кодирует первую тяжелую цепь антитела и вторую тяжелую цепь антитела.

4. Рекомбинантный AAV по п.1, где первая кассета экспрессии кодирует первую тяжелую цепь антитела, вторая кассета экспрессии кодирует легкую цепь антитела и вторую тяжелую цепь антитела.

5. Рекомбинантный AAV по п.1, где рекомбинантный AAV дополнительно содержит энхансер, функционирующий в двух направлениях, расположенный между первой кассетой экспрессии и второй кассетой экспрессии.

6. Рекомбинантный AAV по п.1, где линкер во второй кассете включает линкер, выбранный из IRES или F2A.

7. Рекомбинантный AAV по п.1, где регуляторные последовательности для первой кассеты экспрессии и/или второй кассеты содержат минимальный промотор.

8. Рекомбинантный AAV по п.1, где регуляторные последовательности для первой кассеты экспрессии и/или второй кассеты экспрессии содержат минимальную или синтетическую polyA-последовательность.

9. Рекомбинантный AAV по п.1, где первая кассета экспрессии дополнительно кодирует линкер между кодирующей последовательностью для первой иммуноглобулиновой цепи и кодирующей последовательностью для четвертой иммуноглобулиновой цепи.

10. Рекомбинантный AAV по п.1, где каждая из иммуноглобулиновых цепей содержит scFv.

11. Рекombинантный AAV по п.1, где вектор дополнительно содержит polyA-последовательность, которая функционирует в двух направлениях, расположенную между первой кассетой экспрессии и второй кассетой экспрессии.

12. Рекombинантный AAV по п.1, где первая кассета экспрессии содержит энхансер и минимальный промотор.

13. Рекombинантный AAV по п.1, где вторая кассета экспрессии содержит энхансер и минимальный промотор.

14. Рекombинантный аденоассоциированный вирус (AAV) для экспрессии двух функциональных моноспецифических антител и биспецифического антитела в клетке, причем рекombинантный AAV имеет капсид AAV и запакованную в нем молекулу гетерологичной нуклеиновой кислоты, где рекombинантный AAV экспрессирует первое моноклональное антитело, характеризующееся первым типом специфичности, второе моноклональное антитело, характеризующееся специфичностью, отличной от таковой первого моноклонального антитела, и биспецифичное антитело и где молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты содержит

инвертированный 5'-концевой повтор (ITR) AAV;

открытую рамку считывания (ORF) для легкой цепи иммуноглобулина,

ORF для первой тяжелой цепи иммуноглобулина,

линкер,

ORF для второй тяжелой цепи иммуноглобулина, при этом каждая из открытых рамок считывания находится под контролем регуляторных последовательностей, которые управляют экспрессией иммуноглобулиновых цепей, кодируемых ими, где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь являются различными;

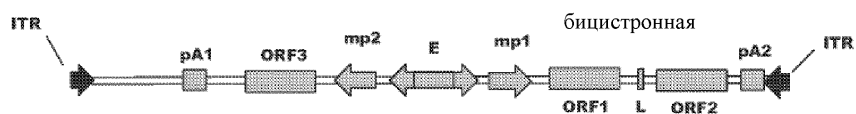
3' ITR AAV,

где легкая цепь и первая тяжелая цепь образуют первое моноклональное антитело, легкая цепь и вторая тяжелая цепь, которая имеет другой тип специфичности, чем первая тяжелая цепь, образуют второе моноклональное антитело и легкая цепь и тяжелые цепи образуют биспецифические антитела.

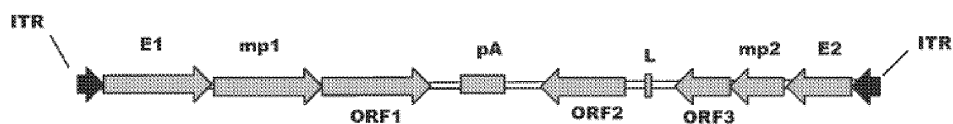
15. Фармацевтическая композиция для экспрессии двух разных функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, в клетке, содержащая рекombинантный AAV по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ доставки двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, субъекту, при этом указанный способ предусматривает введение рекombинантного AAV по любому из пп.1-14 субъекту.

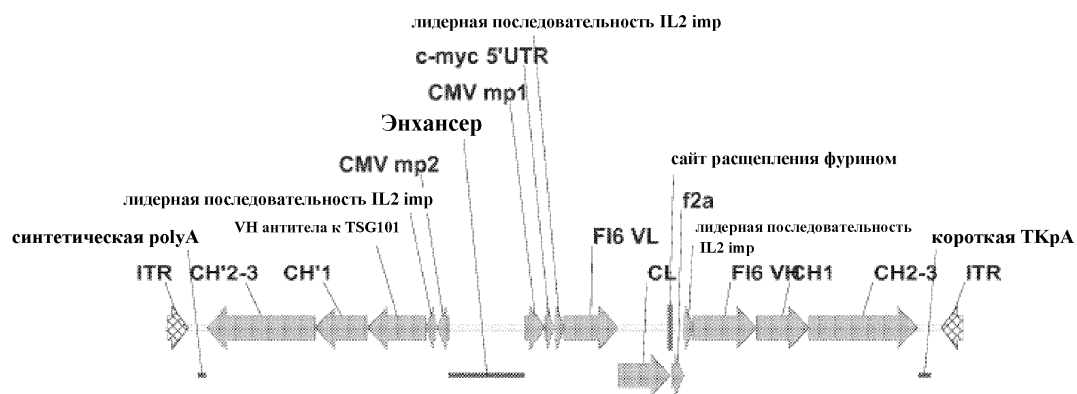
17. Композиция для доставки двух функциональных моноспецифических антител, имеющих разные типы специфичности, субъекту, содержащая два функциональных антитела, характеризующихся разными типами специфичности, где каждое из антител имеет одну и ту же легкую цепь и отличную тяжелую цепь, где легкая цепь является гетерологичной в отношении тяжелой цепи для одного или обоих моноспецифических антител и где антитела получают экспрессией рекombинантного AAV согласно любому из пп.1-14.



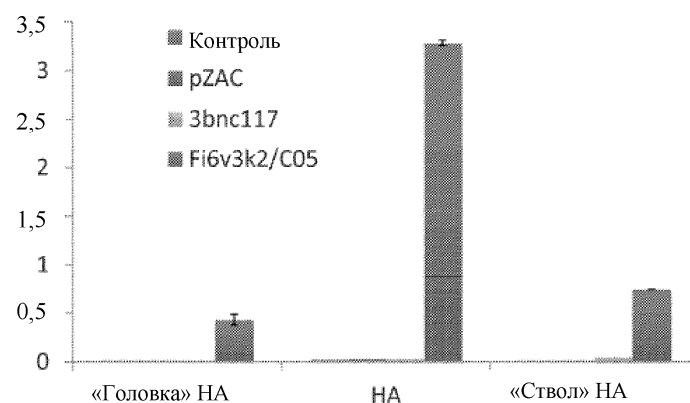
Фиг. 1А



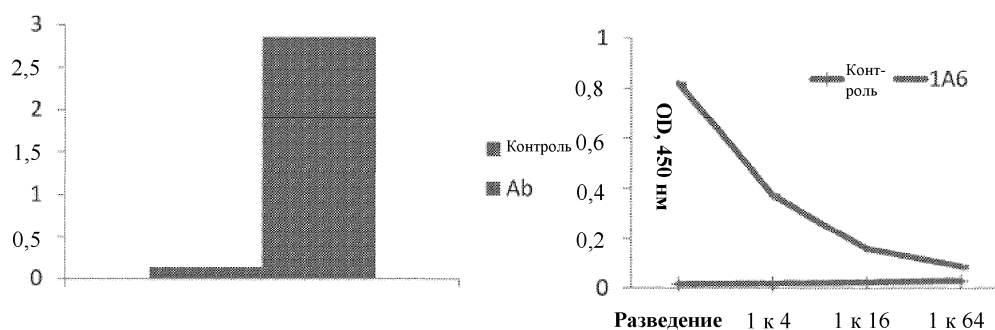
Фиг. 1В



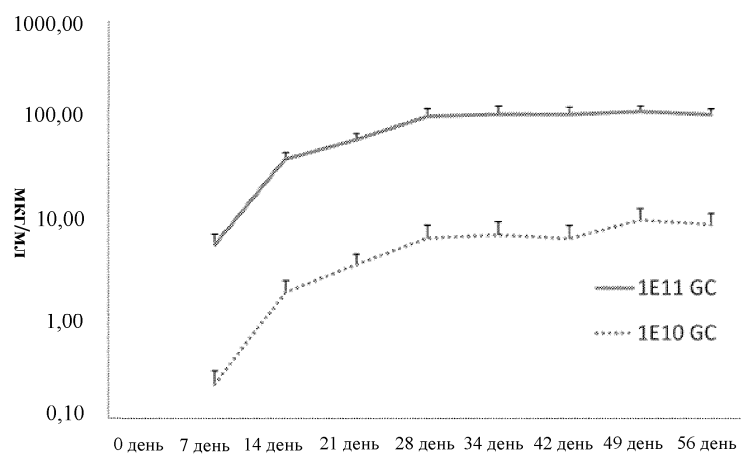
Фиг. 2



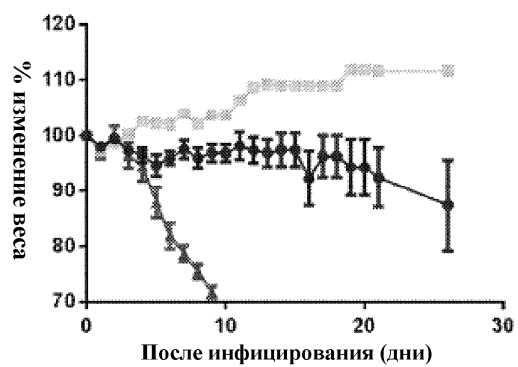
Фиг. 3



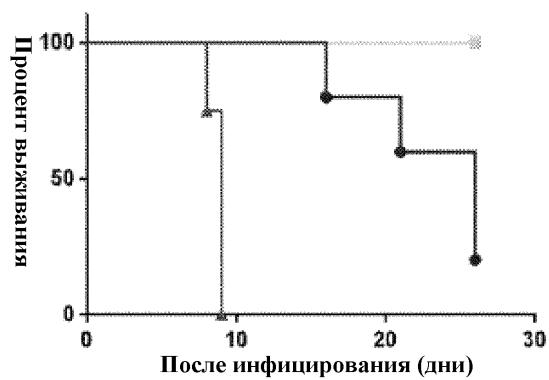
Фиг. 4А, В



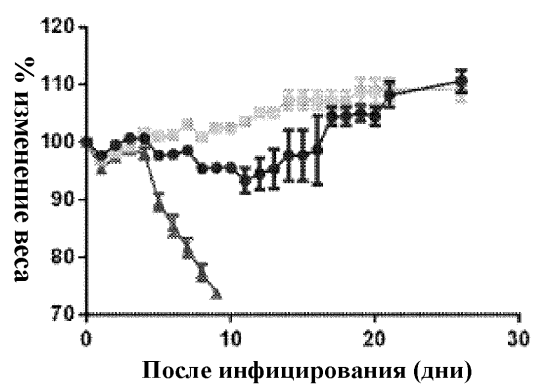
Фиг. 5



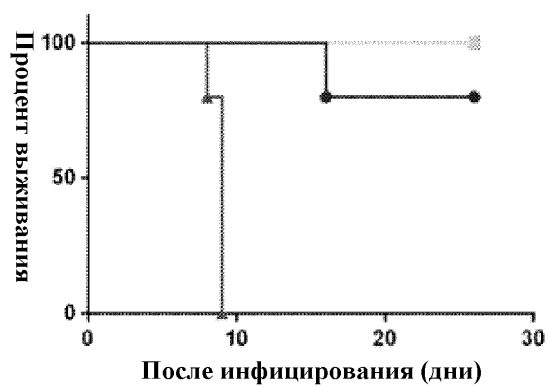
Фиг. 6А



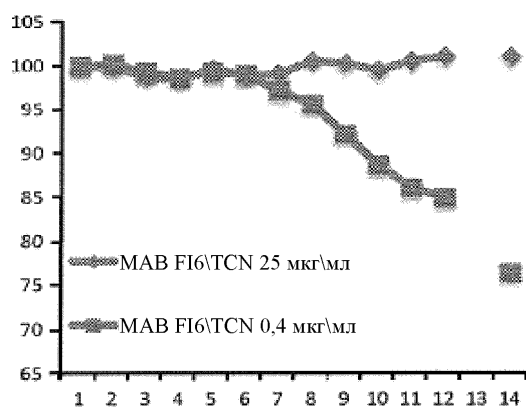
Фиг. 6В



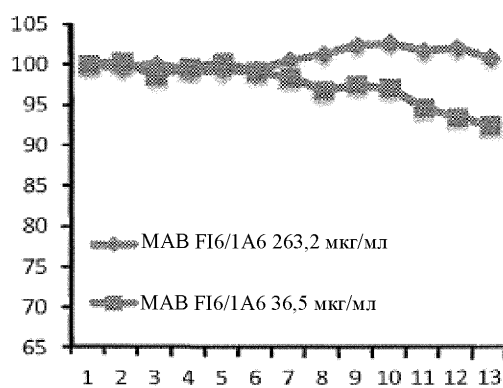
Фиг. 7А



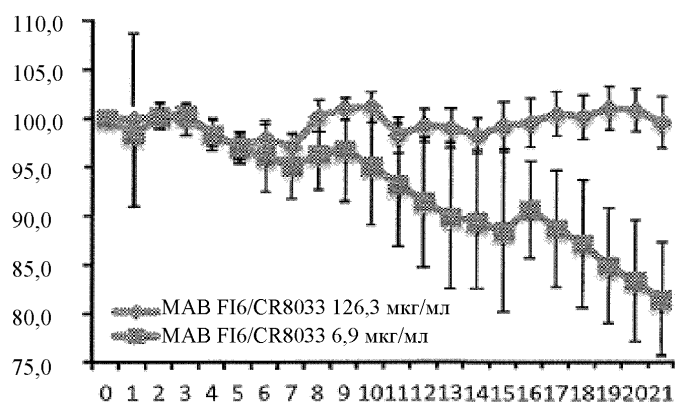
Фиг. 7В



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2