

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092934** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.04.05

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.11

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ IN VIVO**

(31) **62/683,344**

(32) **2018.06.11**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/036470**

(87) **WO 2019/241193 2019.12.19**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ УИСТАР ИНСТИТЬЮТ ОФ
ЭНЭТОМИ ЭНД БАЙОЛОДЖИ (US)**

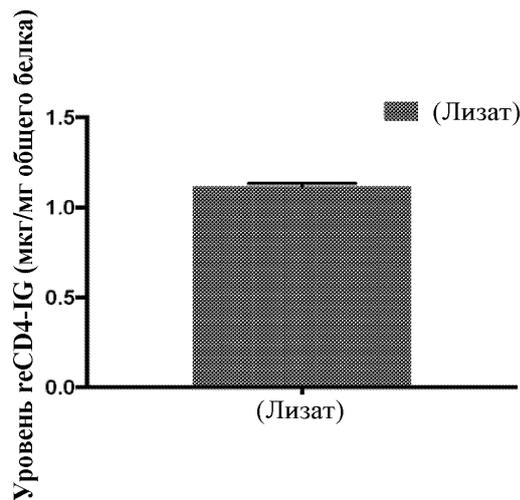
(72) Изобретатель:

**Уэйнер Дэвид, Уайз Меган, Сюй
Цзыян (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает способы посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта. В одном варианте воплощения способ включает введение субъекту композиции, содержащей первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор, при этом белок-модификатор посттрансляционно модифицирует синтетическое биологическое вещество в организме субъекта. В одном варианте воплощения посттрансляционная модификация представляет собой сульфатирование, и белок-модификатор выбран из группы, состоящей из тирозилпротеинсульфотрансферазы 1 (TPST1) и TPST2.



202092934 A1

202092934 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566265EA/085

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ *IN VIVO*

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка имеет приоритет по предварительной заявке США № 62/683 344, поданной 11 июня 2018 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Активность многих белков можно улучшить с помощью посттрансляционных модификаций. Посттрансляционная модификация (ПТМ) - это химическое изменение, которое приводит к ковалентному присоединению различных функциональных групп к белку. Эти модификации могут, в частности, нацеливать указанный белок на определенные клеточные пути, улучшать общую функцию и эффективность, изменять стабильность или период полужизни или приводить к различиям в сворачивании и других межбелковых взаимодействиях. Способность кодировать различные целевые белки была хорошо установлена с применением ДНК-плазмид. Однако необходимо дальнейшее улучшение этих белков, кодируемых ДНК. Кодирова различные ферменты, которые могут выполнять посттрансляционные модификации, целевой белок можно модифицировать и, тем самым, улучшить общий желаемый результат. Этот дополнительный этап регулирования позволяет специфически изготавливать кодируемые белки с заданными свойствами и может использоваться как для вакцины, так и для других белков, кодируемых ДНК.

В настоящее время биологические препараты (антитела, эритропоэтин, факторы свертывания крови), используемые в качестве фармацевтических препаратов, часто производятся на линиях клеток млекопитающих (СНО) и демонстрируют гетерогенность с точки зрения местоположения и распространения ПТМ, некоторые из которых могут снижать функциональность биологических препаратов (Harris, 2005). Поэтому большим преимуществом было бы иметь простой подход для облегчения доставки *in vivo* и модификации этих сложных биологических молекул с использованием передовой технологии ДНК/электропорации (ЭП).

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает способы посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта. В одном варианте воплощения способ включает введение субъекту композиции, содержащей первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор, при этом белок-модификатор посттрансляционно модифицирует синтетическое биологическое вещество в организме субъекта.

В одном варианте воплощения посттрансляционная модификация выбрана из группы, состоящей из сульфатирования, ацетилирования, N-связанного гликозилирования,

миристоилирования, пальмитоилирования, сумоилирования, гидроксилирования, метилирования, O-связанного гликозилирования, убиквитиления, окисления и пальмитоилирования.

В одном варианте воплощения посттрансляционная модификация представляет собой сульфатирование, и белок-модификатор выбран из группы, состоящей из тирозилпротеинсульфотрансферазы 1 (TPST1) и TPST2.

В одном варианте воплощения белок-модификатор представляет собой TPST2. В одном варианте воплощения TPST2 содержит лидер IgE. В одном варианте воплощения TPST2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, гомологичную, по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 6 или 8.

В одном варианте воплощения синтетический белок представляет собой антиген, антитело или иммуноадгезин. В одном варианте воплощения иммуноадгезин представляет собой eCD4-Ig. В одном варианте воплощения eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, гомологичную, по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 2 или 4.

В одном варианте воплощения посттрансляционная модификация представляет собой сульфатирование, белок-модификатор представляет собой тирозилпротеинсульфотрансферазу 1 (TPST2), а синтетический белок представляет собой eCD4-Ig, где eCD4-Ig сульфатирован в организме субъекта.

Изобретение также предлагает композицию для посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта. В одном варианте воплощения композиция содержит первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор.

В одном варианте воплощения белок-модификатор катализирует посттрансляционную модификацию (ПТМ) синтетического белка, где ПТМ выбрана из группы, состоящей из посттрансляционной модификации, выбранной из группы, состоящей из сульфатирования, ацетилирования, N-связанного гликозилирования, миристоилирования, пальмитоилирования, сумоилирования, гидроксилирования, метилирования, O-связанного гликозилирования, убиквитиления, окисления и пальмитоилирования.

В одном варианте воплощения посттрансляционная модификация представляет собой сульфатирование, и белок-модификатор выбран из группы, состоящей из тирозилпротеинсульфотрансферазы 1 (TPST1) и TPST2.

В одном варианте воплощения белок-модификатор представляет собой TPST2. В одном варианте воплощения TPST2 содержит лидер IgE. В одном варианте воплощения

TPST2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8.

В одном варианте воплощения синтетический белок представляет собой антиген, антитело или иммуноадгезин. В одном варианте иммуноадгезин представляет собой eCD4-Ig. В одном варианте воплощения eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, гомологичную, по меньшей мере на 90% SEQ ID NO: 2 или 4.

В одном варианте воплощения одна или более молекул нуклеиновой кислоты сконструированы таким образом, чтобы они находились в векторе экспрессии. В одном варианте воплощения композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном варианте воплощения изобретение предлагает способ лечения заболевания, нарушения или инфекции в организме субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте воплощения способ включает введение субъекту композиции по изобретению. В одном варианте воплощения способ включает этап электропорации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1, содержащей Фигуры с 1A по Фигуру 1F, изображены экспрессия и сульфатирование ReCD4-Ig *in vitro*. На Фигуре 1A показана экспрессия ReCD4-Ig в лизате трансфекции клеток HEK293T, нормализованная по отношению к концентрациям общего белка. На Фигуре 1B изображена экспрессия ReCD4-Ig в супернатанте трансфекции клеток HEK293T. На Фигуре 1C показан вестерн-блот супернатантов клеток HEK293T, трансфицированных либо p-ReCD4-Ig, либо pVAX (вектор плазмидного остова). На Фигуре 1D показан анализ в ELISA связывания для обнаружения сульфатирования тирозином ReCD4-Ig в супернатанте трансфекции. На Фигуре 1E показано количественное определение ReCD4-Ig в супернатантах клеток HEK293T, трансфицированных p-ReCD4-Ig и различными дозами p-IgE-TPST2. Для сравнения уровня между каждой группой с группой без ферментов использовались парные T-тесты, и в группе 1:20 IgE-TPST2 было обнаружено значительное снижение ($p < 0,05$). На Фигуре 1F изображен вестерн-блот супернатантов клеток HEK293T, трансфицированных либо только p-ReCD4-Ig, либо p-ReCD4-Ig и плазмидными ферментами 1: 1000. Нижняя панель представляет собой контроль нанесения, демонстрирующий такое же количество ReCD4-Ig в супернатанте трансфекции.

На Фигуре 2, содержащей Фигуры с 2A по Фигуру 2C, показаны экспериментальные результаты, демонстрирующие субклеточное нацеливание IgE-TPST2. На Фигуре 2A показаны результаты исследования конфокальной микроскопии для определения локализации варианта TPST2 (красный) и Golgin 97 (зеленый). Ядра окрашены DAPI (синий). IgE-TPST2 демонстрирует повышенный транспорт в TGN (сеть транс-Гольджи -

trans Golgi network) по сравнению с TPST2. На последней панели можно наблюдать диффузное цитоплазматическое распределение Δ TM-TPST2.

На Фигуре 2В показана локализация вариантов TPST2 и Golgin 97, количественно определенная с помощью анализов представляющих интерес областей (n=16). Для сравнения коэффициентов корреляции Пирсона между различными группами использовались односторонний дисперсионный анализ (F-статистика=79,67, значение $p < 0,0001$) и апостериорные попарные Т-тесты (с поправкой Холма). Указаны значения p . На Фигуре 2С представлены изображения флуоресцентной микроскопии клеток НЕК293Т, трансфицированных только плазмидой остова pGXOOOO1 или pGXOOOO1 с помощью ферментов, кодируемых плазмидой. Наложение трех каналов показывает улучшенный транспорт IgE-TPST2 в TGN по сравнению с TPST2 и Δ TM-TPST2.

Фигура 3, содержащая Фигуры с 3А по 3F, изображает экспрессию и сульфатирование ReCD4-Ig *in vivo*. На Фигуре 3А показан вестерн-блот мышечных гомогенатов через 7 дней после инъекции и продемонстрирована экспрессия IgE-TPST2 (43 кДа) в инъектированных лапах по сравнению с контралатеральными лапами. GAPDH (37 кДа) служит для контроля нанесения. На Фигуре 3В показана сывороточная экспрессия ReCD4-Ig у B6.Cg-Foxnlnu/J и balb/c с временной иммуномодуляцией путем инъекции однократной дозы ДНК. На Фигуре 3С показан анализ в ELISA связывания для определения сульфатирования тирозина ReCD4-Ig в сыворотке мышей. Мышам balb/c с временным истощением вводили p-ReCD4-Ig и различные дозы p-IgE-TPST2; для анализа собирали сыворотки через 7 дней после инъекции. OD450 каждой группы сравнивали с группами без фермента и 1: 20 IgE-TPST2 для определения минимальной дозы IgE-TPST2, необходимой для сульфатирования. На Фигуре 3D показан уровень экспрессии ReCD4-Ig в сыворотке у мышей, которые лечились p-ReCD4-Ig и различными дозами плазмидного фермента через 7 дней после инъекции. Значения p были рассчитаны с помощью парных Т-тестов: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, ***** $p < 0,00005$, ***** $p < 0,000005$. На Фигуре 3Е показан уровень экспрессии ReCD4-Ig в сыворотке в разные моменты времени у balb/c с временным истощением, обработанных p-ReCD4-Ig или p-ReCD4-Ig и дозой p-IgE-TPST2 1: 1000. Каждая линия представляет собой отдельную мышшь. На Фигуре 3F показаны сывороточные концентрации ReCD4-Ig у мышей balb/c с временным истощением через 7 дней после инъекции, которым вводили только p-ReCD4-Ig или p-ReCD4-Ig+p-TPST1/p-HS3SA. Значимое снижение ($p < 0,05$, попарные Т-тесты с поправкой Холма) уровней экспрессии наблюдалось в обеих группах по сравнению с группой, получавшей только ReCD4-Ig. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$.

Фигура 4, содержащая Фигуры с 4А по 4F, изображает функциональную характеристику опосредованного IgE-TPST2 сульфатирования ReCD4-Ig. На Фигуре 4А показаны концентрации ReCD4-Ig в сыворотке крови во время терминального кровотечения (через 7 дней после инъекции) у мышей balb/c с временным истощением, которым вводили только p-ReCD4-Ig или p-ReCD4-Ig+p-IgE-TPST2. На Фигуре 4В представлены экспериментальные результаты, демонстрирующие нейтрализацию

псевдотипированного вируса 25710 по сравнению с концентрацией ReCD4-Ig в сыворотке. Планка погрешности представляет собой стандартное отклонение. На Фигуре 4C показано сравнение IC50 ReCD4-Ig с сульфатированием или без него для вирусов с псевдотипом ВИЧ. На Фигуре 4D представлены значения IC50 (среднее \pm стандартное отклонение) для ReCD4-Ig в сыворотках мышей с обработкой IgE-TPST2 и без нее. Среднее геометрическое значение IC50 по панели (за исключением MLV) также приводится для сравнения. На Фиг. 4E и 4F представлены значения IC50 ReCD4-Ig с сульфатированием или без него в анализе нейтрализации *ex vivo*. Каждая точка представляет значение IC50, вычисленное для одной мыши, а значение *p* для каждого вируса рассчитывается с помощью попарного Т-теста с поправкой Холма для множественных сравнений. Значение *P* менее 0,05 считается значимым. На Фигуре 4E показаны значения IC50 вирусов, у которых сульфатированный ReCD4-Ig имеет значимо повышенную активность. На Фигуре 4F показаны значения IC50, при которых эффективность сульфатированного ReCD4-Ig не была значимо более высокой.

На Фигуре 5, содержащей Фигуры с 5A по Фигуру 5D, изображены экспериментальные результаты экспрессии иммуноадгезина в альтернативной модели мышей NSG SCID, которые были восстановлены при помощи иммунной системы человека путем трансплантации имплантатов тимуса плода человека и введения ряда ДНК-кодируемых цитокинов. На Фигуре 5A показана экспрессия ReCD4-Ig *in vivo* у этих гуманизированных мышей, которые получили 320 мкг ДНК-кодируемого ReCD4-Ig вместе с 0,32 мкг *p*-IgE-TPST2, что было продемонстрировано связыванием с JR-FL GP120 в ELISA с применением сыворотки, полученной в различные временные точки. На Фиг. 5B показана концентрация ReCD4-Ig в сыворотке крови каждой отдельной мыши в течение 35 дней после инъекции; пиковая экспрессия наблюдается через 14 дней после инъекции; каждая линия представляет отдельную мышь. На Фиг. 5C показана нейтрализация *ex vivo* псевдовируса уровня 1 SF162 сывороткой мышей до (синий цвет) и после (красный) обработки ДНК. Фиг. 5D изображает нейтрализацию вируса SF162 Уровня 1 и вирусов THRO и JR-FL Уровня 2 сывороткой D7 мышей в отношении титров нейтрализации IC50; каждая мышь представляет собой отдельную мышь; также в титрах показаны среднее и стандартное отклонения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение частично основано на использовании последовательностей нуклеиновых кислот для кодирования фермента для посттрансляционной модификации (ПТМ) целевого белка для непосредственной продукции *in vivo*. В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к композициям и способам посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта. В одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор.

Композиция может вводиться нуждающемуся в этом субъекту для облегчения

экспрессии, образования и посттрансляционной модификации синтетического белка *in vivo*.

В частности, синтетический белок и белок-модификатор экспрессируются из последовательностей рекомбинантной нуклеиновой кислоты, и белок-модификатор посттрансляционно модифицирует синтетический белок. Посттрансляционно модифицированный синтетический белок обладает повышенной биологической активностью по сравнению с белком, который не экспрессируется и не модифицирован таким образом, как здесь описано.

В одном варианте воплощения, в котором белок-модификатор катализирует посттрансляционную модификацию (ПТМ) синтетического белка, где ПТМ выбрана из группы, состоящей из посттрансляционной модификации, выбранной из группы, состоящей из сульфатирования, ацетилирования, N-связанного гликозилирования, включающего сиалирование и фукозилирование /дефукозилирование, миристоилирования, пальмитоилирования, сумоилирования, гидроксилирования, метилирования, O-связанного гликозилирования, убиквитилирования, окисления, амидирования и пальмитоилирования. Примеры ПТМ могут включать, без ограничений, Таблицу 1.

Таблица 1. Примеры ДНК-кодируемых ферментов, которые могут выполнять ПТМ целевого белка для улучшения функций

Целевой белок	Посттрансляционная модификация (ПТМ)	Функция	Ферменты, опосредующие ПТМ
Эритропоэтин	Терминальное сиалирование	Улучшает полупериод жизни белка и биологическую активность <i>in vivo</i> (Delorme et al., 1992)	Уридин дифосфат-N-ацетил глюкозамин 2-эпимераза)/MNK (N-ацетил маннозамин киназа с мутацией R263L-R266Q (Son et al., 2011)
Иммуноглобулины класса IgG1	N-связанные разделенные пополам олигосахариды	Улучшает антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ)	бета (1,4)-N-ацетилглюкозаминил трансфераза III (Umana et al., 1999)
Фактор свертывания крови VII, IX и X; С-белок	Глютамат гамма-карбоксилирование	Улучшает связывание с Ca ²⁺ и биологические	гамма-глутамил карбоксилаза (GGCX) и витамин К оксиредуктаза (VKOR) (Sun et al., 2005)

		функции	
Гирудин (Антикоагулянт)	Сульфатирование tyr-63	Улучшает аффинность к тромбину в 10 раз (Stone and Hofsteenge, 1986)	TPST1/TPST2 (Walsh and Jefferis, 2006)
Фактор VIII	Сульфатирование тирозина	Улучшает конверсию фактора VIII в VIIIa и связывание с носителем фактора Виллебранда (Tsang et al., 1988)	TPST1/TPST2 (Walsh and Jefferis, 2006)
Кальцитонин	С-терминальное амидирование	Усиливает взаимодействие лиганд-рецептор (Bradbury and Smyth, 1991)	Пептидилглицин альфа- амидирующая монооксигеназа (PAM) (Prigge et al., 2000)

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композиции, которую можно использовать для лечения заболевания или нарушения путем введения сконструированных синтетических белков (например, синтетического белка и белка-модификатора в форме плазмид синтетических нуклеиновых кислот).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композициям, содержащим первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический eCD4-Ig, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетическую тирозилпротеинсульфотрансферазу (TPST). В одном варианте воплощения TPST представляет собой TPST1 или TPST2. В одном варианте воплощения TPST представляет собой TPST2. В одном варианте воплощения TPST содержит лидерный IgE. Композицию можно вводить нуждающемуся в этом субъекту для облегчения экспрессии, образования и сульфатирования eCD4-Ig in vivo.

В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной

нуклеиновой кислоты, кодирующая синтетический eCD4-Ig, кодирует последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3, или ее фрагменту. В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2 или 4, или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая TPST2, кодирует последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7 или ее фрагменту. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8 или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7, или ее фрагменту. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, транскрибируемую из последовательности ДНК, описанной в данном документе. Например, в одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, транскрибируемую последовательностью ДНК, кодирующей полипептидную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7 или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% гомологию с SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует фрагмент аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8, или ее фрагменту.

Композиции, представленные в настоящем документе, также могут включать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Аспекты изобретения также включают способы лечения заболевания, нарушения или инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любой из представленных здесь композиций. В одном варианте воплощения инфекция представляет собой ВИЧ-инфекцию. Способы повышения иммунного ответа также могут включать этап электропорации.

1. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае конфликта настоящий документ, включая определения, будет иметь

преимущественную силу. Примерные способы и материалы описаны здесь, хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. Раскрытые здесь материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Термины «содержит(ат)», «включает(ют)», «имеющий», «имеет», «может», «содержащий(щие)» и их варианты, используемые здесь, предназначены для неограниченного использования в качестве переходных фраз, терминов или слов, которые не исключают возможность дополнительных действий или структур. Термины, использованные в единственном числе, подразумевают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Настоящее раскрытие также предполагает другие варианты воплощения, «содержащие», «состоящие из» и «состоящие по существу из» вариантов или элементов, представленных в данном документе, независимо от того, изложены ли они явно или нет.

«Антитело» может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их фрагменты, фрагменты или производные, включая Fab, F (ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, и их производные. Антитело может быть антителом, выделенным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, аффинно очищенным антителом или их смесями, которые проявляют достаточную специфичность связывания с желаемым эпитопом или последовательностью, полученной из него.

«Антиген» относится к белкам, которые обладают способностью вызывать иммунный ответ у хозяина. Антиген может распознаваться и связываться с антителом. Антиген может происходить из организма или из внешней среды.

«CDR» определяются как аминокислотные последовательности определяющей комплементарности области антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. См., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). В вариабельной части иммуноглобулина есть три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи (или области CDR).

Таким образом, «CDR» в контексте настоящего описания, относятся ко всем трем CDR тяжелой цепи или всем трем CDR легкой цепи (или как всем CDR тяжелой цепи, так и всем CDR легкой цепи, если это уместно). Структура и сворачивание белка антитела может означать, что другие остатки считаются частью антигенсвязывающей области, и это должно быть понятно квалифицированному специалисту. См., например Chothia et al., (1989) *Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*; *Nature* 342, p 877-883.

«Антительный фрагмент» или «фрагмент антитела», используемые здесь взаимозаменяемо, относятся к части интактного антитела, содержащей антигенсвязывающий участок или вариабельную область. Эта часть не включает константные домены тяжелой цепи (то есть CH₂, CH₃ или CH₄, в зависимости от изотипа

антитела) области Fc интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничений, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты Fab'-SH, фрагменты F (ab')₂, фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатела, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи, и одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменной области тяжелой цепи.

«Адьювант» в контексте настоящего описания означает любую молекулу, добавляемую к описанной здесь вакцине для повышения иммуногенности антигена.

«Кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота» в контексте настоящего описания может относиться к нуклеиновой кислоте (молекуле РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, как изложено в настоящем документе. Кодирующая последовательность также может содержать последовательность ДНК, которая кодирует последовательность РНК. Кодирующая последовательность может дополнительно включать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивидуума или млекопитающего, которым вводят нуклеиновую кислоту. Кодирующая последовательность может дополнительно включать последовательности, кодирующие сигнальные пептиды.

«Комплемент» или «комплементарный» в контексте настоящего описания может означать, что нуклеиновая кислота может иметь пары оснований Уотсона-Крика (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстина между нуклеотидами или аналогами нуклеотидов молекул нуклеиновых кислот.

«Консенсус» или «консенсусная последовательность» в контексте настоящего описания означает полипептидную последовательность, основанную на анализе выравнивания множественных последовательностей множественных подтипов конкретного антигена. Могут быть получены последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусную полипептидную последовательность. Вакцины или иммунологические композиции, содержащие белки, которые содержат консенсусные последовательности и/или молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют такие белки, могут быть использованы для индукции широкого иммунитета против нескольких подтипов или серотипов конкретного антигена.

«Постоянный ток», используемый здесь для определения тока, который принимается или испытывается тканью или клетками, определяющими указанную ткань, в течение продолжительности электрического импульса, доставляемого к той же ткани. Электрический импульс доставляется описанными здесь устройствами электропорации. Этот ток остается постоянным в указанной ткани в течение всего срока действия электрического импульса, поскольку устройство электропорации, представленное в настоящем документе, имеет элемент обратной связи, предпочтительно имеющий

мгновенную обратную связь. Элемент обратной связи может измерять сопротивление ткани (или клеток) на протяжении всего импульса и заставлять устройство электропорации изменять выходную электрическую энергию (например, повышать напряжение), чтобы ток в одной и той же ткани оставался постоянным на протяжении всего электрического импульса (порядка микросекунд) и от импульса к импульсу. В некоторых вариантах воплощения элемент обратной связи содержит контроллер.

Используемые здесь термины «обратная связь по току» или «обратная связь» могут использоваться взаимозаменяемо и могут означать активный ответ предоставленных устройств электропорации, который включает измерение тока в ткани между электродами и изменение выходной энергии, поставляемой устройством ЭП, таким образом, чтобы поддерживать ток на постоянном уровне. Этот постоянный уровень задается пользователем перед запуском последовательности импульсов или электрической обработки. Обратная связь может осуществляться компонентом электропорации, например контроллером устройства электропорации, поскольку электрическая цепь в нем может непрерывно отслеживать ток в ткани между электродами и сравнивать этот контролируемый ток (или ток в ткани) с заданным током и непрерывно выполнять регулировку выходной энергии для поддержания контролируемого тока на заданном уровне. Контур обратной связи может быть мгновенным, поскольку это аналоговая замкнутая система с обратной связью.

«Децентрализованный ток», используемый в данном документе, может означать структуру электрических токов, доставляемых из различных матриц игольчатых электродов устройств электропорации, описанных в данном документе, причем эти характеристики минимизируют или предпочтительно устраняют возникновение теплового стресса, связанного с электропорацией, на любой области ткани, подвергающейся электропорации.

«Электропорация», «электропермеабилитация» или «электрокинетическое усиление» («ЭУ»), используемые здесь взаимозаменяемо, могут относиться к использованию импульса трансмембранного электрического поля для создания микроскопических путей (пор) в биомембране; их присутствие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные средства, ионы и вода, переходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

«Эндогенное антитело» в контексте настоящего описания может относиться к антителу, которое вырабатывается в организме субъекта, которому вводят эффективную дозу антигена для индукции гуморального иммунного ответа.

«Механизм обратной связи», используемый здесь, может относиться к процессу, выполняемому программным или аппаратным обеспечением (или микропрограммным обеспечением), который принимает и сравнивает импеданс желаемой ткани (до, во время и/или после подачи импульса энергии) с текущим значением, предпочтительным током, и регулирует импульс подаваемой энергии для достижения заданного значения. Механизм обратной связи может выполняться аналоговой схемой замкнутого контура.

«Фрагмент» или «иммуногенный фрагмент», как используется в данном документе,

представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность. В одном варианте воплощения фрагмент представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует фрагмент белка, такого как антитело или антиген. Фрагмент может быть фрагментом белка, антитела или антигена, который сохраняет свою биологическую активность. «Фрагмент» или «иммуногенный фрагмент» также может означать фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты. Фрагменты могут быть фрагментами ДНК различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют фрагменты белка. Фрагменты могут быть фрагментами ДНК последовательностей ДНК, имеющими гомологию, по меньшей мере, с одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют фрагменты белка, указанные ниже. Фрагмент белка или нуклеиновой кислоты может быть на 100% идентичным полной длине, за исключением отсутствия, по меньшей мере, одной аминокислоты/нуклеиновой кислоты на N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином на конце или без них в положении 1. Фрагменты могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретного полноразмерного белка или нуклеиновой кислоты, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Фрагмент может содержать фрагмент полипептида, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичный белку или нуклеиновой кислоте и дополнительно содержит N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть связаны с фрагментом антитела.

Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты может быть на 100% идентичным полной длине, за исключением отсутствия, по меньшей мере, одного нуклеотида на 5' и/или 3' конце. Когда последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок, фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты может быть, в каждом случае, с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионином в положении 1 или без них. Фрагменты могут составлять 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретной полноразмерной кодирующей последовательности, исключая любой добавленный гетерологичный сигнальный пептид. Фрагмент может содержать фрагмент, который кодирует полипептид, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более,

98% или более или 99% или более идентичен антителу и дополнительно необязательно содержит последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывается при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, кодирующая N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть связана с фрагментом кодирующей последовательности.

«Генетическая конструкция» в контексте настоящего описания относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, такой как антитело. Генетическая конструкция может также относиться к молекуле ДНК, которая транскрибирует РНК. Кодирующая последовательность включает сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивидуума, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «экспрессируемая форма» относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, кодирующей белок, таким образом, что кодирующая последовательность будет экспрессироваться, когда она присутствует в клетке индивидуума.

Термин «гомология» в контексте настоящего описания относится к степени комплементарности. Могут быть частичные гомологии или полные гомологии (т. е. идентичность). Частично комплементарная последовательность, которая, по меньшей мере, частично ингибирует полностью комплементарную последовательность от гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, упоминается с использованием функционального термина «по существу гомологичная». При использовании в отношении двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как кДНК или геномный клон, термин «по существу гомологичный», используемый здесь, относится к зонду, который может гибридизоваться с цепью двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости. При использовании в отношении одноцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты, термин «по существу гомологичный», используемый здесь, относится к зонду, который может гибридизоваться (т.е. быть комплементарным) с шаблоном одноцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости.

«Идентичный» или «идентичность», используемые здесь в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, могут означать, что последовательности имеют определенный процент остатков, которые являются одинаковыми в указанной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в указанной области, определения количества положений, в которых идентичный остаток встречается в

обеих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество позиций в указанной области и умножение результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательностей. В случаях, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание дает один или более разнесенных концов, а указанная область сравнения включает только одну последовательность, остатки одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель вычисления. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентификация может быть выполнена вручную или с использованием алгоритма компьютерной последовательности, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Используемый здесь термин «импеданс» может использоваться при обсуждении механизма обратной связи и может быть преобразован в значение тока в соответствии с законом Ома, что позволяет проводить сравнения с заданным током.

Используемый здесь термин «иммунный ответ» может означать активацию иммунной системы хозяина, например, иммунной системы млекопитающего, в ответ на введение одной или более нуклеиновых кислот и/или пептидов. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа, либо обоих.

«Нуклеиновая кислота», или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид» в контексте настоящего описания может означать, по меньшей мере, два нуклеотида, ковалентно связанных вместе. Изображение одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь изображенной одиночной цепи. Для достижения той же цели, что и данная нуклеиновая кислота могут использоваться многие варианты нуклеиновой кислоты. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает практически идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементы. Одна цепь обеспечивает зонд, который может гибридизоваться с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает зонд, который гибридизируется в жестких условиях гибридизации.

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

Используемый здесь термин «функционально связанный» может означать, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может располагаться на 5' (выше) или 3' (ниже) гена, находящегося под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между этим промотором и контролируемым им геном в гене, от которого происходит промотор. Как известно в данной области техники, изменение этого расстояния

может быть выполнено без потери функции промотора.

Термин «пептид», «белок» или «полипептид» в контексте настоящего описания может означать связанную последовательность аминокислот и может быть природным, синтетическим, модификацией или комбинацией природных и синтетических.

«Промотор» в контексте настоящего описания может означать синтетическую молекулу или молекулу природного происхождения, которая способна сообщать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических регуляторных последовательностей транскрипции для дальнейшего усиления экспрессии и/или изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии того же. Промотор может также содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут располагаться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Промотор может происходить из источников, включая вирусные, бактериальные, грибковые, растения, насекомые и животные. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференцированно по отношению к клетке, ткани или органу, в котором происходит экспрессия или в отношении стадии развития, на которой происходит экспрессия или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типичные примеры промоторов включают промотор T7 бактериофага, промотор T3 бактериофага, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV 40 и промотор CMV IE.

«Сигнальный пептид» и «лидерная последовательность» используются здесь взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть связана на amino-конце белка, указанного в данном документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности обычно определяют локализацию белка. Используемые здесь сигнальные пептиды/лидерные последовательности могут способствовать секреции белка из клетки, в которой он продуцируется. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остатка белка, часто называемого зрелым белком, при секреции из клетки. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности связаны на N-конце белка.

«Жесткие условия гибридизации» в контексте настоящего описания могут означать условия, при которых последовательность первой нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизоваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в сложной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут различными в разных обстоятельствах. Жесткие условия могут быть выбраны таким образом, чтобы они были приблизительно на 5-10°C ниже, чем температура плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенном pH ионной силы. T_m может быть температурой (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% зондов, комплементарных мишени,

гибридизируются с последовательностью-мишенью в равновесии (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке, при T_m 50% зондов находятся в состоянии равновесия). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,0 М иона натрия, например, концентрация приблизительно 0,01-1,0 М иона натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и температура составляет, по меньшей мере, приблизительно 30°C для коротких зондов (например, приблизительно 10-50 нуклеотидов) и, по меньшей мере, приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более приблизительно 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал может быть, по меньшей мере, в 2-10 раз больше фоновой гибридизации. Примеры жестких условий гибридизации включают следующее: 50% формамид, 5x SSC и 1% SDS, инкубирование при 42°C или 5x SSC, 1% SDS, инкубирование при 65°C, с промыванием в 0,2x SSC и 0,1% SDS при 65°C.

«Субъект» и «пациент» в контексте настоящего описания взаимозаменяемо относятся к любому позвоночному, включая, без ограничений, млекопитающее (например, корову, свинью, верблюда, ламу, лошадь, козу, кролика, овцу, хомяков, морскую свинку, кошку, собаку, крысу и мышь, примата, не являющегося человеком (например, обезьяна, такая как яванский макак или макака-резус, шимпанзе и т.д.) и человека). В некоторых вариантах воплощения субъект может быть человеком или не человеком. Субъект или пациент могут получать другие формы лечения.

Используемый здесь термин «по существу комплементарный» может означать, что первая последовательность составляет, по меньшей мере, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87. %, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности по отношению ко второй последовательности в области 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот или что две последовательности гибридизируются в жестких условиях гибридизации.

Используемый здесь термин «по существу идентичный» может означать, что первая и вторая последовательности составляют, по меньшей мере, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности в области 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов или аминокислот или в отношении нуклеиновых кислот, если первая последовательность по существу комплементарна комплементу второй последовательности.

«Синтетическое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, которое кодируется последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, и генерируется в организме субъекта.

«Синтетическое биологическое вещество» в контексте настоящего описания

относится к белку, который кодируется последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, и генерируется в организме субъекта или последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которую вводят субъекту.

«Лечение» или «процесс лечения» в контексте настоящего описания может означать защиту субъекта от заболевания посредством предотвращения, подавления, сдерживания или полного устранения заболевания. Профилактика заболевания включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Сдерживание заболевания включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту после клинических проявлений заболевания.

«Вариант», используемый здесь в отношении нуклеиновой кислоты, может означать (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент указанной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) нуклеиновую кислоту, которая по существу идентична указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизируется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементом или последовательностями, по существу идентичными ей.

«Вариант» в отношении пептида или полипептида может указывать на то, что пептид или полипептид отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, однако сохраняет, по меньшей мере, одну биологическую активность. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична указанному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет, по меньшей мере, одну биологическую активность. Консервативная замена аминокислоты, т.е. замена аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), признается в данной области техники как обычно включающая незначительное изменение. Эти незначительные изменения можно частично идентифицировать, рассматривая индекс гидрофобности аминокислот, как это известно в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Индекс гидрофобности аминокислоты основан на учете ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидрофобности могут быть заменены и функция белка будет все еще сохранена. В одном аспекте заменены аминокислоты, имеющие индекс гидрофобности ± 2 . Для выявления замен, которые могут привести к сохранению биологической функции белков также может быть использована гидрофильность аминокислот. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитать максимальную локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезную меру, которая, согласно сообщениям, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554 101 полностью включен в

настоящий документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности, может привести к тому, что пептиды сохраняют биологическую активность, например иммуногенность, как это понятно в данной области техники. Замены могут быть выполнены аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах ± 2 по отношению одна к другой. Как индекс гидрофобности, так и значение гидрофильности аминокислот зависят от конкретной боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением, аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, должны зависеть от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, что определяется гидрофобностью, гидрофильностью, зарядом, размером и другими свойствами.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая практически идентична по всей длине полной последовательности гена или ее фрагменту. Последовательность нуклеиновой кислоты может составлять 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине генной последовательности или ее фрагмента. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая практически идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотная последовательность может составлять 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

«Вектор» в контексте настоящего описания может означать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может быть плазмидой, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или искусственной хромосомой дрожжей. Вектор может быть вектором ДНК или РНК. Вектор может быть самореплицирующимся внехромосомным вектором или вектором, который интегрируется в геном хозяина.

Для перечисления числовых диапазонов здесь явно предполагается каждое промежуточное число между ними с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона 6-9 числа 7 и 8 рассматриваются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 явно рассматриваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0. Это применяется независимо от ширины диапазона.

2. Композиции

В одном аспекте изобретение предлагает композиции для генерирования биологического препарата в организме субъекта и посттрансляционной модификации биологического препарата в организме субъекта. В одном варианте воплощения композиция содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты и вторую последовательность нуклеиновой кислоты.

В одном варианте воплощения первая нуклеиновая кислота кодирует биологическое соединение. В одном варианте воплощения последовательность первой нуклеиновой кислоты кодирует белок. В одном варианте воплощения последовательность первой

нуклеиновой кислоты кодирует синтетический антиген, синтетическое антитело или синтетический белок. В одном варианте воплощения последовательность первой нуклеиновой кислоты кодирует иммуноадгезин.

В одном варианте воплощения вторая нуклеиновая кислота кодирует белок-модификатор. В одном варианте воплощения белок-модификатор посттрансляционно модифицирует белок, кодируемый первой последовательностью нуклеиновой кислоты. В одном варианте воплощения белок-модификатор модифицирует первую последовательность нуклеиновой кислоты.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям, содержащим первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический eCD4-Ig, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетическую тирозилпротеинсульфотрансферазу (TPST). В одном варианте воплощения TPST представляет собой TPST1 или TPST2. В одном варианте воплощения TPST представляет собой TPST2. В одном воплощении TPST содержит лидерный IgE. Композицию можно вводить нуждающемуся в этом субъекту для облегчения экспрессии, образования и сульфатирования eCD4-Ig *in vivo*.

В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая синтетический eCD4-Ig, кодирует последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3 или ее фрагменту. В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2 или 4 или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3 или ее фрагменту. В одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, транскрибируемую из последовательности ДНК, описанной в данном документе. Например, в одном варианте воплощения первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, транскрибируемую последовательностью ДНК, кодирующей полипептидную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3 или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует фрагмент аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 2 или 4.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующая TPST2, кодирует последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7 или ее фрагменту. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8 или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7 или ее фрагменту. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, транскрибируемую из последовательности ДНК, описанной в данном документе. Например, в одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, транскрибируемую последовательностью ДНК, кодирующей полипептидную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7 или ее фрагменту.

В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты кодирует фрагмент аминокислотной последовательности, имеющую, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% гомологии с SEQ ID NO: 6 или 8.

Предлагаемые здесь композиции также могут включать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

3. Белок-модификатор

В настоящем документе предлагаются белки, способные посттрансляционно модифицировать белок или нуклеиновую кислоту в организме субъекта. Например, в одном варианте воплощения описанные здесь белки-модификаторы можно использовать для посттрансляционной модификации белка, необходимого для биологической активности. В одном варианте воплощения описанные здесь белки-модификаторы могут посттрансляционно модифицировать белок, причем модификация включает, без ограничений, сульфатирование, ацетилирование, N-связанное гликозилирование, включая сиалирование и фукозилирование/дефукозилирование, миристоилирование, пальмитоилирование, сумоилирование, амидирование, гидроксилирование, метилирование, O-связанное гликозилирование, убиквитиление, пирролидонкарбоновую кислоту, дезаминирование, изомеризацию, окисление, пальмитоилирование и циклизацию (Таблица 1).

Примеры ферментов сульфатирования включают

тирозилпротеинсульфотрансферазу (TPST). Примеры ферментов ацетилирования включают, без ограничений Nat A, NatB, NatC, NatD, NatE, NatF, ацетил-кофермент А, гистонацетилтрансферазу и гистондеацетилазу. Примеры ферментов дезамидирования включают, без ограничений, О-ацилтрансферазу. Примеры ферментов миристоилирования включают, без ограничений, N-миристоилтрансферазу (NMT). Примеры ферментов убиквитилирования включают, без ограничений, убиквитин-активирующие ферменты, убиквитин-конъюгированные ферменты и убиквитинлигазы. Примеры ферментов сумоилирования включают, без ограничений SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 и SUMO-4. Примеры ферментов метилирования включают, без ограничений, катехол-О-метилтрансферазу, ДНК-метилтрансферазу, гистон-метилтрансферазу, 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеинметилтрансферазу, О-метилтрансферазу, метионинсинтазу и белок корриноид, содержащий железо и серу. Примеры ферментов гидроксирования включают, без ограничений, пролил-4-гидроксилазу, пролил-3-гидроксилазу и лизил-5-гидроксилазу. Ферменты фосфорилирования включают киназы, такие как киназы MAP, киназы AGC, киназы CaM, CK1, CDK, GSK3 CLK, STE, тироксинкиназы и TKL. Примеры ферментов N-гликозилирования включают, без ограничений, Fut8, GMDS, GNT-III B4GalT1, SLC35A2, ST6Gal1 и MGAT3.

В одном варианте воплощения белок-модификатор может быть модифицирован для транспорта в секреторный компартмент клеток. В одном варианте воплощения белок-модификатор может быть модифицирован для локализации с целевым биологическим белком или нуклеиновой кислотой, подлежащей модификации *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения белок-модификатор может содержать сигнальный пептид из другого белка, такого как белок иммуноглобулина, например сигнальный пептид IgE или сигнальный пептид IgG. В одном варианте воплощения сигнальный пептид IgE содержит последовательность MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO: 11)

В одном варианте воплощения белок-модификатор может быть модифицирован для транспорта в митохондрии. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать N-концевой пептид, содержащий 10-70 аминокислот, которые образуют амфипатические спирали. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать N-концевой пептидный дилейциновый мотив (DXXLL (SEQ ID NO: 12)). В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать мотив на основе тирозина N-концевого пептида (YXXØ (SEQ ID NO: 13)).

В одном варианте воплощения белок-модификатор может быть модифицирован для транспорта в лизосому. В одном варианте воплощения белок-модификатор может включать цитоплазматический хвост трансмембранного белка. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать цитоплазматический хвост трансмембранного белка на N-конце. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать цитоплазматический хвост трансмембранного белка на C-конце.

В одном варианте воплощения белок-модификатор может быть модифицирован для транспорта в ядро. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать 5

основных положительно заряженных аминокислот. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать 5 основных положительно заряженных аминокислот на N-конце. В одном варианте воплощения белок-модификатор может содержать 5 основных положительно заряженных аминокислот на C-конце.

В одном варианте воплощения белок-модификатор представляет собой фермент сульфатирования. В одном варианте воплощения фермент сульфатирования представляет собой тирозилпротеинсульфотрансферазу (TPST). В одном варианте воплощения фермент сульфатирования представляет собой TPST1 или TPST2. В одном варианте воплощения фермент сульфатирования представляет собой TPST2.

В одном варианте воплощения TPST2 модифицируется для транспорта в секреторный компартмент клеток. В одном варианте воплощения TPST2 модифицирован для транспорта в секреторный компартмент клеток для локализации с целевым биологическим белком или нуклеиновой кислотой, подлежащей модификации *in vivo*. В одном варианте воплощения TPST2 модифицирован таким образом, чтобы содержать N-концевой пептид IgE.

В одном варианте воплощения TPST2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения TPST2 содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения TPST2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность по всей длине аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5 или 7.

Фрагменты TPST2 могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере 95% одной или более аминокислотных последовательностей TPST2. В одном варианте воплощения TPST2 содержит фрагмент TPST2. В одном варианте воплощения фрагмент TPST2 может содержать фрагмент SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения фрагмент TPST2 может составлять фрагмент белка, имеющего, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность по всей длине аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 5 или 7.

В настоящем документе также предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор, описанный в данном документе. Кодированные последовательности, кодирующие указанные здесь белки, могут быть получены с использованием рутинных способов. В настоящем документе также описаны изолированные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие белки.

В одном варианте воплощения предлагаются кодирующие последовательности

белков-модификаторов. Белок-модификатор может обладать, по меньшей мере, одной активностью посттрансляционной модификации, которая может модифицировать целевой биологический белок или нуклеиновую кислоту. Последовательности нуклеиновой кислоты могут необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, такой как, например, сигнальный пептид IgE или IgG.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать полноразмерный белок. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать полноразмерный фермент сульфатирования. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, кодирующую TPST2. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 5 или 7, ее вариант или ее фрагмент. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты может содержать SEQ ID NO: 6 или 8. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, кодирующую полноразмерный белок. Например, нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность РНК, кодирующую фермент сульфатирования. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность РНК, кодирующую TPST2. В одном варианте воплощения нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность РНК, кодирующую большее количество SEQ ID NO: 5 или 7, ее вариант, ее фрагмент или любую их комбинацию.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать фрагмент белка. Фрагменты полноразмерных белков могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% одного или более полноразмерных белков. Например, фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие eCD4-Ig, могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, изложенных в настоящем документе.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать белок, гомологичный биологическому белку. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать белок, гомологичный eCD4-Ig. Последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, кодирующую белок, гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7.

В одном варианте воплощения последовательность может содержать последовательность, которая кодирует белок, содержащий, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5 или 7. В одном варианте воплощения последовательность может содержать последовательность, имеющую, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 6 или 8.

4. Биологические препараты

В настоящем документе предлагаются биологические препараты и нуклеиновые кислоты, кодирующие биологические препараты. В одном варианте воплощения биологический препарат представляет собой белок или нуклеиновую кислоту. В одном варианте воплощения биологический препарат представляет собой нуклеиновую кислоту. В одном варианте воплощения биологический препарат представляет собой белок. В одном варианте воплощения биологический препарат представляет собой нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок. Например, в одном варианте воплощения последовательность первой нуклеиновой кислоты кодирует синтетический антиген, синтетическое антитело или синтетический белок.

В одном варианте воплощения последовательность первой нуклеиновой кислоты кодирует иммуноадгезин. Например, в одном варианте воплощения иммуноадгезин представляет собой eCD4-Ig. В одном варианте воплощения eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 или 3. В одном варианте воплощения последовательность первой нуклеиновой кислоты включает последовательность, имеющую, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2 или 4.

Фрагменты иммуноадгезина могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% одной или более аминокислотных последовательностей eCD4-Ig. В одном варианте воплощения eCD4-Ig включает фрагмент eCD4-Ig. В одном варианте воплощения фрагмент eCD4-Ig может включать фрагмент SEQ ID NO: 3. В одном варианте воплощения фрагмент eCD4-Ig может содержать фрагмент белка, имеющий, по меньшей мере, приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1 или 3.

Белки

В настоящем документе предлагаются биологические белки, способные выполнять биологическую функцию. Белки могут лечить, предотвращать и/или защищать от заболевания или инфекции у субъекта, которому вводят композицию по изобретению. В одном варианте воплощения биологический белок представляет собой антиген, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего.

В некоторых вариантах воплощения биологические белки могут содержать сигнальный пептид из другого белка, такого как белок иммуноглобулина, например сигнальный пептид IgE или сигнальный пептид IgG.

Фрагменты полноразмерных биологических белков могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% одной или более полноразмерных последовательностей.

(1) Нуклеиновые кислоты и кодирующие последовательности, кодирующие белки

В настоящем документе представлены кодирующие последовательности белков, способных выполнять биологическую функцию. Кодирующие последовательности, кодирующие указанные здесь белки, могут быть получены с использованием рутинных способов. В настоящем документе также описаны изолированные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие белки.

В одном варианте воплощения предлагаются кодирующие последовательности антигенов, способных вызывать иммунный ответ. Антиген может содержать, по меньшей мере, один антигенный эпитоп, который может быть эффективным против определенных иммуногенов, против которых может быть индуцирован иммунный ответ. Последовательности нуклеиновой кислоты могут необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, такой как, например, сигнальный пептид IgE или IgG.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать полноразмерный белок. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать полноразмерный белок иммуноадгезина. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 3, ее вариант или ее фрагмент. В одном варианте воплощения последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность РНК, кодирующую полноразмерный белок. Например, нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность РНК, кодирующую иммуноадгезин. В одном варианте воплощения нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность РНК, кодирующую eCD4-Ig. В одном варианте воплощения нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность РНК, кодирующую большее количество SEQ ID NO: 3, ее вариант, ее фрагмент или любую их комбинацию.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать фрагмент белка.

Фрагменты полноразмерных белков могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% одного или более полноразмерных белков. Например, фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие eCD4-Ig, могут содержать, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, изложенных в настоящем документе.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать белок, гомологичный биологическому белку. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать белок, гомологичный eCD4-Ig. Последовательность нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, которая кодирует белок, гомологичный SEQ ID NO: 3.

Антиген

В настоящем документе предлагаются иммуногенные композиции, способные вызывать иммунный ответ. Белки могут лечить, предотвращать и/или защищать от заболевания или инфекции у субъекта, которому вводят композицию по изобретению. В одном варианте воплощения иммуногенная композиция представляет собой антиген, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего.

В одном варианте воплощения иммуногенная композиция также может содержать антиген или его фрагмент или вариант. Антигеном может быть все, что вызывает иммунный ответ у субъекта. Антиген может быть последовательностью нуклеиновой кислоты, аминокислотной последовательностью или их комбинацией. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может также включать дополнительные последовательности, которые кодируют линкерные или маркерные последовательности, связанные с антигеном пептидной связью. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Антиген может содержаться в белке, нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, или их варианте, или их комбинации из любого числа организмов, например вируса, паразита, бактерии, гриба или млекопитающего. Антиген может быть связан с аутоиммунным заболеванием, аллергией или астмой. В других вариантах воплощения антиген может быть связан с раком, герпесом, гриппом, гепатитом В, гепатитом С, вирусом папилломы человека (HPV) или вирусом иммунодефицита человека (HIV).

(1) Вирусные антигены

Антиген может быть вирусным антигеном, или его фрагментом, или его вариантом. Вирусный антиген может происходить от вируса одного из следующих семейств: *Adenoviridae*, *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*,

Hepadnaviridae, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Polyomaviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Rhabdoviridae* или *Togaviridae*. Вирусный антиген может происходить из вирусов папилломы, например вируса папилломы человека (HPV), вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса полиомиелита, вирусов гепатита, например вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D (HDV) и вируса гепатита Е (HEV), вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-I), вируса волосатоклеточного лейкоза (HTLV-II), вируса простого герпеса 1 (HSV1; оральная герпес), вируса простого герпеса 2 (HSV2; генитальный герпес), вируса опоясывающего герпеса, (VZV; варицелла-зостер, также известный как вирус ветряной оспы), вируса Эпштейна-Барра (EBV), вируса полиомы клеток Меркеля (MCV) или вируса, вызывающего рак.

Антиген гепатита

Антиген гепатита может быть антигеном или иммуногеном вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D (HDV) и/или вируса гепатита Е (HEV). В некоторых вариантах воплощения антиген гепатита может представлять собой молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, такую как плазида(ы), которая кодирует один или более антигенов из HAV, HBV, HCV, HDV и HEV. Антиген гепатита может быть полноразмерным или иммуногенным фрагментом полноразмерных белков.

Антиген гепатита может содержать консенсусные последовательности и/или модификацию для улучшенной экспрессии. В модифицированные консенсусные последовательности могут быть включены генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности конструкций. Консенсусный антиген гепатита может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах воплощения может содержать маркер НА (гемагглютинина). Иммуногены могут быть сконструированы таким образом, чтобы вызывать более сильные и обширные клеточные иммунные ответы, чем соответствующие иммуногены с оптимизированными кодонами.

Антиген гепатита может быть антигеном HAV. Антиген гепатита может представлять собой капсидный белок HAV, неструктурный белок HAV, его фрагмент, его вариант или их комбинацию.

Антиген гепатита может быть антигеном HCV. Антигеном гепатита может быть белок нуклеокапсида HCV (т.е. коровый белок), белок оболочки HCV (например, E1 и E2), неструктурный белок HCV (например, NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, и NS5b), его фрагмент, его вариант или их комбинация.

Антиген гепатита может быть антигеном HDV. Антиген гепатита может представлять собой дельта-антиген HDV, его фрагмент или его вариант.

Антиген гепатита может быть антигеном HEV. Антиген гепатита может быть

капсидным белком HEV, его фрагментом или его вариантом.

Антиген гепатита может быть антигеном HBV. Антиген гепатита может быть коровым белком HBV, поверхностным белком HBV, ДНК-полимеразой HBV, белком HBV, кодируемым геном X, его фрагментом, его вариантом или их комбинацией. Антиген гепатита может быть коровым белком HBV генотипа А, коровым белком HBV генотипа В, коровым белком HBV генотипа С, коровым белком HBV генотипа D, коровым белком HBV генотипа Е, коровым белком HBV генотипа F, коровым белком HBV генотипа G, коровым белком HBV генотипа H, поверхностным белком HBV генотипа А, поверхностным белком HBV генотипа В, поверхностным белком HBV генотипа С, поверхностным белком HBV генотипа D, поверхностным белком HBV генотипа Е, поверхностным белком HBV генотипа F, поверхностным белком HBV генотипа G, поверхностным белком HBV генотипа H, его фрагментом, его вариантом или их комбинацией. Антиген гепатита может быть консенсусным коровым белком HBV или консенсусным поверхностным белком HBV.

В некоторых вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа А, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа А или консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа А.

В других вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа В, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа В или консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа В.

В еще других вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа С, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа С или консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа С.

В некоторых вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа D, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа D или консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа D.

В других вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа Е, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа Е или консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа Е.

В некоторых вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа F, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа F или консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа F.

В других вариантах воплощения антиген гепатита может представлять собой конструкцию консенсусной коровой последовательности ДНК HBV генотипа G, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью корового белка

В других вариантах воплощения антиген гепатита может быть конструкцией консенсусной поверхностной ДНК-последовательности HBV генотипа Н, лидерной последовательностью IgE, связанной с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа Н или консенсусной последовательностью поверхностного белка HBV генотипа Н.

Антиген вируса папилломы человека (HPV)

Антиген HPV может быть из типов HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 и 58, которые вызывают рак шейки матки, рак прямой кишки и/или другие виды рака. Антиген HPV может происходить от HPV 6 и 11 типов, которые вызывают остроконечные кондиломы и, как известно, вызывают рак головы и шеи.

Антигенами HPV могут быть домены E6 или E7 HPV каждого типа HPV. Например, для HPV типа 16 (HPV16) антиген HPV16 может включать антиген HPV16 E6, антиген HPV 16 E7, их фрагменты, варианты или их комбинации. Аналогичным образом, антигеном HPV может быть HPV 6 E6 и/или E7, HPV 11 E6 и/или E7, HPV 18 E6 и/или E7, HPV 31 E6 и/или E7, HPV 33 E6 и/или E7, HPV 52 E6 и/или E7, или HPV 58 E6 и/или E7, его фрагменты, варианты или их комбинации.

Антиген RSV

Антиген RSV может быть фузогеном RSV человека (также называемым здесь «F RSV», «F-белок RSV» и «F-белок») или его фрагментом или вариантом. Фузоген RSV человека может быть консервативным у подтипов А и В RSV. Антиген RSV может быть белком F RSV или его фрагментом или вариантом, штамма RSV Long (GenBank AAX23994.1). Антиген RSV может быть белком F RSV штамма RSV A2 (GenBank AAB59858.1) или его фрагментом, или их вариантом. Антиген RSV может быть мономером, димером или тримером белка F RSV или его фрагментом или их вариантом. Антиген RSV может быть оптимизированной аминокислотной последовательностью F RSV или ее фрагментом или их вариантом.

Пост-фузионная форма F RSV вызывает более высокие титры нейтрализующих антител у иммунизированных животных и защищает животных от заражения RSV. Настоящее изобретение использует этот иммунный ответ в заявленных вакцинах. Согласно изобретению белок F RSV может быть в пре-фузионной форме или в пост-фузионной форме.

Антиген RSV также может быть гликопротеином прикрепления RSV человека (также называемым в данном документе «G RSV», «G-белок RSV» и «G-белок») или его фрагментом или вариантом. Белок G RSV человека различен в подтипах А и В. Антигеном может быть белок G RSV или его фрагмент или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23993). Антиген RSV может представлять собой белок G RSV из изолята H5601 подтипа В RSV, изолята H1068 подтипа В RSV, изолята H5598 подтипа В RSV, изолята H1123 подтипа В RSV или его фрагмента или их варианта. Антиген RSV может быть оптимизированной аминокислотной последовательностью G RSV или ее фрагментом или их вариантом.

В других вариантах воплощения the RSV антигеном может быть неструктурный

белок 1 RSV человека («белок NS1») или его фрагмент или их вариант. Например, антиген RSV может представлять собой белок NS1 RSV или его фрагмент или их вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23987.1). Антиген RSV человека также может быть неструктурным белком 2 RSV («белок NS2») или его фрагментом или их вариантом. Например, антиген RSV может представлять собой белок NS2 RSV или его фрагмент или их вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23988.1). Антиген RSV может дополнительно представлять собой белок нуклеокапсида RSV («N») человека или его фрагмент или их вариант. Например, антиген RSV может быть белком N RSV или его фрагментом или их вариантом из штамма RSV Long (GenBank AAX23989.1). Антиген RSV может представлять собой белок фосфопротеина RSV («P») человека или его фрагмент или их вариант. Например, антиген RSV может быть белком P RSV или его фрагментом или их вариантом из штамма RSV Long (GenBank AAX23990.1). Антиген RSV также может быть белком матричного белка RSV («M») человека или его фрагментом или их вариантом. Например, антиген RSV может представлять собой белок M RSV или его фрагмент или их вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23991.1).

Во все еще других вариантах воплощения антиген RSV может быть малогидрофобным (SH) белком RSV человека или его фрагментом или их вариантом. Например, антиген RSV может представлять собой белок SH RSV или его фрагмент или их вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23992.1). Антиген RSV также может быть матричным белком 2-1 RSV человека («M2-1») или его фрагментом или их вариантом. Например, антиген RSV может быть белком M2-1 RSV или его фрагментом или их вариантом из штамма RSV Long (GenBank AAX23995.1). Антиген RSV может дополнительно представлять собой белок Matrix 2-2 («белок M2-2») RSV человека или его фрагмент или их вариант. Например, антиген RSV может быть белком M2-2 RSV или его фрагментом или их вариантом из штамма RSV Long (GenBank AAX23997.1). Например, антигеном RSV может быть белок RSV L или его фрагмент или их вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23996.1)

В дополнительных вариантах воплощения антиген RSV может иметь оптимизированную аминокислотную последовательность белка NS1, NS2, N, P, M, SH, M2-1, M2-2 или L. Антиген RSV может быть белком RSV человека или рекомбинантным антигеном, таким как любой из белков, кодируемых геномом RSV человека.

В других вариантах воплощения антиген RSV может представлять собой, без ограничений, F-белок RSV из штамма RSV Long, G-белок RSV из штамма RSV Long, оптимизированную аминокислотную последовательность G RSV, геном RSV человека из штамма RSV Long, оптимизированную аминокислотную последовательность F RSV, белок NS1 RSV из штамма RSV Long, белок NS2 RSV из штамма RSV Long, белок N RSV из штамма RSV Long, белок P RSV из штамма RSV Long, белок M RSV из штамма RSV Long, белок SH RSV из штамма RSV Long, белок M2-1 RSV из штамма RSV Long, белок M2-2 RSV из штамма RSV Long, белок L RSV из штамма RSV Long, белок G RSV из изолята RSV подтипа B H5601, белок G RSV из изолята RSV подтипа B H1068, белок G RSV из изолята

RSV подтипа В H5598, белок G RSV из изолята RSV подтипа В H1123 или его фрагмент или его вариант.

Антиген гриппа

Антигены гриппа - это антигены, способные вызывать иммунный ответ у млекопитающего против одного или более серотипов гриппа. Антиген может включать полноразмерный продукт трансляции HA0, субъединицу HA1, субъединицу HA2, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген гемагглютинаина гриппа может быть консенсусной последовательностью, полученной из нескольких штаммов гриппа А серотипа H1, консенсусной последовательностью, полученной из нескольких штаммов гриппа А серотипа H2, гибридной последовательностью, содержащей части двух различных консенсусных последовательностей, полученных из разных наборов множества штаммов гриппа А серотип H1 или консенсусной последовательностью, полученной из нескольких штаммов гриппа В. Антиген гемагглютинаина гриппа может происходить от гриппа В.

Антиген гриппа также может содержать, по меньшей мере, один антигенный эпитоп, который может быть эффективным против определенных иммуногенов гриппа, против которых может быть индуцирован иммунный ответ. Антиген может обеспечивать полный репертуар иммуногенных сайтов и эпитопов, присутствующих в интактном вирусе гриппа. Антиген может быть консенсусной последовательностью антигена гемагглютинаина, которая может быть получена из последовательностей антигена гемагглютинаина из множества штаммов вируса гриппа А одного серотипа, такого как множество штаммов вируса гриппа А серотипа H1 или серотипа H2.

Антиген может быть гибридной консенсусной последовательностью антигена гемагглютинаина, которая может быть получена путем объединения двух различных консенсусных последовательностей антигена гемагглютинаина или их частей. Каждая из двух различных консенсусных последовательностей антигена гемагглютинаина может быть получена из разного набора из множества штаммов вируса гриппа А одного серотипа, такого как множество штаммов вируса гриппа А серотипа H1. Антиген может быть консенсусной последовательностью антигена гемагглютинаина, которая может происходить из последовательностей антигена гемагглютинаина из множества штаммов вируса гриппа В.

В некоторых вариантах воплощения антиген гриппа может представлять собой антиген H1 HA, H2 HA, H3 HA, H5 HA или ВНА. Альтернативно, антиген гриппа может быть консенсусным антигеном гемагглютинаина, содержащим консенсусную аминокислотную последовательность H1 или консенсусную аминокислотную последовательность H2. Консенсусный антиген гемагглютинаина может быть синтетической гибридной консенсусной последовательностью H1, включающей части двух различных консенсусных последовательностей H1, каждая из которых происходит из другого набора последовательностей. Примером консенсусного антигена HA, который представляет собой синтетический гибридный консенсусный белок H1, является белок, содержащий аминокислотную последовательность U2. Консенсусный антиген

гемагглютинина может быть консенсусным белком гемагглютинина, полученным из последовательностей гемагглютинина из штаммов вируса гриппа В, таким как белок, содержащий консенсусную аминокислотную последовательность ВНА.

Консенсусный антиген гемагглютинина может дополнительно содержать один или более дополнительных элементов аминокислотной последовательности. Консенсусный антиген гемагглютинина может дополнительно содержать на своем N-конце лидерную аминокислотную последовательность IgE или IgG. Консенсусный антиген гемагглютинина может дополнительно содержать иммуногенный маркер, который представляет собой уникальный иммуногенный эпитоп, который может быть обнаружен легкодоступными антителами. Примером такой иммуногенного маркера является маркер НА гриппа из 9 аминокислот, который может быть связан на консенсусном C-конце гемагглютинина. В некоторых вариантах воплощения консенсусный антиген гемагглютинина может дополнительно содержать на своем N-конце лидерную аминокислотную последовательность IgE или IgG, а на своем C-конце - маркер НА.

Консенсусный антиген гемагглютинина может быть консенсусным белком гемагглютинина, который состоит из консенсусных аминокислотных последовательностей вируса гриппа или их фрагментов и вариантов. Консенсусный антиген гемагглютинина может быть консенсусным белком гемагглютинина, который включает последовательности белков, не относящихся к гриппу, и последовательности белков гриппа или их фрагменты и варианты.

Примеры консенсусного белка Н1 включают белки, которые могут состоять из консенсусной аминокислотной последовательности Н1 или белки, которые дополнительно содержат дополнительные элементы, такие как лидерная последовательность IgE или маркер НА, или как лидерную последовательности IgE, так и маркер НА.

Примеры консенсусных белков Н2 включают белки, которые могут состоять из консенсусной аминокислотной последовательности Н2 или белки, которые дополнительно содержат лидерную последовательность IgE или маркер НА, или как лидерную последовательности IgE, так и маркер НА.

Примеры гибридных консенсусных белков Н1 включают белки, которые могут состоять из консенсусной аминокислотной последовательности U2 или те, которые дополнительно содержат лидерную последовательность IgE, или метку НА, или как лидерную последовательности IgE, так и маркер НА.

Примеры гибридных консенсусных белков гемагглютинина вируса гриппа В включают белки, которые могут состоять из консенсусной аминокислотной последовательности ВНА или могут содержать лидерную последовательность IgE, или метку НА, или как лидерную последовательности IgE, так и маркер НА.

Консенсусный белок гемагглютинин может кодироваться консенсусной нуклеиновой кислотой гемагглютинина, ее вариантом или ее фрагментом. В отличие от консенсусного белка гемагглютинина, который может быть консенсусной последовательностью, полученной из множества различных последовательностей

гемагглютинина из разных штаммов и вариантов, консенсусная нуклеиновая кислота гемагглютинина относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует консенсусную последовательность белка, и используемые кодирующие последовательности могут отличаться от тех, которые используются для кодирования конкретных аминокислотных последовательностей во множестве различных последовательностей гемагглютинина, из которых происходит консенсусная последовательность белка гемагглютинина. Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты может быть оптимизирована по кодонам и/или оптимизирована по РНК. Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты гемагглютинина может содержать последовательность Козака в 5'-нетранслируемой области. Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты гемагглютинина может содержать последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют лидерную последовательность. Кодирующая последовательность N-концевой лидерной последовательности составляет 5' кодирующей последовательности гемагглютинина. N-концевой лидер может способствовать секреции. N-концевой лидер может быть лидером IgE или лидером IgG. Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты гемагглютинина может содержать последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенный маркер. Иммуногенный маркер может находиться на С-конце белка, а последовательность, кодирующая ее, составляет 3' кодирующей последовательности НА. Иммуногенный маркер обеспечивает уникальный эпитоп, для которого существуют легкодоступные антитела, так что такие антитела можно использовать в анализах для обнаружения и подтверждения экспрессии белка. Иммуногенный маркер может представлять собой Н-маркер на С-конце белка.

Антиген вируса иммунодефицита человека (HIV)

Антигены HIV могут включать модифицированные консенсусные последовательности для иммуногенов. В модифицированные консенсусные последовательности могут быть включены генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобина для повышения иммуногенности конструкций. Новые иммуногены могут быть разработаны таким образом, чтобы вызывать более сильные и обширные клеточные иммунные ответы, чем соответствующие иммуногены с оптимизированными кодонами.

В некоторых вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой конструкцию консенсусной ДНК-последовательности оболочки подтипа А, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа А или консенсусную последовательность белка оболочки подтипа А.

В других вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой конструкцию консенсусной ДНК-последовательности оболочки подтипа В, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа В или консенсусную последовательность белка оболочки подтипа В.

Во все еще других вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой конструкцию консенсусной ДНК-последовательности оболочки подтипа С, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа С или консенсусную последовательность белка оболочки подтипа С.

В дополнительных вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой конструкцию консенсусной ДНК-последовательности оболочки подтипа D, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа D или консенсусную последовательность белка оболочки подтипа D.

В некоторых вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой конструкцию консенсусной ДНК-последовательности оболочки Nef-Rev подтипа В, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка Nef-Rev подтипа В или последовательность консенсусного белка Nef-Rev подтипа В.

В других вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой консенсусную последовательность ДНК Gag конструкции последовательности ДНК подтипа А, В, С и D, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для консенсусного белка Gag подтипа А, В, С и D или консенсусную последовательность белка Gag подтипа А, В, С и D.

В еще других вариантах воплощения антиген HIV может представлять собой последовательность ДНК Pol или последовательность белка Pol. Антиген HIV может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотную последовательность Env А, Env В, Env С, Env D, В Nef-Rev, Gag или любую их комбинацию.

Антиген герпеса

В одном варианте воплощения антиген герпеса происходит из HCMV, HSV1, HSV2, CeHV1, VZV или EBV. Антигены герпеса включают иммуногенные белки, включая gB, gM, gN, gH, gL, gO, gE, gl, gK, gC, gD, UL128, UL130, UL-131A, UL-83 (pp65), будь-то из HCMV, HSV1, 25 HSV2, CeHV1, VZV или из EBV. В некоторых вариантах воплощения антигены могут представлять собой HSV1-gH, HSV1-gL, HSV1-gC, HSV1-gD, HSV2-gH, HSV2-gL, HSV2-gC, HSV2-gD, VZV-gH, VZV-gL, VZV-gM, VZV-gN, CeHV1-gH, CeHV1-gL, CeHV1-gC, CeHV1-gD, VZV-gE или VZV-gl.

(2) Паразитарные антигены

В одном варианте воплощения паразит может быть простейшим, гельминтом или эктопаразитом. Гельминт (т. е. червь) может быть плоским червем (например, трематоды и ленточные черви), колючеголовым червем или круглым червем (например, острицы). Эктопаразитами могут быть вши, блохи, клещи и микроклещи.

Паразит может быть любым паразитом, вызывающим следующие заболевания: акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидиаз, байлисаскариоз, болезнь Шагаса, клонорхоз, кохлиомию, криптоспоридиоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, слоновость, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсиоз, филяриоз, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, изоспориоз, лихорадку Катаяма, лейшманиоз, болезнь Лайма, малярию, метагонимиоз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, чесотку, шистосомоз, сонную

болезнь, стронгилоидоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез и трихоцефалез.

Паразит может быть акантамебой, анисакисом, *Ascaris lumbricoides*, оводом, *Balantidium coli*, постельным клопом, *Cestoda* (ленточный червь), клещем-тромбикулидой, *Cochliomyia hominivorax*, дизентерийной амебой, *Fasciola hepatica*, *Giardia lamblia*, анкилостомой, *Leishmania*, *Linguatula serrata*, печеночной двуусткой, *Loa loa* (глазной червь), *Paragonimus* - легочная двуустка, острицей, *Plasmodium falciparum*, шистосомой, кишечной угрицей, постельным клещем, ленточным червем, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma*, власоглавом или *Wuchereria bancrofti*.

Малярийный антиген

В одном варианте воплощения антиген может быть из паразита, вызывающего малярию. Паразит, вызывающий малярию, может быть *Plasmodium falciparum*. Антиген *Plasmodium falciparum* может включать антиген циркумспорозит (CS).

В некоторых вариантах воплощения антигеном малярии могут быть молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые кодируют один или более иммуногенов *P. falciparum* - CS; LSA1; TRAP; CelTOS и Amal. Иммуногены могут быть полноразмерными или иммуногенными фрагментами полноразмерных белков. Иммуногены содержат консенсусные последовательности и/или модификации для улучшенной экспрессии.

В других вариантах воплощения малярийный антиген может быть консенсусной последовательностью TRAP, также упоминаемой как SSP2, созданной на основе компиляции всех полноразмерных последовательностей TRAP/SSP2 *Plasmodium falciparum* в базе данных GenBank (всего 28 последовательностей). Консенсусные иммуногены TRAP (т.е. иммуноген ConTRAP) могут содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах воплощения могут содержать маркер HA.

В еще других вариантах воплощения малярийным антигеном может быть CelTOS, который также обозначается как Ag2 и является высококонсервативным антигеном *Plasmodium*. Консенсусные антигены CelTOS (т.е. иммуноген ConCelTOS) могут содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах воплощения могут содержать маркер HA.

В дополнительных вариантах воплощения малярийным антигеном может быть Amal, который является высококонсервативным антигеном *Plasmodium*. Антиген малярии также может представлять собой консенсусную последовательность Amal (т.е. иммуноген ConAmal), содержащую в некоторых случаях сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах воплощения может содержать маркер HA.

В некоторых вариантах воплощения малярийный антиген может быть консенсусным антигеном CS (т.е. консенсусный CS иммуноген), содержащим в некоторых случаях сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах воплощения может содержать маркер HA.

В других вариантах воплощения малярийный антиген может быть слитым белком, содержащим комбинацию двух или более белков PF, изложенных в настоящем документе. Например, слитые белки могут включать два или более из консенсусного CS иммуногена, иммуногена ConLSA1, иммуногена ConTRAP, иммуногена ConCelTOS и иммуногена ConAmal, связанных непосредственно рядом друг с другом или связанных со спейсером или одной или более аминокислотой между ними. В некоторых вариантах воплощения слитый белок содержит два иммуногена PF; в некоторых вариантах воплощения слитый белок содержит три иммуногена PF, в некоторых вариантах воплощения слитый белок содержит четыре иммуногена PF, а в некоторых вариантах воплощения слитый белок содержит пять иммуногенов PF. Слитые белки с двумя консенсусными иммуногенами PF могут включать: CS и LSA1; CS и TRAP; CS и CelTOS; CS и Amal; LSA1 и TRAP; LSA1 и CelTOS; LSA1 и Amal; TRAP и CelTOS; TRAP и Amal или CelTOS и Amal. Слитые белки с тремя консенсусными иммуногенами PF могут включать: CS, LSA1 и TRAP; CS, LSA1 и CelTOS; CS, LSA1 и Amal; LSA1, TRAP и CelTOS; LSA1, TRAP и Amal или TRAP, CelTOS и Amal. Слитые белки с четырьмя консенсусными иммуногенами PF могут включать: CS, LSA1, TRAP и CelTOS; CS, LSA1, TRAP и Amal; CS, LSA1, CelTOS и Amal; CS, TRAP, CelTOS и Amal или LSA1, TRAP, CelTOS и Amal. Слитые белки с пятью консенсусными иммуногенами PF могут включать CS или CS-alt, LSA1, TRAP, CelTOS и Amal.

В некоторых вариантах воплощения слитые белки содержат сигнальный пептид, связанный с N-концом. В некоторых вариантах воплощения слитые белки содержат несколько сигнальных пептидов, связанных с N-концом каждого консенсусного иммуногена PF. В некоторых вариантах воплощения между иммуногенами PF гибридного белка может быть включен спейсер. В некоторых вариантах воплощения спейсер между иммуногенами PF слитого белка может быть сайтом протеолитического расщепления. В некоторых вариантах воплощения спейсер может быть сайтом протеолитического расщепления, распознаваемым протеазой, обнаруженной в клетках, для которых предназначено введение и/или получение иммуногенной композиции. В некоторых вариантах воплощения между иммуногенами PF слитого белка может быть включен спейсер, при этом спейсер является сайтом протеолитического расщепления, распознаваемым протеазой, обнаруженной в клетках, для которых предназначено введение и/или получение иммуногенной композиции, и слитые белки содержат множественные сигнальные пептиды, связанные с N-концом каждого консенсусного иммуногена PF, так что при расщеплении сигнальный пептид каждого консенсусного иммуногена PF перемещает консенсусный иммуноген PF за пределы клетки.

(3) Бактериальные антигены

В одном варианте воплощения бактерия может принадлежать к любому из следующих типов: Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Caldiseptica, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes,

Synergistetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Thermotogae и Verrucomicrobia.

Бактерия может быть грамположительной бактерией или грамотрицательной бактерией. Бактерия может быть аэробной бактерией или анаэробной бактерией. Бактерия может быть автотрофной бактерией или гетеротрофной бактерией. Бактерия может быть мезофилом, нейтрофилом, экстремофилом, ацидофилом, алкалифилом, термофилом, психрофилом, галофилом или осмофилом.

Бактерия может быть бактерией сибирской язвы, бактерией, устойчивой к антибиотикам, бактерией, вызывающей заболевание, бактериальной пищевой отравления, инфекционной бактерией, бактерией *Salmonella*, бактерией стафилококка, бактерией стрептококка или бактерией столбняка. Бактерия может быть микобактерией, *Clostridium tetani*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, метициллин-устойчивым *Staphylococcus aureus* (MRSA) или *Clostridium difficile*. Бактерия может быть *Mycobacterium tuberculosis*.

(a) Антигены *Mycobacterium tuberculosis*

В одном варианте воплощения антиген ТБ может быть из семейства антигенов ТБ Ag85, например, Ag85A и Ag85B. Антиген ТБ может быть из семейства антигенов ТБ Esx, например, EsxA, EsxB, EsxC, EsxD, EsxE, EsxF, EsxH, EsxO, EsxQ, EsxR, EsxS, EsxT, EsxU, EsxV и EsxW. Антиген ТБ может включать факторы реактивации RpfA, RpfB и RpfD. Антигены ТБ также могут включать RV1733c, ESAT6, PPE51, RV2626c, RV2628, RV2034, RV0995, RV0990c, RV0012, RV1872c, RVO010c, RV2719c и RV3407.

В некоторых вариантах воплощения антигеном ТБ могут быть молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые кодируют один или более иммуногенов *Mycobacterium tuberculosis* из семейства Ag85 и семейства Esx. Иммуногены могут быть полноразмерными или иммуногенными фрагментами полноразмерных белков. Иммуногены могут содержать консенсусные последовательности и/или модификации для улучшения экспрессии. Консенсусные иммуногены могут содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах воплощения могут содержать маркер НА.

(4) Грибковые антигены

В одном варианте воплощения грибок может представлять собой виды *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, дрожжи *Candida* (например, *Candida albicans*), *Coccidioides*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, дерматофит, виды *Fusarium*, *Histoplasma capsocyulatum*, *Mucoromycotina*, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum* или *Cladosporium*.

(5) Опухолевый антиген

В контексте настоящего изобретения «опухолевый антиген» или «антиген гиперпролиферативного нарушения» или «антиген, связанный с гиперпролиферативным нарушением» относится к антигенам, которые являются общими для конкретных гиперпролиферативных нарушений, таких как рак. Обсуждаемые здесь антигены включены только в качестве примера. Список не является исчерпывающим, и дальнейшие примеры будут очевидны специалистам в данной области техники.

Опухолевые антигены - это белки, которые продуцируются опухолевыми клетками, которые вызывают иммунный ответ, особенно иммунные ответы, опосредованные Т-клетками. Выбор антигенсвязывающего фрагмента изобретения будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области техники и включают, например, антиген, связанный с глиомой, карциноэмбриональный антиген (CEA), Р-хорионический гонадотропин человека, альфафетопротейн (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CAIX, обратная транскриптаза теломеразы человека, RU1, RU2 (AS), кишечная карбоксилэстераза, mut hsp70-2, M-CSF, простаза, простатоспецифический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простейин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломераза, опухолевый антиген карциномы простаты-1, (PCTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофил-эластазу, ephrinB2, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В одном варианте воплощения опухолевый антиген включает один или более антигенных раковых эпитопов, связанных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить антигенами-мишенями для иммунной атаки. Эти молекулы включают, без ограничений, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназа и GP 100 при меланоме и кислая фосфатаза простаты (PAP) и простатоспецифический антиген (PSA) при раке простаты. Другие молекулы-мишени принадлежат к группе молекул, связанных с трансформацией, таких как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одна группа антигенов-мишеней - это онко-фетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме иммуноглобулин опухолеспецифического идиотипа представляет собой действительно опухолеспецифический иммуноглобулиновый антиген, уникальный для конкретной опухоли. Антигены дифференцировки В-клеток, такие как CD19, CD20 и CD37, являются другими кандидатами на роль антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме. Некоторые из этих антигенов (CEA, HER-2, CD 19, CD20, идиотипический антиген) с ограниченным успехом использовались в качестве мишеней для пассивной иммунотерапии моноклональными антителами.

Тип опухолевого антигена, упоминаемый в изобретении, также может быть опухолеспецифическим антигеном (TSA) или опухолевым антигеном (ТАА). TSA уникален для опухолевых клеток и не встречается в других клетках организма. Антиген, ассоциированный с ТАА, не является уникальным для опухолевой клетки, а вместо этого также экспрессируется в нормальной клетке в условиях, которые не могут вызвать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена в опухоли может происходить в условиях, которые позволяют иммунной системе реагировать на антиген. ТАА могут быть антигенами, которые экспрессируются на нормальных клетках во время внутриутробного развития, когда иммунная система еще не созрела и не способна реагировать, или они могут быть антигенами, которые обычно присутствуют в очень низких уровнях в нормальных клетках, но которые экспрессируются в гораздо более

высоких уровнях в опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры антигенов TSA или TAA включают следующее: Антигены дифференцировки, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические мультилинейные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутировавшие гены-супрессоры опухолей, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барр EBVA и антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV). Другие крупные антигены на белковой основе включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG- 72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43- 9F, 5T4, 791Tgp72, альфафетопротеин, бета-НСГ, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29VBCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68VP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2 связывающий белок\белок, связанный с циклофилином С, TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

Маркеры рака - это известные белки, которые присутствуют или активируются по отношению к определенным раковым клеткам. С помощью методологии создания антигенов, которые представляют собой такие маркеры для нарушения в определенной степени толерантности к собственному организму, можно создать вакцину против рака. Такие противораковые вакцины могут включать антитело CTLA4 и необязательно, для усиления иммунного ответа, одно или более антител, нацеленных на один или более дополнительных белков иммунных контрольных точек. Ниже приведены некоторые примеры опухолевых антигенов:

(а) TERT

TERT представляет собой обратную транскриптазу теломеразы, которая синтезирует маркер TTAGGG на конце теломер для предотвращения гибели клеток из-за укорочения хромосом. Гиперпролиферативные клетки с аномально высокой экспрессией TERT могут стать мишенью иммунотерапии. Недавние исследования демонстрируют, что экспрессия TERT в дендритных клетках, трансфицированных генами TERT, может индуцировать цитотоксические CD8+Т-клетки и стимулировать CD4+Т-клетки антиген-специфическим образом.

(б) антигены простаты

Ниже приведены антигены, способные вызывать у млекопитающего иммунный ответ на антиген простаты. Консенсусный антиген может содержать эпитопы, которые делают их особенно эффективными, поскольку против клеток рака простаты могут быть индуцированы иммуногены. Консенсусный антиген простаты может включать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Антигены простаты могут включать один или более из следующих: антиген PSA, антиген PSMA, антиген STEAP, антиген PSCA, антиген кислой фосфатазы простаты (PAP) и другие известные антигены опухоли предстательной железы. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам простаты, фрагменты антигенов простаты и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов простаты.

(в) WT1

Антигеном может быть ген-супрессор опухоли Вильма 1 (WT1), его фрагмент, его вариант или их комбинация. WT1 представляет собой фактор транскрипции, содержащий на N-конце богатый пролином/глутамином ДНК-связывающий домен и на C-конце четыре мотива цинковых пальцев.

WT1 играет роль в нормальном развитии мочеполовой системы и взаимодействует с многочисленными факторами, например, p53, известным супрессором опухоли, и сериновой протеазой HtrA2, которая расщепляет WT1 на нескольких участках после лечения цитотоксическим препаратом.

Мутация WT1 может привести к образованию опухоли или рака, например, опухоли Вильма или опухолей, экспрессирующих WT1. Опухоль Вильма часто формируется в одной или обеих почках перед метастазированием в другие ткани, например, без ограничений, ткань печени, ткань системы мочевыводящих путей, ткань лимфы и ткань легких. Соответственно, опухоль Вильма может считаться метастатической опухолью. Опухоль Вильма обычно возникает у детей младшего возраста (например, младше 5 лет) в виде как спорадической, так и наследственной формы. Соответственно, иммуногенная композиция может использоваться для лечения субъектов, страдающих опухолью Вильма. Иммуногенная композиция также может использоваться для лечения субъектов с раком или опухолями, которые экспрессируют WT1, для предотвращения развития таких опухолей у субъектов. Антиген WT1 может отличаться от нативного, «нормального» гена WT1 и, таким образом, обеспечивать терапию или профилактику опухоли, экспрессирующей антиген WT1. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам WT1, фрагменты антигенов WT1 и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов WT1.

(г) Антиген тирозиназа

Антиген тирозиназа (Tyr) является важной мишенью для иммуно-опосредованного клиренса путем (1) индукции гуморального иммунитета через В-клеточные ответы для выработки антител, которые блокируют продукцию хемоаттрактантного протеина-1 моноцитами (MCP-1), тем самым замедляя образование супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя рост опухоли; (2) увеличения количества цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8⁺ (CTL), для атаки и уничтожения опухолевых клеток; (3) увеличения ответов Т-хелперных клеток; (4) и увеличения воспалительных реакций посредством IFN- γ и TNF- α или всего вышеупомянутого.

Тирозиназа - это медьсодержащий фермент, который можно найти в тканях растений и животных. Тирозиназа катализирует производство меланина и других пигментов за счет

окисления фенолов, таких как тирозин. При меланоме тирозиназа может перестать регулироваться, что приводит к усилению синтеза меланина. Тирозиназа также является мишенью распознавания цитотоксических Т-клеток у субъектов, страдающих меланомой. Соответственно, тирозиназа может быть антигеном, ассоциированным с меланомой.

Антиген может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых можно индуцировать иммунные ответы против Туг. Антиген Туг может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Антиген Туг может включать консенсусный белок. Антиген Туг вызывает ответные реакции антиген-специфичных Т-клеток и антител с высоким титром как системно, так и против всех раковых и связанных с опухолью клеток. Таким образом, вакцины, содержащие консенсусный антиген Туг, обеспечивают защитный иммунный ответ против образования опухоли. Соответственно, любой пользователь может разработать иммуногенную композицию по настоящему изобретению, включающую антиген Туг с тем, чтобы обеспечить обширный иммунитет против образования опухоли, метастазирования опухолей и роста опухоли. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам Туг, фрагменты антигенов Туг и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов Туг.

(д) NY-ESO-1

NY-ESO-1 представляет собой антиген рака яичек, экспрессирующийся при различных раковых заболеваниях, где он может индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Исследования экспрессии генов показали активацию гена NY-ESO-1, STAG1B, в миксоидных и круглоклеточных липосарcomaх.

В различных вариантах воплощения антиген NY-ESO-1 включает консенсусный белок NY-ESO-1 или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую консенсусный белок NY-ESO-1. Антигены NY-ESO-1 включают последовательности, гомологичные антигенам NY-ESO-1, фрагменты антигенов NY-ESO-1 и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов NY-ESO-1.

(е) PRAME

Антиген меланомы, предпочтительно экспрессируемый в опухолях (антиген PRAME), представляет собой белок, который у человека кодируется геном PRAME. Этот ген кодирует антиген, который преимущественно экспрессируется в меланомах человека и распознается цитолитическими Т-лимфоцитами. Он не экспрессируется в нормальных тканях, кроме семенников. Ген также экспрессируется при острых лейкозах. Для этого гена наблюдали пять альтернативно сплайсированных вариантов транскриптов, кодирующих один и тот же белок. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам PRAME, фрагменты антигенов PRAME и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов PRAME.

(ж) MAGE

MAGE обозначает антиген, ассоциированный с меланомой (melanoma-associated

antigen), и, в частности, антиген, ассоциированный с меланомой 4 (MAGEA4). MAGE-A4 экспрессируется в мужских половых клетках и опухолевых клетках различных гистологических типов, таких как карциномы желудочно-кишечного тракта, пищевода и легких. MAGE-A4 связывает онкопротеин, ганкирин. Это специфическое связывание MAGE-A4 опосредуется его С-концом. Исследования показали, что экзогенный MAGE-A4 может частично ингибировать независимый от адгезии рост *in vitro* клеток, гиперэкспрессирующих ганкирин, и подавлять образование мигрировавших опухолей из этих клеток у голых мышей. Это ингибирование зависит от связывания между MAGE-A4 и ганкирином, что предполагает, что взаимодействия между ганкирином и MAGE-A4 ингибируют опосредованный ганкирином канцерогенез. Вполне вероятно, что экспрессия MAGE в опухолевой ткани является не причиной, а результатом онкогенеза, и гены MAGE принимают участие в иммунном процессе, оказывая направленное воздействие на ранние опухолевые клетки для разрушения.

Белок антигена, ассоциированного с меланомой 4 (MAGEA4) может участвовать в эмбриональном развитии и трансформации и/или прогрессии опухоли. MAGEA4 обычно экспрессируется в семенниках и плаценте. Однако MAGEA4 может экспрессироваться во многих различных типах опухолей, например, в меланоме, плоскоклеточной карциноме головы и шеи, карциноме легких и карциноме молочной железы. Соответственно, MAGEA4 может быть антигеном, связанным с множеством опухолей.

Антиген MAGEA4 может индуцировать антиген-специфические Т-клеточные ответы и/или ответы антител с высоким титром, тем самым индуцируя или вызывая иммунный ответ, который направлен или реагирует против рака или опухоли, экспрессирующей антиген. В некоторых вариантах воплощения индуцированный или вызванный иммунный ответ может быть клеточным, гуморальным или как клеточным, так и гуморальным иммунным ответом. В некоторых вариантах воплощения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию гамма-интерферона (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах воплощения индуцированный или вызванный иммунный ответ может снижать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, без ограничений, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые стимулируют антиген-специфические регуляторные Т-клетки (Tregs), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , макрофаги, связанные с опухолью, фибробласты, связанные с опухолью.

Антиген MAGEA4 может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут быть индуцированы иммунные ответы против MAGEA4. Антиген MAGEA4 может включать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген MAGEA4 может включать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может быть оптимизирована в отношении использования кодонов и

соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может иметь кодон и РНК, оптимизированные для экспрессии. В некоторых вариантах воплощения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может включать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может включать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

(з) FSHR

Рецептор фолликулостимулирующего гормона (FSHR) - это антиген, который избирательно экспрессируется у женщин в гранулезных клетках яичников (Simoni et al., *Endocr Rev.* 1997, 18:739-773) и в низких уровнях в эндотелии яичников (Vannier et al., *Biochemistry*, 1996, 35:1358-1366). Что наиболее важно, этот поверхностный антиген экспрессируется в 50-70% карцином яичников.

В различных вариантах воплощения антиген FSHR включает консенсусный белок или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую консенсусный белок. Антигены FSHR включают последовательности, гомологичные антигенам FSHR, фрагменты антигенов FSHR и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов FSHR.

(и) Антигены микроокружения опухоли

Некоторые белки сверхэкспрессируются в микроокружении опухоли, включая, помимо прочего, белок активации фибробластов (FAP), бета-рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR-P) и глипикан-1 (GPC1). FAP представляет собой мембранно-связанный фермент с активностью желатиназы и пептидазы, которая активируется в связанных с раком фибробластах более чем в 90% карцином человека. PDGFR-P представляет собой рецептор тирозинкиназы клеточной поверхности, который играет роль в регуляции многих биологических процессов, включая эмбриональное развитие, ангиогенез, пролиферацию и дифференцировку клеток. GPC1 - это протеогликан клеточной поверхности, обогащенный раковыми клетками.

Антитела

В настоящем документе предлагаются антитела, которые могут связываться с желаемым антигеном или реагировать с ним, что более подробно описано здесь. Антитело может содержать набор областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи и легкой цепи (complementarity determining region - «CDR»), соответственно расположенных между набором каркасов тяжелой цепи и легкой цепи (framework - «FR»), которые обеспечивают поддержку CDR и определяют пространственные отношения CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельных участка V-области тяжелой или легкой цепи. Эти области, исходящие от N-конца тяжелой или легкой цепи, обозначаются, соответственно, как «CDR1», «CDR2» и «CDR3». Следовательно, антигенсвязывающий сайт может включать шесть CDR, содержащих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

Антитело может лечить, предотвращать и/или защищать от заболевания или

инфекции у субъекта, которому вводят композицию по изобретению. Антитело, связывая антиген, может лечить, предотвращать и/или защищать от заболевания или инфекции у субъекта, которому вводят композицию. Антитело может способствовать выживанию при заболевании у субъекта, которому вводили композицию. В одном варианте воплощения антитело может способствовать повышенному выживанию при заболевании у субъекта с заболеванием по сравнению с ожидаемым выживанием при заболевании у субъекта, которому не вводили антитело. В различных вариантах воплощения антитело может обеспечить, по меньшей мере, приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% повышения выживания при заболевании у субъектов, которым вводили композицию сверх ожидаемого срока выживания в отсутствие композиции. В одном варианте воплощения антитело может обеспечивать повышенную защиту от заболевания у субъекта по сравнению с ожидаемой защитой субъекта, которому не вводили антитело. В различных вариантах воплощения антитело может защитить от заболевания, по меньшей мере, приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% субъектов, которым вводили композицию сверх ожидаемой защиты в отсутствие композиции.

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

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

Антитело может быть поликлональным или моноклональным антителом. Антитело может представлять собой химерное антитело, одноцепочечное антитело, антитело с созревшей аффинностью, человеческое антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Гуманизированное антитело может представлять собой антитело из нечеловеческого вида, которое связывает желаемый антиген, имеющий одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) из нечеловеческих видов и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека.

Антитело может быть биспецифическим антителом, как описано здесь более подробно. Антитело может быть бифункциональным антителом, как также более подробно описано здесь.

Как описано выше, антитело может вырабатываться в организме субъекта при введении композиции субъекту. Антитело может иметь период полужизни внутри субъекта. В некоторых вариантах воплощения антитело можно модифицировать для увеличения или сокращения периода его полужизни у субъекта. Такие модификации описаны здесь более подробно.

Антитело можно дефукозилировать, как более подробно описано здесь.

Антитело может быть модифицировано для уменьшения или предотвращения антителозависимого усиления (antibody-dependent enhancement - ADE) заболевания, связанного с антигеном, как более подробно описано в настоящем документе.

(1) Нуклеинокислотные синтетические антитела

В настоящем документе также представлены антитела из последовательностей нуклеиновых кислот для использования для получения антител. В одном варианте воплощения антитела можно продуцировать в клетках млекопитающих или для доставки в ДНК или РНК-векторах, включая бактериальные, дрожжевые, а также вирусные векторы.

В одном варианте воплощения композиция содержит последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Композиция при введении субъекту, нуждающемуся в этом, может приводить к образованию синтетического антитела в организме субъекта. Синтетическое антитело может связывать целевую молекулу (т.е. антиген), присутствующую в организме субъекта. Такое связывание может нейтрализовать антиген, блокировать распознавание антигена другой молекулой, например, белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на антиген.

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

Композиция при введении субъекту, который в этом нуждается, может привести к образованию синтетического антитела в организме субъекта быстрее, чем к выработке эндогенного антитела в организме субъекта, которому вводят антиген для индукции гуморального иммунного ответа. Композиция может приводить к образованию синтетического антитела, по меньшей мере, примерно за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней до образования эндогенного антитела в организме субъекта, которому вводили антиген для индукции гуморального иммунного ответа.

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

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть оптимизированной последовательностью нуклеиновой кислоты. Такая оптимизация может повысить или изменить иммуногенность антитела. Оптимизация также может улучшить транскрипцию и/или трансляцию. Оптимизация может включать одно или более из следующего: лидерная последовательность с низким содержанием GC для увеличения транскрипции; стабильность мРНК и оптимизация кодонов; добавление последовательности Козака (например, GCC ACC) для увеличения трансляции; добавление лидерной последовательности иммуноглобулина (Ig), кодирующей сигнальный пептид; добавление внутренней последовательности IRES и устранение, насколько это возможно, цис-действующих мотивов последовательности (т.е. внутренних ТАТА-боксов).

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид тяжелой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может также включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует сайт расщепления протеазой или пептидазой. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может также включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует участок внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES может быть вирусным IRES или эукариотическим IRES. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать одну или более лидерных последовательностей, в которых каждая лидерная последовательность кодирует сигнальный пептид. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может включать один или более промоторов, один или более интронов, одну или более областей терминации транскрипции, один или более кодонов инициации, один или более кодонов терминации или стоп-кодонов и/или один или более сигналов полиаденилирования. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может также включать одну или более линкерных или маркерных последовательностей. Маркерная последовательность может кодировать гемагглютининовый маркер (HA).

При экспрессии, например, без ограничений, в клетке, организме или млекопитающем полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут собираться в синтетическое антитело. В частности, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, так что сборка приводит к тому, что синтетическое антитело способно связывать антиген. В других вариантах воплощения полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, так что сборка приводит к тому, что синтетическое антитело является более иммуногенным по сравнению с антителом, не собранным согласно тому, как описано в данном документе. Также в других вариантах воплощения полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи

могут взаимодействовать друг с другом, так что сборка приводит к тому, что синтетическое антитело способно вызывать или индуцировать иммунный ответ против антигена.

5. Векторы

Описанная выше конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может быть помещена в один или более векторов. Один или более векторов могут содержать точку начала репликации. Один или более векторов могут представлять собой плазмиду, бактериофаг, искусственную бактериальную хромосому или искусственную хромосому дрожжей. Один или более векторов могут быть либо экстрахромосомным вектором саморепликации, либо вектором, который интегрируется в геном хозяина.

Векторы включают, без ограничений, плазмиды, векторы экспрессии, рекомбинантные вирусы, любую форму вектора рекомбинантной «голой ДНК» и т.п. «Вектор» включает нуклеиновую кислоту, которая может инфицировать, трансфицировать, временно или постоянно трансдуцировать клетку. Следует понимать, что вектор может представлять собой голую нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту в комплексе с белком или липидом. Вектор необязательно содержит вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты и/или белки, и/или мембраны (например, клеточную мембрану, липидную оболочку вируса и т.д.). Векторы включают, без ограничений, репликоны (например, репликоны РНК, бактериофаги), к которым могут быть прикреплены фрагменты ДНК и которые могут реплицироваться. Таким образом, векторы включают, без ограничений, РНК, автономную самореплицирующуюся кольцевую или линейную ДНК или РНК (например, плазмиды, вирусы и т.п., см., например, Патент США № 5217879), и включают как экспрессирующие, так и неэкспрессирующие плазмиды. В некоторых вариантах воплощения вектор включает линейную ДНК, ферментативную ДНК или синтетическую ДНК. В тех случаях, когда рекомбинантный микроорганизм или культура клеток описываются как содержащие «вектор экспрессии», это включает как внехромосомную кольцевую, так и линейную ДНК и ДНК, которая была включена в хромосому(ы) хозяина. Если вектор поддерживается клеткой-хозяином, вектор может либо стабильно реплицироваться клетками во время митоза в качестве автономной структуры, либо быть включен в геном хозяина.

Один или более векторов могут быть гетерологичной экспрессирующей конструкцией, которая обычно представляет собой плазмиду, которую используют для введения конкретного гена в клетку-мишень. Как только вектор экспрессии находится внутри клетки, полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, которые кодируются рекомбинантной конструкцией последовательности нуклеиновой кислоты, продуцируются рибосомными комплексами клеточного аппарата транскрипции и трансляции. Один или более векторов могут экспрессировать большие количества стабильной информационной РНК и, следовательно, белков.

Вектор экспрессии

Один или более векторов могут представлять собой кольцевую плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. Кольцевая плазида и линейная нуклеиновая кислота

способны управлять экспрессией конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующей клетке субъекта. Один или более векторов, содержащих конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, могут быть химерными, что означает, что, по меньшей мере, один из его компонентов является гетерологичным, по меньшей мере, по отношению к одному из других компонентов.

Плазмида

Один или более векторов могут быть плазмидой. Плазмида может быть полезной для трансфекции клеток конструкцией с рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты. Плазмида может быть полезной для введения конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты субъекту. Плазмида также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии гена в клетке, в которую вводят плазмиду.

Плазмида может также содержать ориджин репликации млекопитающего, чтобы поддерживать плазмиду вне хромосом и производить множественные копии плазмиды в клетке. Плазмида может представлять собой pVAX, pCEP4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), которая может включать ориджин репликации вируса Эпштейна-Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, которая может производить высококопийную эписомальную репликацию без интеграции. Остовом плазмиды может быть pAV0242. Плазмида может быть плазмидой аденовируса типа 5 (Ad5) с дефектной репликацией.

Плазмида может представлять собой pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA), которую можно использовать для продукции белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Плазмида также может быть

pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA), которая может быть использована для продукции белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазмида также может быть полной системой экспрессии бакуловируса MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для продукции белка в клетках насекомых. Плазмида также может представлять собой pcDNA1 или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которые можно использовать для продукции белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

РНК

В одном варианте воплощения нуклеиновая кислота - это молекула РНК. В одном варианте воплощения молекула РНК транскрибируется из последовательности ДНК, описанной здесь. Например, в некоторых вариантах воплощения молекула РНК кодируется последовательностью ДНК, по меньшей мере на 90% гомологичной последовательности ДНК, кодирующей одну из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или ее вариант или ее фрагмент. Соответственно, в одном варианте воплощения изобретение относится к молекуле РНК, кодирующей одно или более MAб или DMAб. РНК может быть плюс-цепочечной. Соответственно, в некоторых вариантах воплощения молекула РНК может транслироваться клетками без необходимости каких-либо промежуточных этапов репликации, таких как

обратная транскрипция. Молекула РНК, используемая в изобретении, может иметь 5'-кэп (например, 7-метилгуанозин). Этот кэп может усиливать трансляцию РНК *in vivo*. 5'-нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь 5'-трифосфатную группу. В кэпированной РНК он может быть связан с 7-метилгуанозином через мостик с 5'-на-5'. Молекула РНК может иметь 3' поли-А-хвост. Она также может включать последовательность узнавания поли-А-полимеразой (например, AAUAAA) около своего 3'-конца. Молекула РНК, используемая в изобретении, может быть одноцепочечной. Молекула РНК, используемая в изобретении, может содержать синтетическую РНК. В некоторых вариантах воплощения молекула РНК представляет собой молекулу голой РНК. В одном варианте воплощения молекула РНК содержится в векторе.

В одном варианте воплощения РНК имеет 5' и 3' UTR (нетранслируемые области). В одном варианте воплощения 5' UTR имеет длину от нуля до 3000 нуклеотидов. Длина 5' - и 3' -последовательностей UTR, которые должны быть добавлены в кодирующую область, может быть изменена различными способами, включая, без ограничений, конструирование праймеров для ПЦР, которые отжигаются с различными областями UTR. Используя этот подход, специалист в данной области техники может изменить длины 5' и 3' UTR, необходимые для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибируемой РНК.

5' и 3' UTR могут быть природными эндогенными 5' и 3' UTR для представляющего интерес гена. Альтернативно, последовательности UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющему интерес гено, могут быть добавлены путем включения последовательностей UTR в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющему интерес гено, может быть полезно для изменения стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3' UTR могут снижать стабильность РНК. Следовательно, 3' UTR могут быть выбраны или созданы для повышения стабильности транскрибируемой РНК на основе свойств UTR, которые хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте воплощения 5' UTR может содержать последовательность Козака эндогенного гена. В качестве альтернативы, когда 5' UTR, который не является эндогенным для представляющего интерес гена, добавляется с помощью ПЦР, как описано выше, консенсусная последовательность Козака может быть изменена путем добавления 5' UTR-последовательности. Последовательности Козака могут повысить эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, но, по-видимому, они не требуются для всех РНК для обеспечения эффективной трансляции. Потребность в последовательностях Козака для многих РНК известна в данной области техники. В других вариантах воплощения 5' UTR может происходить из РНК вируса, геном РНК которого стабилен в клетках. В других вариантах воплощения можно использовать различные аналоги нуклеотидов в 3' или 5' UTR для того, чтобы препятствовать расщеплению РНК

экзонуклеазой.

В одном варианте воплощения РНК имеет как кэп на 5'-конце, так и 3'-поли(А) хвост, которые определяют связывание рибосом, инициацию трансляции и стабильность РНК в клетке.

В одном варианте воплощения РНК представляет собой РНК, модифицированную нуклеозидами. РНК, модифицированная нуклеозидами, имеет особые преимущества перед немодифицированной РНК, включая, например, повышенную стабильность, низкую врожденную иммуногенность или ее отсутствие и повышенную трансляцию.

Кольцевой и линейный вектор

Один или более векторов могут быть одной или более кольцевыми плазмидами, которые могут трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать вне хромосом (например, автономная реплицирующаяся плазида с ориджином репликации). Вектор может быть pVAX, pcDNA3.0 или proVax или любым другим вектором экспрессии, способным экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Также в настоящем документе предлагается линейная нуклеиновая кислота или линейная экспрессионная кассета (linear expression cassette - «LEC»), которая способна эффективно доставляться субъекту посредством электропорации, и экспрессирующая полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. LEC может быть любой линейной ДНК, лишенной какого-либо фосфатного остова. LEC может не содержать каких-либо генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. LEC может не содержать других последовательностей нуклеиновых кислот, не связанных с экспрессией желаемого гена.

LEC может происходить из любой плазмиды, способной к линеаризации. Плазида может быть способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Плазида может быть pNP (Puerto Rico/34) или pM2 (New Caledonia/99). Плазида может представлять собой WL009, pVAX, pcDNA3.0 или провакс или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты.

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

Вирусные векторы

В одном варианте воплощения здесь представлены вирусные векторы, которые способны доставлять нуклеиновую кислоту по изобретению в клетку. Вектор экспрессии может быть предоставлен в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусных

векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al. (2001) и в Ausubel et al. (1997), а также в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, без ограничений, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор включает ориджин репликации, функционирующий, по меньшей мере, в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров. (См., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и Патент США № 6326193). Вирусные векторы, и, особенно, ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом встраивания генов в клетки млекопитающих, например, в клетки человека. Другие вирусные векторы могут происходить из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, Патенты США №№ 5350674 и 5585362.

Способ получения вектора

В настоящем документе предложен способ получения одного или более векторов, в которые была помещена конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. После заключительного этапа субклонирования вектор можно использовать для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном резервуаре для ферментации, используя известные в данной области техники способы.

В других вариантах воплощения после последней стадии субклонирования вектор можно использовать с одним или более устройств электропорации (ЭП). ЭП-устройства описаны здесь более подробно.

Один или более векторов могут быть составлены или произведены с использованием комбинации известных устройств и технологий, и могут быть произведены с использованием технологии производства плазмид, которая описана в Предварительной заявке на патент США под регистрационным номером 60/939792, поданной 23 мая 2007 года. В некоторых примерах описанные здесь ДНК-плазмиды могут быть составлены в концентрациях, превышающих или равных 10 мг/мл. Технологии производства также включают или содержат в себе различные устройства и протоколы, которые обычно известны обычным специалистам в данной области техники, в дополнение к описанным в Предварительной заявке на патент США под регистрационным номером 60/939792, включая описанные в Патенте США № 7238522, выданном 3 июля 2007 года. Вышеуказанная заявка и патент, соответственно, Предварительная заявка на патент США под регистрационным номером 60/939792 и Патент США № 7238522 полностью включены в настоящий документ.

6. Способ получения синтетического антитела

Настоящее изобретение также относится к способу получения синтетического антитела. Способ может включать введение композиции нуждающемуся в этом субъекту с использованием способа доставки, более подробно описанного здесь. Соответственно, синтетическое антитело генерируется в организме субъекта или генерируется *in vivo* при

введении композиции субъекту.

Способ также может включать введение композиции в одну или более клеток, и, следовательно, синтетическое антитело может быть получено или продуцировано в одной или более клетках. Способ может дополнительно включать введение композиции в одну или более тканей, например, без ограничений, кожу и мышцы, и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или продуцироваться в одной или более тканях.

7. Вспомогательные вещества и другие компоненты композиции

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой функциональные молекулы, такие как транспортные вещества, адъюванты, носители или разбавители. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может быть агентом, облегчающим трансфекцию, который может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (immune-stimulating complexes - ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные агенты, способствующие трансфекции.

Агент, способствующий трансфекции, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид. Агент, способствующий трансфекции, представляет собой поли-L-глутамат, и поли-L-глутамат может присутствовать в композиции в концентрации менее 6 мг/мл. Агент, способствующий трансфекции, может также включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, и вместе с композицией также может быть введена гиалуроновая кислота. Композиция также может включать агент, способствующий трансфекции, такой как липиды, липосомы, включая липосомы лецитина или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосом (см., например, W09324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные агенты, способствующие трансфекции. Агент, способствующий трансфекции, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид. Концентрация агента трансфекции в композиции составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может быть адъювантом в дополнение к антителам к ингибитору контрольной точки по изобретению. Дополнительный адъювант может представлять собой другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде или доставляются в виде белков в комбинации

с плазмидой, указанной в композиции выше. Адьювант может быть выбран из группы, состоящей из α -интерферона (IFN- α), β -интерферона (IFN- β), γ -интерферона, фактора роста тромбоцитов (PDGF), TNF α , TNFP, GM-CSF, эпидермального фактор роста (EGF), кожного хемокина, привлекающего Т-клетки (STACK), эпителиального хемокина, экспрессируемого тимусом (TECK), эпителиального хемокина, связанного со слизистой оболочкой (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, включая IL-15, с удаленной сигнальной последовательностью и необязательно включающим сигнальный пептид из IgE. Адьювант может представлять собой IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), TNF α , TNFP, GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, PD-1, IL-10, IL-12, IL-18 или их комбинацию.

Другие гены, которые могут быть использованы в качестве адьювантов в дополнение к антителам по изобретению, включают гены, кодирующие: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectin, P-selectin, E-selectin, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, IL-22, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор TNF, Fit, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа интерферона, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, 0 \times 40, 0 \times 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAPI, TAP2 и их функциональные фрагменты.

Композиция может дополнительно содержать агент - генетический помощник, как описано в Предварительной заявке на Патент США под регистрационным номером 021579, поданной 1 апреля 1994 года, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Композиция может содержать ДНК в количестве от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или предпочтительно от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или более предпочтительно от приблизительно 1 миллиграмма до приблизительно 2 миллиграммов. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения композиция, согласно настоящему изобретению, содержит от приблизительно 5 нанограмм до приблизительно 1000 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения композиция может содержать от приблизительно 10 нанограммов до приблизительно 800 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения композиция может содержать от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения композиция может содержать от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения композиция может содержать от

приблизительно 25 до приблизительно 250 мкг, от приблизительно 100 до приблизительно 200 мкг, от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; от приблизительно 1 миллиграмма до приблизительно 2 миллиграмм, от приблизительно 5 нанограммов до приблизительно 1000 микрограммов, от приблизительно 10 нанограммов до приблизительно 800 микрограммов, от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограммов, от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограмм, от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограммов, от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограммов ДНК.

Композиция может быть составлена в соответствии с применяемым способом введения. Фармацевтическая композиция для инъекций может быть стерильной, не содержащей пирогенов и частиц. Может использовать изотонический состав или раствор. Добавки для изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Композиция может содержать сосудосуживающий агент. Изотонические растворы могут включать физиологический раствор с фосфатным буфером. Композиция может дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизаторы могут обеспечивать стабильность композиции при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение продолжительных периодов времени и включают LGS, или поликатионы, или полианионы.

8. Способ посттрансляционной модификации *in vivo*

Настоящее изобретение также направлено на способ посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта. Посттрансляционная модификация синтетического белка в организме субъекта может быть использована для лечения и/или предотвращения заболевания в организме субъекта путем предоставления биологически активного белка. Способ может включать введение субъекту раскрытой здесь композиции. Субъект, которому вводят композицию, может иметь повышенную или усиленную активность белка по сравнению с субъектом, который получает введение без посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах воплощения активность белка может быть увеличена в от приблизительно 0,5 до приблизительно 15 раз, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 раз или от приблизительно 0,5 до приблизительно 8 раз. В качестве альтернативы, активность белка в организме субъекта, которому вводят композицию, может быть увеличена, по меньшей мере, приблизительно в 0,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 1,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,0 раза, по меньшей мере, приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 3,0 раза, по меньшей мере, приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере, приблизительно в 4,0 раза, по меньшей мере, приблизительно в 4,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 5,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 5,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 6,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 6,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 7,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 7,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 8,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 8,5

раз, по меньшей мере, приблизительно в 9,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 9,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 10,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 10,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 11,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 11,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 12,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 12,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 13,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 13,5 раз, по меньшей мере, приблизительно в 14,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 14,5 раз или, по меньшей мере, приблизительно в 15,0 раз.

Также еще в других альтернативных вариантах воплощения активность белка в организме субъекта, которому вводят композицию, может быть увеличена от приблизительно 50% до приблизительно 1500%, от приблизительно 50% до приблизительно 1000% или от приблизительно 50% до приблизительно 800%. В других вариантах воплощения активность белка в организме субъекта, которому вводят композицию, может быть увеличена, по меньшей мере, приблизительно на 50%, по меньшей мере, приблизительно на 100%, по меньшей мере, приблизительно на 150%, по меньшей мере, приблизительно на 200%, по меньшей мере, приблизительно на 250%, по меньшей мере, приблизительно на 300%, по меньшей мере, приблизительно на 350%, по меньшей мере, приблизительно на 400%, по меньшей мере, приблизительно на 450%, по меньшей мере, приблизительно на 500%, по меньшей мере, приблизительно на 550%, по меньшей мере, приблизительно на 600%, по меньшей мере, приблизительно на 650%, по меньшей мере, приблизительно на 700%, по меньшей мере, приблизительно на 750%, по меньшей мере, приблизительно на 800%, по меньшей мере, приблизительно на 850%, по меньшей мере, приблизительно на 900%, по меньшей мере, приблизительно на 950%, по меньшей мере, приблизительно на 1000%, по меньшей мере, приблизительно на 1050%, по меньшей мере, приблизительно на 1100%, по меньшей мере, приблизительно на 1150%, по меньшей мере, приблизительно на 1200%, по меньшей мере, приблизительно на 1250%, по меньшей мере, приблизительно на 1300%, по меньшей мере, приблизительно на 1350%, по меньшей мере, приблизительно на 1450% или, по меньшей мере, приблизительно на 1500%.

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

9. Способ доставки композиции

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

Млекопитающее, получающее доставку композиции, может быть человеком, приматом, приматом, не являющимся человеком, коровой, крупным рогатым скотом,

овцой, козой, антилопой, бизоном, водяным буйволом, бизоном, коровой, оленем, ежом, слоном, ламой, альпакой, мышью, крысой и курицей.

Композиция может вводиться различными путями, включая перорально, парентерально, сублингвально, трансдермально, ректально, трансмукозально, местно, через ингаляцию, через буккальное введение, внутривенно, внутримышечно, интраназально, интратекально и внутрисуставно или их комбинацией. Для ветеринарного применения композицию можно вводить в виде подходящего приемлемого состава в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринар может легко определить режим дозирования и способ введения, наиболее подходящий для конкретного животного. Композицию можно вводить с помощью традиционных шприцев, безыгольных инъекционных устройств, «пистолетов с бомбардировкой микрочастицами» или другими физическими способами, такими как электропорация («ЭП»), «гидродинамический способ» или ультразвук.

а. Электропорация

Введение композиции посредством электропорации может осуществляться с использованием устройств электропорации, которые могут быть сконфигурированы для доставки в желаемую ткань млекопитающего импульса энергии, эффективного для формирования обратимых пор в клеточных мембранах, и предпочтительно, чтобы импульс энергии был постоянным и ток аналогичный предустановленному току, введенному пользователем. Устройство электропорации может содержать компонент электропорации и электродный узел или узел ручки. Компонент электропорации может включать и содержать в себе один или более различных элементов устройств электропорации, в том числе: контроллер, генератор сигналов тока, тестер импеданса, регистратор сигналов, элемент ввода, элемент сообщения о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и выключатель. Для того, чтобы облегчить трансфекцию клеток плазмидой, электропорацию можно осуществлять с использованием устройства электропорации *in vivo*, например системы CELLECTRA EP (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA) или электропоратора Eigen (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA).

Компонент электропорации может функционировать как один из элементов устройств электропорации, а другие элементы являются отдельными элементами (или компонентами), связанными с компонентом электропорации. Компонент электропорации может функционировать как более чем один элемент устройств электропорации, которые могут сообщаться с еще другими элементами устройств электропорации, отдельными от компонента электропорации. Элементы устройств электропорации, существующие как части одного электромеханического или механического устройства, могут не ограничиваться, поскольку элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы, сообщающиеся друг с другом. Компонент электропорации может быть способным доставлять импульс энергии, который производит постоянный ток в желаемой ткани, и включает механизм обратной связи. Электродный узел может включать

в себя электродную решетку, имеющую множество электродов в пространственном расположении, при этом электродный узел принимает импульс энергии от компонента электропорации и доставляет его в нужную ткань через электроды. По меньшей мере, один из множества электродов является нейтральным во время подачи импульса энергии и измеряет импеданс в желаемой ткани и сообщает импеданс компоненту электропорации. Механизм обратной связи может принимать измеренный импеданс и регулировать импульс энергии, подаваемой компонентом электропорации, для поддержания постоянного тока.

Множество электродов могут подавать импульс энергии децентрализованно. Множество электродов может доставлять импульс энергии в децентрализованной схеме посредством управления электродами в соответствии с запрограммированной последовательностью, и запрограммированная последовательность вводится пользователем в компонент электропорации. Запрограммированная последовательность может содержать множество импульсов, доставляемых последовательно, при этом каждый импульс из множества импульсов доставляется, по меньшей мере, двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс, и при этом последующий импульс из множества импульсов доставляется посредством другого из, по меньшей мере, двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс.

Механизм обратной связи может выполняться аппаратно или программно. Механизм обратной связи может выполняться аналоговой схемой с обратной связью. Обратная связь происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но предпочтительно является обратной связью в реальном времени или мгновенно (то есть, по существу, мгновенно, как определяется доступными методами определения времени отклика). Нейтральный электрод может измерять импеданс в желаемой ткани и сообщать импеданс механизму обратной связи, а механизм обратной связи реагирует на импеданс и регулирует импульс энергии для поддержания постоянного тока в значении, аналогичном заданному току. Механизм обратной связи может поддерживать постоянный ток непрерывно и мгновенно во время подачи импульса энергии.

Примеры устройств электропорации и способов электропорации, которые могут облегчить доставку композиции по настоящему изобретению, включают те, которые описаны в Патенте США № 7245963 Draghia-Akli, et al., Публикации патента США 2005/0052630, поданной Smith, et al., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте. Другие устройства электропорации и способы электропорации, которые могут быть использованы для облегчения доставки композиции, включают те, которые находятся в совместном рассмотрении и в совместном владении Заявки на патент США, под регистрационным номером 11/874072, поданной 17 октября 2007 года, которая испрашивает приоритет согласно 35 USC 119 (e) на Предварительные заявки на патент США, под регистрационным номером 60/852149, поданную 17 октября 2006 года, и под регистрационным номером 60/978 982, поданную 10 октября 2007 года, все из которых включены в настоящий документ во всей полноте.

Патент США № 7245963 Draghia-Akli, et al. описывает модульные электродные системы и их использование для облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани тела или растения. Модульные электродные системы могут содержать множество игольчатых электродов; иглу для подкожных инъекций; электрический соединитель, который обеспечивает проводящую связь от программируемого импульсного контроллера постоянного тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может обхватить множество игольчатых электродов, которые установлены на опорной конструкции, и плотно вставить их в выбранную ткань в организме или в растении. Затем биомолекулы доставляются через иглу для подкожных инъекций в выбранную ткань. Программируемый контроллер импульсов постоянного тока активируется, и электрический импульс постоянного тока подается на множество игольчатых электродов. Приложенный электрический импульс постоянного тока способствует введению биомолекулы в клетку между множеством электродов. Полное содержание Патента США № 7245963 включено сюда посредством ссылки.

Публикация патента США 2005/0052630, поданного Smith, et al., описывает устройство электропорации, которое можно использовать для эффективного облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Устройство электропорации включает электрокинетическое устройство («ЭК устройство»), работа которого определяется программным обеспечением или периферийным устройством. ЭК устройство создает серию программируемых последовательностей импульсов постоянного тока между электродами в массиве на основании пользовательского управления и ввода параметров импульса и позволяет сохранять и собирать данные о форме кривой тока. Устройство электропорации также содержит сменный электродный диск, имеющий набор игольчатых электродов, центральный канал инъекции для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Полное содержание Публикации патента США 2005/0052630 включено сюда посредством ссылки.

Массивы электродов и способы, описанные в Патенте США № 7245963 и Публикации патента США 2005/0052630 могут быть адаптированы для глубокого проникновения не только в ткани, такие как мышцы, но также и в другие ткани или органы. Из-за конфигурации массива электродов инъекционная игла (для доставки выбранной биомолекулы) также полностью вставляется в орган-мишень, и инъекция вводится перпендикулярно целевой ткани в области, которая предварительно обозначена электродами. Электроды, описанные в Патенте США № 7245963 и Публикации патента США 2005/005263, предпочтительно имеют длину 20 мм и калибр 21.

Кроме того, предполагается, что в некоторых вариантах воплощения, которые включают устройства электропорации и их использование, существуют устройства электропорации, которые описаны в следующих патентах: Патент США 5273525, выданный 28 декабря 1993 года, Патенты США 6110161, выданный 29 августа 2000 года, 6261281, выданный 17 июля 2001 года и 6958060, выданный 25 октября 2005 года, и Патент США 6939862, выданный 6 сентября 2005 года. Кроме того, здесь рассматриваются

патенты, охватывающие предмет, представленный в Патенте США 6697669, выданном 24 февраля 2004 года, который касается доставки ДНК с использованием любого из множества устройств, и Патенте США 7328064, выданном 5 февраля 2008 года, в отношении способа инъекции ДНК. Вышеупомянутые патенты включены посредством ссылки во всей полноте.

10. Способ лечения

В настоящем документе также предоставляется способ лечения, защиты и/или предотвращения заболевания, нарушения или инфекции у субъекта, который в этом нуждается, путем введения одной или более композиций, описанных в данном документе. В одном варианте воплощения способы включают введение одной или более синтетических белковых конструкций, так что синтетический белок генерируется в организме субъекта. В одном варианте воплощения способы включают введение одной или более генетических конструкций и белков, так что секретируемые белки или синтетические антигены будут распознаваться иммунной системой как чужеродные, что вызовет иммунный ответ, который может включать антитела, выработанные против одного или более антигенов. В одном варианте воплощения способы включают введение одной или более конструкций DMAb. В одном варианте воплощения способы включают введение одной или более конструкций белка-модификатора.

В одном варианте воплощения введение нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок, и нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-модификатор, обеспечивает биологически активный, посттрансляционно модифицированный синтетический белок. Способ может включать введение композиции субъекту. Введение композиции субъекту можно осуществлять с использованием способа доставки, который описан выше.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения, защиты от и/или предотвращения заболевания или нарушения, при котором синтетический белок лечит заболевание или нарушение. В некоторых вариантах воплощения изобретение обеспечивает способ лечения, защиты и/или предотвращения от инфекции вирусом ВИЧ. В одном варианте воплощения способ лечит, защищает от и/или предотвращает заболевание, связанное с ВИЧ. В одном варианте воплощения способ лечения или профилактики ВИЧ включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок eCD4-Ig, и нуклеиновой кислоты, кодирующей TPST2, как описано в другом месте в настоящем документе.

После образования синтетического белка и белка-модификатора в организме субъекта антитело-модификатор может посттрансляционно модифицировать синтетический белок. Такая модификация может активировать ферментативную, связывающую или антигенпредставляющую активность синтетического белка, тем самым вылечивая, защищая и/или предотвращая заболевание в организме субъекта.

Доза композиции может составлять от 1 мкг до 10 мг активного компонента/кг веса тела/время и может составлять от 20 мкг до 10 мг компонента/кг веса тела/время. Композицию можно вводить каждый 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 день. Количество доз композиции для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Композиция может содержать 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более или 10 или более нуклеиновых кислот, кодирующих белки. Композиция может содержать 1 или более, 2 или более, 3 или более, 4 или более, 5 или более, 6 или более, 7 или более, 8 или более, 9 или более или 10 или более нуклеиновых кислот, кодирующих белки-модификаторы.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок, и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-модификатор, можно вводить одновременно или в разное время. В одном варианте воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок, и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-модификатор, вводят одновременно. В одном варианте воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок, вводят до нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-модификатор. В одном варианте воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-модификатор, вводят перед нуклеиновой кислотой, кодирующей синтетический белок.

В определенных вариантах воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок, вводят через 1 или более дней, 2 или более дней, 3 или более дней, 4 или более дней, 5 или более дней, 6 или более дней, 7 или более дней, 8 или более дней, 9 или более дней, 10 или более дней, 11 или более дней, 12 или более дней, 13 или более дней или 14 или более дней после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-модификатор. В определенных вариантах воплощения нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок, вводится через 1 или более недель, 2 или более недель, 3 или более недель, 4 или более недель, 5 или более недель, 6 или более недель, 7 или более недель, 8 или более недель, 9 или более недель или 10 или более недель после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-модификатор. В определенных вариантах воплощения нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок, вводится через 1 или более месяцев, 2 или более месяцев, 3 или более месяцев, 4 или более месяцев, 5 или более месяцев, 6 или более месяцев, 7 или более месяцев, 8 или более месяцев, 9 или более месяцев, 10 или более месяцев, 11 или более месяцев или 12 или более месяцев после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-модификатор.

В определенных вариантах воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-модификатор, вводят через 1 или более дней, 2 или более дней, 3 или более дней, 4 или более дней, 5 или более дней, 6 или более дней, 7 или более дней, 8 или более дней, 9 или более дней, 10 или более дней, 11 или более дней, 12 или более дней, 13 или более дней или 14 или более дней после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок. В определенных вариантах воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-модификатор, вводят через 1 или более недель, 2 или более недель, 3 или более недель, 4 или более недель, 5 или более недель, 6 или более недель, 7 или более недель, 8 или более недель, 9 или более недель или 10 или более недель после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок. В определенных вариантах воплощения нуклеиновая

кислота, кодирующая белок-модификатор, вводится через 1 или более месяцев, 2 или более месяцев, 3 или более месяцев, 4 или более месяцев, 5 или более месяцев, 6 или более месяцев, 7 или более месяцев, 8 или более месяцев, 9. или более месяцев, 10 или более месяцев, 11 или более месяцев или 12 или более месяцев после введения нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок.

В определенных вариантах нуклеиновая кислота, кодирующая белок-модификатор, и нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок, вводятся однократно. В определенных вариантах воплощения нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-модификатор, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок, вводят более одного раза. В определенных вариантах воплощения введение нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-модификатор, и нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок, обеспечивает немедленные, стойкие и системные иммунные ответы.

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

11. Примеры

Пример 1: ДОСТАВКА СИНТЕТИЧЕСКОЙ ДНК ПУТЕМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ ОБЕСПЕЧИВАЕТ УСТОЙЧИВОЕ СУЛЬФАТИРОВАНИЕ *IN VIVO* ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИ-ВИЧ ИММУНОАДГЕЗИНА ECD4-IG

Трансфекция клеток НЕК293Т обеспечивает возможность экспрессии и секреции ReCD4-Ig *in vitro*

Был разработан трансген, кодирующий ReCD4-Ig с N-концевой каппа-лидерной последовательностью IgG, который затем синтезировали *de novo* и клонировали в плазмиду с остовом pGXOOO01. Нуклеотидная последовательность трансгена была оптимизирована для смещения кодонов как у мыши, так и у человека, а также для структуры и стабильности транскрипта мРНК (Graf et al., 2004; Patel et al., 2017). N-концевая лидерная последовательность IgG включена для облегчения направленного воздействия трансгена на эндоплазматический ретикулум и будет способствовать секреции (Naryadi et al., 2015). Устойчивая экспрессия ReCD4-Ig наблюдалась в клеточных лизатах и супернатанте (Фигура 1A-B). Вестерн-блот супернатанта трансфекции с антителами против человеческого IgG подтверждает секрецию ReCD4-Ig трансфицированными клетками (Фигура 1C).

Ко-трансфекция клеток НЕК293Т при помощи ДНК-кодируемых вариантов ReCD4-Ig и TPST2 обеспечивает сульфатирование ReCD4-Ig *in vitro*

Сульфатирование тирозина - это специфическая посттрансляционная модификация, катализируемая уникальным набором ферментов специфических тирозилпротеинсульфотрансфераз (TPST). У человека существуют две разные изоформы TPST (TPST1 и TPST2). Хотя их функция до конца не изучена, эти ферменты участвуют в

нескольких изменениях важных биологических активаций белка, включая изменение периода полужизни белка, процессинг белка и изменение белок-белковых взаимодействий. Важно отметить, что сульфатирование CCR5 играет важную роль в связывании ВИЧ и модификации входа на поверхность клетки. Для того, чтобы определить, можно ли вызвать сульфатирование ReCD4-Ig, которое является важным для биологической укладки, связывания eCD4-Ig и активности gp120, клетки HEK293T котрансфицировали плазмидой, кодирующей ReCD4-Ig (p-ReCD4-Ig) и 4 различными конструкциями ферментов человека, кодирующими p-TPST2, p-IgE-TPST2, p- Δ TM-TPST2 и p- HS3SA. Поскольку ReCD4-Ig нацелен на секреторный путь на ранней стадии процесса трансляции лидерной последовательностью IgG, тирозин-сульфатирование ReCD4-Ig должно происходить только в том случае, если вариант TPST2 экспрессируется, по меньшей мере, в одном из секреторных компартментов клетки. Чтобы подчеркнуть способность направлять TPST2 в правый субклеточный компартмент, клетки HEK293T котрансфицировали p-ReCD4-Ig и плазмидами, кодирующими варианты фермента TPST2. Прогнозировалось, что p-IgE-TPST2, конструкция с лидерной последовательностью IgE, включенной перед TPST2, сульфатирует ReCD4-Ig, поскольку лидерная последовательность IgE облегчает доставку TPST2 в эндоплазматический ретикулум во время трансляции. Вторая конструкция TPST2 с делецией в трансмембранном (TM) мотиве, p- Δ TM-TPST2, не должна была сульфатировать ReCD4-Ig, поскольку делеция TM удаляет сигнальную якорную последовательность, необходимую для нацеливания TPST2 в секреторный компартмент. Наконец, была протестирована контрольная плазида p-HS3SA. HS3SA - это резидентный фермент Гольджи, который может переносить сульфатные группы на сульфат гепарина и, по сравнению с TPST2, имеет аналогичный каталитический сайт (Teramoto et al., 2013). Для определения минимальной дозы фермента, необходимой для максимального сульфатирования ReCD4-Ig, использовали различные дозы ДНК-кодируемых ферментов (от 1: 5000 до 1:20, фермент: ReCD4-Ig). При использовании ELISA для определения связывания антител к сульфотирозину в супернатанте клеток более высокое сульфатирование, даже при самой низкой дозе фермента 1: 5000, наблюдалось для обеих групп TPST2 и IgE-TPST2 по сравнению с исходной группой с одним только ReCD4-Ig (Фиг 1D). Кроме того, как для TPST2, так и для IgE-TPST2 сигналы сульфатирования были насыщены при примечательной дозе фермента 1: 1000, при этом более высокая доза ДНК-кодируемого фермента не способствовала усилению сульфатирования. Для сравнения, в соответствии с гипотезой, сульфатирование ReCD4-Ig как для групп Δ TM-TPST2, так и для HS3SA не превышало исходного уровня даже при максимальной дозе фермента 1:20. Отсутствие сульфатирования группой HS3SA указывает на замечательную специфичность сульфотрансфераз. Для дальнейшего подтверждения ферментно-опосредованного сульфатирования ReCD4-Ig супернатанты анализировали с помощью вестерн-блоттинга, где полосы анти-человеческого IgG на нижней панели служат в качестве контроля загрузки (Фиг 1E). Опять же, более сильные полосы сульфотирозина наблюдались для групп 1: 1000 TPST2 и IgE-TPST2 по сравнению с группами с одним только ReCD4-Ig, Δ TM и HS3SA.

Взятые вместе, эти результаты предполагают, что ДНК-кодируемый TPST2 и IgE-TPST2 могут опосредовать *in vitro* сульфатирование ReCD4-Ig в чрезвычайно низкой дозе.

Включение N-концевой лидерной последовательности IgE усиливает нацеливание TPST2 на TGN

Для определения того, могут ли закодированные ДНК ферменты перемещаться в секреторные компартменты клеток и улучшит ли последовательность IgE нацеливание использовалась флуоресцентная микроскопия. Клетки HEK293T трансфицировали либо только ReCD4-Ig, либо ReCD4-Ig в комбинации с TPST2, IgE-TPST2 или ΔTM-TPST2. Через 48 часов после трансфекции клетки собирали и окрашивали DAPI (синий), анти-TPST2 (красный) и анти-Golgin 97 (зеленый). Изображения собранных клеток, полученных при конфокальной микроскопии, демонстрируют устойчивую экспрессию TPST2, IgE-TPST2 и ΔTM-TPST2 после трансфекции (Фигура 2A). Что еще более важно, IgE-TPST2, по-видимому, локализуется с Golgin 97 в большей степени, чем TPST2, тогда как ΔTM-TPST2 не локализуется с Golgin 97. Для количественной оценки степени совместной локализации вариантов Golgin 97 и TPST2 были проанализированы коэффициенты корреляции Пирсона с красным и зеленым каналами для 16 интересующих областей для каждой группы (Фигура 2B). Средние коэффициенты Пирсона для ΔTM-TPST2, TPST2 и IgE-TPST2 составляют, соответственно, 0,161, 0,275 и 0,542. Вычисленная F-статистика из одностороннего анализа ANOVA составляет 79,67, что соответствует значению $p < 0,0001$ при, соответственно, 2 и 45 обработках и остаточных степенях свободы. Апостериорный попарный T-тест с поправкой Холма показывает, что коэффициент Пирсона для группы IgE-TPST2 значительно выше, чем для группы TPST2

($p < 10^{-6}$). Далее клетки HEK293T трансфицировали одними только ферментами и определяли паттерны локализации TPST2, IgE-TPST2 и ΔTM-TPST2 с Golgin 97, аналогичные тем, когда клетки были совместно трансфицированы ReCD4-Ig (Фигура 2C). Взятые вместе, эти результаты предполагают, что хотя и TPST2, и IgE-TPST2 могут транспортироваться в TGN, IgE-TPST2 может попадать в секреторный компартмент более эффективно, чем TPST2. Это открытие подтверждает, что N-концевая лидерная последовательность IgE распознается сигнал-распознающей частицей (SRP) более эффективно, чем внутренняя сигнальная заякоренная последовательность для TPST2 (что также является его трансмембранным доменом). Для дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo* была выбрана конструкция IgE-TPST2. Улучшенное нацеливание IgE-TPST2 в секреторные компартменты, цитозольная экспрессия IgE-TPST2 и нецелевые эффекты, вероятно, были снижены.

ДНК/ЭП обеспечивает *in vivo* экспрессию IgE-TPST2 и ReCD4-Ig

Затем определяли, могут ли IgE-TPST2 и ReCD4-Ig экспрессироваться *in vivo* путем внутримышечной инъекции ДНК с последующей электропорацией. Мышам balb/c с временным истощением вводили ДНК-кодируемый IgE-TPST2 в переднюю большеберцовую (ББ) мышцу с последующей внутримышечной электропорацией (ВМ-ЭП) с использованием устройства CELLECTRA® 3P, как описано ранее. Через одну неделю

после инъекции мышей умерщвляли и экспрессию IgE-TPST2 в мышцах определяли с помощью вестерн-блоттинга. Для сравнения также были проанализированы ББ мышцы контралатеральных лап. Наблюдалась сильная экспрессия IgE-TPST2 (человеческая форма) в инъецированных мышцах на уровне около 43 кДа и экспрессия эндогенного TPST2 мышей в контралатеральных ББ мышцах на уровне около 42 кДа (Фигура 3 А). Результаты демонстрируют надежность доставки, опосредованной ДНК/ЭП, поскольку экспрессия IgE-TPST2 стабильно наблюдается у каждого обработанного животного. Для определения возможности повторной доставки ReCD4-Ig мышам B6.Cg-Foxnlnu/J (голые) вводили p-ReCD4-Ig. Поскольку последовательность ReCD4-Ig основана на RhM, у иммунокомпетентных мышей могут развиваться сильные антитела против лекарственных препаратов и влиять на профиль экспрессии ReCD4-Ig. Таким образом, для определения начальной экспрессии ReCD4-Ig *in vivo* были использованы иммунодефицитные мыши B6.Cg-Foxnlnu/J (голые).

Наблюдался высокий уровень экспрессии ReCD4-Ig, пик которого составляет 35 мкг/мл на 14 день после инъекции (д.п.и.) (Фигура 3В). Примечательно, что был обнаружен уровень 5,7 мкг/мл через 3 д.п.и., и экспрессия продолжалась по меньшей мере 150 дней с уровнем 3 мкг/мл в последний момент времени. Аналогичные профили экспрессии ReCD4-Ig наблюдались у мышей balb/c по сравнению с голыми мышами, особенно в более ранние моменты времени (до 42 д.п.и.). Несмотря на то, что экспрессия ReCD4-Ig у balb/c немного ниже, чем у голых мышей в более поздние моменты времени, экспрессия у balb/c остается обнаруживаемой в течение 150 дней, с

Низкая доза IgE-TPST2, кодируемого ДНК может обеспечивать сульфатирование ReCD4-Ig *in vivo*

Затем способность IgE-TPST2 сульфатировать ReCD4-Ig была протестирована *in vivo*. Мышей balb/c временно истощали и вводили внутримышечно p-ReCD4-Ig, приготовленный в составе с различными дозами p-IgE-TPST2, с последующей внутримышечной ЭП. Для изучения минимального уровня фермента, необходимого для оптимизации сульфатирования ReCD4-Ig, использовали те же дозы ДНК IgE-TPST2, что и в экспериментах *in vitro* (от 1: 5000 до 1:20 относительно дозы ReCD4-Ig). Доза 1: 1000 IgE-TPST2 может насыщать те же обнаруженные при OD450 сигналы сульфатирования, что и группа 1:20 IgE-TPST2. (Фиг 3с). Кроме того, сульфатирование ReCD4-Ig было значительно выше, даже при более низкой дозе фермента 1: 5000, по сравнению с исходной группой с одним только ReCD4-Ig. Предыдущие исследования показали, что котрансфекция высокой дозы TPST2 и его целевых белков (eCD4-Ig или трипсиногена) *in vitro* приводит к снижению секреции целевых белков (Chen et al., 2016; Ronai et al., 2009). Подобное явление наблюдалось в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* (Фигура 1Е и Фигура 3D). Высокая доза (1:20) IgE-TPST2, котрансфицированного с ReCD4-Ig, приводила, соответственно, к 67% и 70% снижению экспрессии ReCD4-Ig в супернатантах трансфекции и сыворотке мышей по сравнению с группами с одним только ReCD4-Ig. Кроме того, подавление секреции ReCD4-Ig напрямую не обусловлено IgE-TPST2-опосредованным

сульфатированием, поскольку совместное введение ReCD4-Ig и 1:20 дозы ДНК HS3SA, фермента, который не может сульфатировать ReCD4-Ig (Фигура ID), все еще приводит к снижению экспрессии ReCD4-Ig на 52% (Фигура 3F). Однако при минимальной дозе 1:1000, необходимой для оптимального сульфатирования ReCD4-Ig, различий в экспрессии ReCD4-Ig между одним только ReCD4-Ig и группами ReCD4-Ig+1: 1000 IgE-TPST2 через 7 дней после инъекции не наблюдалось (Фигура 3D). Чтобы подтвердить, что на экспрессию ReCD4-Ig не влияла котрансфекция с IgE-TPST2 в низкой дозе, экспрессию в сыворотке ReCD4-Ig у инъецированных мышей прослеживали во времени с одним только pReCD4-Ig либо с pReCD4-Ig+1: 1000 p-IgE-TPST2 (Фиг 3e). Опять же, аналогичный профиль экспрессии ReCD4-Ig наблюдался в обеих группах. Взятые вместе, эти результаты показывают, что ферменты, кодируемые плазмидой, доставляемые электропорацией, могут обеспечивать сульфатирование ReCD4-Ig *in vivo* в очень низкой дозе, которая не влияет на профиль экспрессии ReCD4-Ig.

Сульфатирование *in vivo* увеличивает активность ReCD4-Ig

Затем путем анализа сывороток инъецированных мышей в анализе нейтрализации *ex vivo* определяли, может ли сульфатирование ReCD4-Ig *in vivo* повысить его эффективность. Чтобы собрать достаточное количество сывороток мышей, balb/c вводили только p-ReCD4-Ig или в комбинации с дозой p-IgE-TPST2 1: 1000 и окончательно брали кровь через 7 дней после инъекции. Опять же, аналогичные уровни ReCD4-Ig (40 мкг/мл) наблюдались в сыворотках мышей обеих групп. Во-первых, способность ReCD4-Ig в сыворотке мышей нейтрализовать один из псевдовирусов из глобальной панели (25710, Уровень 2, клада C) была протестирована с использованием стандартного анализа TZM-bl (deCamp et al., 2014). Было обнаружено, что сульфатирование, опосредованное IgE-TPST2, значительно увеличивает способность ReCD4-Ig нейтрализовать этот изолят, о чем свидетельствует сдвиг кривой нейтрализации вправо (Фигура 4B). В частности, сульфатирование, опосредованное IgE-TPST2, снижает IC₅₀ ReCD4-Ig при нейтрализации 25710 с $1,09 \pm 0,12$ мкг/мл до $0,16 \pm 0,06$ мкг/мл (падение в 6,8 раз) и IC₈₀ с $3,27 \pm 0,68$ мкг/мл до $1,35 \pm 0,20$ мкг/мл (падение в 2,4 раза). Затем оценивали, может ли ReCD4-Ig нейтрализовать другие изоляты из глобальной панели и изолят уровня 3 SIV_{mac239}, и может ли опосредованное IgE-TPST2 сульфатирование усиливать активность ReCD4-Ig. Было отмечено, что ReCD4-Ig может нейтрализовать все 13 вирусов в панели с IC₅₀ менее 5 мкг/мл и средним IC₅₀ 0,83 мкг/мл. (Фигура 4C-F). Для сравнения, сыворотки необработанных мышей не нейтрализовали ни один вирус в панели при титре 1:20. Кроме того, ReCD4-Ig в сыворотке не нейтрализовал неспецифически вирус лейкемии мышей (MLV) при титре 1: 8 (или, что эквивалентно, при дозе ReCD4-Ig 5 мкг/мл). Эти результаты подтвердили удивительный диапазон eCD4-Ig. Кроме того, сульфатирование ReCD4-Ig повышает его эффективность в нейтрализации псевдовирусов 8/12 в глобальной панели (CE1176, 25710, X2278, TRO, BJOX, X1632, CHI 19, CNE55) и Mac239 (Фигура 4E). Сульфатирование оказывает наиболее сильное влияние на нейтрализацию CE1176, который демонстрирует 10-кратное снижение IC₅₀ (от $0,57 \pm 0,27$ мкг/мл до $0,05 \pm 0,02$ мкг/мл). В

целом, сульфатирование, опосредованное IgE-TPST2, приводит к снижению среднего геометрического IC50 относительно вирусной панели с 0,83 мкг/мл до 0,27 мкг/мл. Взятые вместе, эти результаты подтвердили сульфатирование ReCD4-Ig *in vivo* с помощью IgE-TPST2 с функциональной точки зрения и продемонстрировали способность кодируемых ДНК ферментов модулировать биологические функции целевого белка посредством посттрансляционной модификации.

Посттрансляционная модификация *in vivo*

Были разработаны эксперименты с использованием технологии ДНК в качестве платформы для кодирования как молекулы eCD4Ig, так и фермента IgE-TPST2 для проведения тирозинового сульфатирования ReCD4-Ig *in vivo*. Представленные здесь результаты демонстрируют значительно повышенную эффективность иммуноадгезина и предоставляют уникальный метод персонализированного производства таких сложных молекул.

Важно отметить, что это первое сообщение об использовании ДНК для кодирования фермента посттрансляционной модификации (ПТМ) целевого белка для производства непосредственно *in vivo*. Таким образом, эти исследования подтверждают, что ДНК/ЭП обеспечивает замечательную платформу для модуляции функции белка даже после того, как он был синтезирован. Например, изменение гликозилирования Fc-части иммуноглобулина может потенциально позволить точную настройку эффекторных функций *in vivo*. Фукозилирование Fc IgG1 эндогликозидазой/фукозидазой, например, может потенциально усиливать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) модифицированного антитела; в то время как терминальное сиалирование в контексте основного фукозилирования, как сообщается, проявляет противоположный эффект (Arnold et al., 2007; Li et al., 2017). В контексте дизайна вакцины посттрансляционные модификации антигена могут создавать новые эпитопы для распознавания иммунной системой. Например, гликаны, содержащие сиаловую кислоту (в положениях N160 или N156 оболочки ВИЧ) могут распознаваться как антителами, кодируемыми зародышевой линией, так и соматически мутировавшими антителами в линии ab CAP256.VRC26 (Andrabi et al., 2017). Альтернативно, посттрансляционные модификации вакцинных антигенов могут потенциально стабилизировать их конформации в нативных состояниях, чтобы облегчить установление эффективного иммунного ответа. Сульфатирование тирозина остатков V2 на VaL ВИЧ-1 усиливает взаимодействия V2-V3, улучшает его распознавание тример-предпочитающими антителами PG9, PG16 и PGT145 и снижает его чувствительность к нейтрализации анти-V3 антителами; тогда как снижение сульфатирования тирозина имеет противоположные эффекты (Cimbro et al., 2014). Следовательно, посредством ферментно-опосредованных посттрансляционных модификаций белков-мишеней, кодируемых усовершенствованной ДНК/ЭП, вероятно, можно будет достичь модуляции активности множества важных белков *in vivo*.

Показано, что для сульфатирования ReCD4-Ig *in vivo* требуется чрезвычайно низкая доза p-IgE-TPST2 1: 1000. Это открытие было ожидаемым, поскольку одна молекула

фермента должна быть способна превращать несколько копий целевых белков. В частности, поскольку TPST2 имеет число оборота (k_{cat}) $5,1 \times 10^{-3} s^{-1}$ (для моносульфатированного пептида CCR8), а период полужизни резидентного фермента Гольджи составляет около 20 часов, одна копия фермента TPST2 должна быть способна к превращению по меньшей мере сотен копий ReCD4-Ig (Danan et al., 2010; Strous, 1986). Следует отметить, что доза, необходимая для сульфатирования ReCD4-Ig, намного ниже для кодируемого ДНК IgE-TPST2 (1: 1000), чем для кодируемого AAV TPST2 (1: 4). Это означает высокую эффективность доставки ферментов, опосредованную ДНК/ЭП, и то, что мышечные клетки одновременно получали отдельные копии p-IgE-TPST2 и p-ReCD4-Ig. Это связано с тем, что импульсные электрические поля могут создавать временные поры в плазматической мембране и перемещать полианионную плазмидную ДНК непосредственно в клетки, что приводит к увеличению эффективности трансфекции в 100-1000 раз (Sardesai and Weiner, 2011). Для сравнения, поглощение кодируемых AAV генетических материалов (ReCD4-Ig и TPST2) клетками требует клатрин-зависимого эндоцитоза или макропиноцитоза (Stoneham et al., 2012; Weinberg et al., 2014), и трансдукция мышечных клеток как AAV-TPST2, так и AAV-eCD4-Ig может происходить стохастическим образом.

Результаты также подтверждают подход к нацеливанию фермента на конкретный субклеточный компартмент, чтобы максимизировать его функции. Хотя эффективность опосредованного IgE-TPST2 сульфатирования аналогична эффективности сульфатирования, опосредованного TPST2 (Фигура ID), избирательное нацеливание IgE-TPST2 может потенциально снизить цитозольную экспрессию фермента и нецелевое сульфатирование. Этот подход может быть дополнительно расширен для направленного воздействия на белки в других субклеточных компартментах для терапевтических и исследовательских целей. Например, N-концевая последовательность, состоящая из 10-70 аминокислот, может направлять белок в митохондрии; мотив дилейцина DXXLL или мотив на основе тирозина YXXØ в цитоплазматическом хвосте трансмембранного белка может нацеливать белки на лизосому; тогда как единица из 5 основных положительно заряженных аминокислот в полипептидной цепи может нацеливать белок на ядро (Braulke and Bonifacino, 2009; Lange et al., 2007; Regev-Rudzki et al., 2008).

Наконец, здесь показано, что ДНК/ЭП обеспечивает надежную и долгосрочную экспрессию *in vivo* иммуноадгезинов, таких как ReCD4-Ig. При однократном введении у мышей наблюдался пиковый уровень экспрессии 80-100 мкг/мл, при этом уровни оставались выше 3 мкг/мл в течение 150 дней. Эта доставка *in vivo* приводит к подтвержденной широте и эффективности ReCD4-Ig, который может нейтрализовать все изоляты из глобальной панели с IC50 менее 5 мкг/мл и средним IC50 0,27 мкг/мл.

Таким образом, описаны несколько достижений, направленных на нацеливание фермента на секреторный компартмент клеток и использование ДНК/ЭП для его экспрессии *in vivo*, что приводит к значительной активности *in vivo*. Важно отметить, что доставленный ДНК/ЭП IgE-TPST2 может значительно повысить эффективность eCD4-Ig

посредством посттрансляционного сульфатирования *in vivo*, что, вероятно, требует дальнейших исследований в качестве инструмента для борьбы с ВИЧ-инфекцией.

Сейчас описываются материалы и способы.

20 Животные

Самки balb/c и B6.Cg-FoxnlnuJ возрастом 6-8 недель были получены либо от Charles River (Wilmington, MA), либо от Jackson laboratory (Bar Harbor, ME). Для доставки ДНК для временной иммуномодуляции мышам вводили однократную внутрибрюшинную инъекцию 500 мкг антител против CD40L мыши (клон MR-1, BioXCell). Затем им давали 160 мкг (2 инъекции, в левую и правую ББ мышцу), 25 или 320 мкг (4 инъекции, в левую и правую четырехглавую мышцу, левую и правую ББ мышцу) ДНК в составе вместе с 12 ед. гиалуронидазы (Hyalenex, каталог: 18657-117-04) (26,27). Через 1 минуту после инъекции проводилась внутримышечная электропорация в каждом месте инъекции с помощью устройства Collectra 3P (Inovio Pharmaceutical) (Broderick and Humeau, 2015).

Конструирование ДНК и синтез плазмиды

Последовательность белка для ReCD4-Ig была получена, как описано ранее (Gardner et al., 2015). Последовательности белков TPST2 и HS3SA человека были получены из UniProt (номера доступа: 060704 и Q9Y663). Последовательность белка для SIV_{mac239} была получена из GenBank (номер доступа M33262). ДНК, кодирующие белковые последовательности, были оптимизированы по кодонам и РНК, как описано ранее (Elliott et al., 2017; Patel et al., 2017). Оптимизированные трансгены были синтезированы *de novo* (GenScript, Piscataway, NJ) и клонированы в остов pVAX под контролем промотора CMV человека и сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста. Плазмиды, кодирующие gp160 оболочки ВИЧ для TRO1 1, 25710, 398F1, CNE8, X2278, BJOX2000, X1632, CE1176, 246F3, CHI 19, CE0217 и CNE55, были получены от программы NIH-AIDS reagent и амплифицированы в Aldevron LLC (Fargon, ND).

Клеточные линии, трансфекция и очистка ReCD4-Ig

Клетки HEK293T (CRL-3216, ATCC) и TZM-bl содержались в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и выращивались при 37°C и 5% CO₂. Клетки Expi293F cells содержались в среде экспрессии Expi293 при 37°C и 8% CO₂. Чтобы определить сульфатирование ReCD4-Ig *in vitro*, клетки высевали с плотностью 0,5x10⁶ клеток/мл в 6-луночный планшет и трансфицировали 1,0 мкг p-ReCD4-Ig и различными дозами ферментов, кодируемых плазмидой, с GeneJammer. Через 48 часов после трансфекции супернатанты собирали и центрифугировали при 1500 g в течение 5 минут для удаления клеточного дебриса. Прилипшие клетки лизировали 1-кратным буфером для лизиса клеток с коктейлем ингибиторов протеазы. Чтобы получить стандарты ReCD4-Ig для количественного ELISA-анализа, клетки Expi 293F высевали с плотностью 2,5 × 10⁶ клеток/мл в среду экспрессии Expi293, оставляли на ночь и трансфицировали p-ReCD4-Ig и ExpiFectamine™ в OPTI-MEM. Усилители трансфекции добавляли через 20 часов после трансфекции, а супернатант собирали через 5 дней после трансфекции. Для очистки ReCD4-Ig использовали магнитные шарики с протеином G (GenScript), и чистоту подтверждали

окрашиванием кумасси гелей ДСН-ПААГ.

ELISA

Для количественного определения ReCD4-Ig на основе ELISA планшеты MaxiSorp покрывали 1 мкг/мл JR-FL gp140 в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 4 раза фосфатно-солевым буфером+0,1% Твин 20 (PBS-T) и блокировали 10% фетальной бычьей сывороткой в PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали и инкубировали с образцами сыворотки, разведенными в PBS-T, в течение одного часа при комнатной температуре. Планшеты снова промывали и инкубировали с вторичным козьим антителом против человеческого Fc, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) при разведении 1: 5000 в течение 1 часа. Затем планшеты проявляли с помощью SigmaFast OPD в течение 10 минут перед тем, как проводить измерения OD450 с помощью устройства для считывания планшетов Synergy2.

Чтобы обнаружить сульфатирование ReCD4-Ig в супернатантах трансфекции или сыворотке, планшет MaxiSorp покрывали при 4°C в течение ночи 5 мкг/мл JR-FL gp140. Планшеты промывали и блокировали 10% FBS/PBS в течение 3 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали, и образцы, разбавленные PBS-T, дополнительно инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты снова промывали и инкубировали совместно с разведенным 1: 250 мышинным антисульфотирозиновым антителом (клон 1C-A2, MiliporeSigma) в течение 1 часа при комнатной температуре. Было обнаружено, что длительная инкубация на этом этапе может увеличить фон. Наконец, планшеты промывали и инкубировали с разведением 1: 5000 вторичного антитела против мышинового IgG2a HRP в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты проявляли с помощью SigmaFast OPD в течение 10 минут и измеряли сигналы OD450.

Вестерн-блоттинг

Для обнаружения ReCD4-Ig на Фигуре 1C 10 мкл супернатанта трансфекции загружали в предварительно отлитые 4-12% гели Bis-Tris в невосстанавливающих условиях и переносили на PVDF-мембрану Immobilon-FL при помощи влажного переноса. ReCD4-Ig был идентифицирован с помощью козьего античеловеческого IgG IRDye 800CW (который перекрестно реагирует с резус-IgG2 Fc) при разведении 1: 10 000. Для обнаружения сульфатированного тирозина в ReCD4-Ig (Фигура 1E), мембрану инкубировали в течение ночи с мышинным анти-сульфотирозином (1C-A2) в разведении 1: 1000 при 4°C и проявляли с козьим антимышиным IgG IRDye 680RD. Поскольку антимышинные и античеловеческие антитела конъюгированы с красителями разного цвета, можно одновременно визуализировать полосы ReCD4-Ig и сульфотирозина на одной мембране. Для обнаружения экспрессии IgE-TPST2 мышей умерщвляли через 7 дней после инъекций ДНК/ВМ-ЭП. Собирали ББ мышцы и гомогенизировали в буфере для экстракции T-PER с ингибитором протеазы. 50 мкг мышечных гомогенатов загружали в 4-12% Bis-Tris гель в восстанавливающих условиях и переносили на мембрану из ПВДФ при помощи влажного переноса. Мембрану инкубировали в течение ночи с поликлональными кроличьими антителами против TPST2 и моноклональными мышинными антителами против GAPDH при

4°C. Впоследствии была разработана мембрана с использованием козьих антител против IgG мыши IRDye 680RD и козьих антител против кроличьих IgG IRDye 800CW. Все мембраны сканировали с помощью Odyssey CLx.

Флуоресцентная микроскопия

Предметные стекла 8-луночных камер (Nunc) предварительно покрывали раствором поли-L-лизина перед тем, как высевать клетки HEK293T при плотности 2×10^5 на лунку и инкубировать в течение ночи. Затем клетки трансфицировали 1,0 мкг p-ReCD4-Ig и 0,05 мкг p-TPST2, p-IgE-TPST2 или p-ΔTM-TPST2 с помощью GeneJammer. Через 48 часов после трансфекции клетки фиксировали и пермеабелизировали 4% формальдегидом в PBS и 0,5% Triton-X-100 и блокировали 3% BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем клетки окрашивали в течение ночи при 4°C с использованием разведения 1: 200 антитела против Golgin 97 в 1% BSA/PBS-T и разведения 1: 200 поликлонального кроличьего антитела против TPST2. Затем клетки промывали PBS-T и окрашивали разведением 1: 500 козьих антител против кролика Alexa Fluor 594 и козьих антител против мыши Alexa Fluor 488. Для окрашивания ядра клетки инкубировали с 0,5 мкг/мл DAPI в PBS-T и закрывали покровными стеклами с использованием Prolonged Diamond AntiFade Mountant. Затем были получены изображения серии срезов по оси Z с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 II с 64-кратным объективом. Максимальные проекции серии срезов по оси Z, деконволюции и анализа областей интереса были выполнены с помощью программного обеспечения Leica LASX для получения коэффициентов корреляции Пирсона для количественной оценки совместной локализации TPST2 и Golgin 97.

Анализ нейтрализации *ex vivo*

Синтез оболочки псевдотипированных вирусов ВИЧ и анализы TZM-bl были выполнены, как описано ранее (Sarzotti-Kelsoe et al., 2014). Вкратце, Т-клетки HEK293 трансфицировали 4 мкг плазмиды, кодирующей оболочку ВИЧ, и 8 мкг плазмиды, кодирующей сердцевину ВИЧ (pSG3 Aenv), с помощью GeneJammer. Через 48 часов после трансфекции супернатанты фильтровали с помощью Steriflip и хранили при -80°C. Псевдовirus титровали с помощью репортерного анализа люциферазы TZM-bl с использованием Britelight Plus для определения титра, который соответствует, по меньшей мере, 150 000 RLU (относительные единицы люминесценции). Сыворотки мышей инактивировали нагреванием при 56°C в течение 10 минут для анализов нейтрализации TZM-bl для определения концентрации/титра в сыворотке, которые могли бы привести к 50% нейтрализации вируса (IC50).

Статистика

Односторонний анализ ANOVA и попарные Т-тесты (с поправками Холма-Бонферрони в случае множественных сравнений) проводились с помощью GraphPad Prism 7.0. Значения IC50 рассчитывались с помощью модели нелинейной регрессии процентной нейтрализации по сравнению с log (обратное разведение сыворотки) с использованием Prism 7.0. Р-значения менее 0,05 считались статистически значимыми.

ССЫЛКИ

Andrabi, R., Su, C.Y., Liang, C.H., Shivatare, S.S., Briney, B., Voss, J.E., Nawazi, S.K., Wu, C.Y., Wong, C.H., and Burton, D.R. (2017). Glycans Function as Anchors for Antibodies and Help Drive HIV Broadly Neutralizing Antibody Development. *Immunity* 47, 524-537 e523.

Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., and Dwek, R.A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25, 21-50.

Bradbury, A.F., and Smyth, D.G. (1991). Peptide amidation. *Trends Biochem Sci* 16, 112-115.

Braulke, T., and Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793, 605-614.

Broderick, K.E., and Humeau, L.M. (2015). Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines. *Expert Rev Vaccines* 47, 195-204.

Chen, W., Bardhi, A., Feng, Y., Wang, Y., Qi, Q., Li, W., Zhu, Z., Dyba, M.A., Ying, T., Jiang, S., *et al.* (2016). Improving the CH1-CK heterodimerization and pharmacokinetics of 4Dm2m, a novel potent CD4-antibody fusion protein against HIV-1. *MAbs* 8, 761-774.

Cimbro, R., Gallant, T.R., Dolan, M.A., Guzzo, C., Zhang, P., Lin, Y., Miao, H., Van Ryk, D., Arthos, J., Gorshkova, I., *etal.* (2014). Tyrosine sulfation in the second variable loop (V2) of HIV-1 gp120 stabilizes V2-V3 interaction and modulates neutralization sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 3152-3157.

Danan, L.M., Yu, Z., Ludden, P.J., Jia, W., Moore, K.L., and Leary, J.A. (2010).

Catalytic mechanism of Golgi-resident human tyrosylprotein sulfotransferase-2: a mass spectrometry approach. *J Am Soc Mass Spectrom* 21, 1633-1642.

deCamp, A., Hraber, P., Bailer, R.T., Seaman, M.S., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Gottardo, R., Edlefsen, P., Self, S., Tang, H., *etal.* (2014). Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol* 88, 2489-2507.

Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T., and Elliott, S. (1992). Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* 31, 9871-9876.

Elliott, S.T.C., Kallewaard, N.L., Benjamin, E., Wachter-Rosati, L., McAuliffe, J.M., Patel, A., Smith, T.R.F., Schultheis, K., Park, D.H., Flingai, S., *etal.* (2017). DMAB inoculation of synthetic cross reactive antibodies protects against lethal influenza A and B infections. *NPJ Vaccines* 2, 18.

Gardner, M.R., Kattenhom, L.M., Kondur, H.R., von Schaewen, M., Dorfman, T., Chiang, J.J., Haworth, K.G., Decker, J.M., Alpert, M.D., Bailey, C.C., *et al.* (2015). AAV- expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature* 519, 87- 91.

Graf, M., Demi, L., and Wagner, R. (2004). Codon-optimized genes that enable increased heterologous expression in mammalian cells and elicit efficient immune responses in mice after vaccination of naked DNA. *Methods Mol Med* 94, 197-210.

- Harris, R. J. (2005). Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function. *Dev Biol (Basel)* 122, 117-127.
- Haryadi, R., Ho, S., Kok, Y.J., Pu, H.X., Zheng, L., Pereira, N.A., Li, B., Bi, X., Goh, L.T., Yang, Y., *et al.* (2015). Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One* 10, e016878.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., and Corbett, A.H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282, 5101-5105.
- Li, T., DiLillo, D.J., Boumazos, S., Giddens, J.P., Ravetch, J.V., and Wang, L.X. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 3485-3490.
- Patel, A., DiGiandomenico, A., Keller, A.E., Smith, T.R.F., Park, D.H., Ramos, S., Schultheis, K., Elliott, S.T.C., Mendoza, J., Broderick, K.E., *et al.* (2017). An engineered bispecific DNA-encoded IgG antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* in a pneumonia challenge model. *Nat Commun* 8, 637.
- Prigge, S.T., Mains, R.E., Eipper, B.A., and Amzel, L.M. (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci* 57, 1236-1259.
- Regev-Rudzki, N., Yogev, O., and Pines, O. (2008). The mitochondrial targeting sequence tilts the balance between mitochondrial and cytosolic dual localization. *J Cell Sci* 121, 2423-2431.
- Ronai, Z., Witt, H., Rickards, O., Destro-Bisol, G., Bradbury, A.R., and Sahin-Toth, M. (2009). A common African polymorphism abolishes tyrosine sulfation of human anionic trypsinogen (PRSS2). *Biochem J* 418, 155-161.
- Sardesai, N.Y., and Weiner, D.B. (2011). Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol* 23, 421-429.
- Sarzotti-Kelsoe, M., Bailer, R.T., Turk, E., Lin, C.L., Bilska, M., Greene, K.M., Gao, H., Todd, C.A., Ozaki, D.A., Seaman, M.S., *etal.* (2014). Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J Immunol Methods* 409, 131-146.
- Son, Y.D., Jeong, Y.T., Park, S.Y., and Kim, J.H. (2011). Enhanced sialylation of recombinant human erythropoietin in Chinese hamster ovary cells by combinatorial engineering of selected genes. *Glycobiology* 21, 1019-1028.
- Stone, S.R., and Hofsteenge, J. (1986). Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* 25, 4622-4628.
- Stoneham, C.A., Hollinshead, M., and Hajitou, A. (2012). Clathrin-mediated endocytosis and subsequent endo-lysosomal trafficking of adeno-associated virus/phage. *J Biol Chem* 287, 35849-35859.
- Strous, G.J. (1986). Golgi and secreted galactosyltransferase. *CRC Crit Rev Biochem* 21, 119-151.
- Sun, Y.M., Jin, D.Y., Camire, R.M., and Stafford, D.W. (2005). Vitamin K epoxide

reductase significantly improves carboxylation in a cell line overexpressing factor X. *Blood* 106, 3811-3815.

Teramoto, T., Fujikawa, Y., Kawaguchi, Y., Kurogi, K., Soejima, M., Adachi, R., Nakanishi, Y., Mishiro-Sato, E., Liu, M.C., Sakakibara, Y., *et al.* (2013). Crystal structure of human tyrosylprotein sulfotransferase-2 reveals the mechanism of protein tyrosine sulfation reaction. *Nat Commun* 4, 1572.

Tsang, T.C., Bentley, D.R., Mibashan, R.S., and Giannelli, F. (1988). A factor IX mutation, verified by direct genomic sequencing, causes haemophilia B by a novel mechanism. *EMBO J* 7, 3009-3015.

Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., and Bailey, J.E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* 17, 176-180.

Walsh, G., and Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of 5 therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* 24, 1241-1252.

Weinberg, M.S., Nicolson, S., Bhatt, A.P., McLendon, M., Li, C., and Samulski, R.J. (2014). Recombinant adeno-associated virus utilizes cell-specific infectious entry mechanisms. *J Virol* 88, 12472-12484.

Раскрытия всех без исключения патентов, патентных заявок и публикаций, цитируемых в данном документе, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Хотя изобретение раскрывается со ссылкой на конкретные варианты воплощения, очевидно, что другие варианты воплощения и варианты этого изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области техники без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Прилагаемая формула изобретения предназначена для включения всех таких вариантов воплощения и эквивалентных вариантов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор, при этом белок-модификатор посттрансляционно модифицирует синтетическое биологическое вещество в организме субъекта.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что посттрансляционная модификация выбрана из группы, состоящей из сульфатирования, ацетилирования, N-связанного гликозилирования, миристоилирования, пальмитоилирования, сумоилирования, гидроксилирования, метилирования, O-связанного гликозилирования, убиквитилирования, окисления и пальмитоилирования.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что посттрансляционная модификация представляет собой сульфатирование, а белок-модификатор выбран из группы, состоящей из тирозилпротеинсульфотрансферазы 1 (TPST1) и TPST2.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что белок-модификатор представляет собой TPST2.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что TPST2 включает лидерную последовательность IgE.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что TPST2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что синтетический белок представляет собой антиген, антитело или иммуноадгезин.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что иммуноадгезин представляет собой eCD4-Ig.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты включает последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2 или 4.

12. Способ по п.2, отличающийся тем, что посттрансляционная модификация представляет собой сульфатирование, белок-модификатор представляет собой тирозилпротеинсульфотрансферазу 1 (TPST2), а синтетический белок представляет собой eCD4-Ig, при этом eCD4-Ig вульфатируется в организме субъекта.

13. Композиция для посттрансляционной модификации синтетического белка в организме субъекта, содержащая:

первую рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

синтетический белок, и

вторую рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок-модификатор.

14. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что белок-модификатор катализирует посттрансляционную модификацию (ПТМ) синтетического белка, при этом ПТМ выбрана из группы, состоящей из посттрансляционной модификации, выбранной из группы, состоящей из сульфатирования, ацетилирования, N-связанного гликозилирования, миристоилирования, пальмитоилирования, сумоилирования, гидроксипирования, метилирования, O-связанного гликозилирования, убиквитилирования, окисления и пальмитоилирования.

15. Композиция по п.14, отличающаяся тем, что ПТМ представляет собой сульфатирование, и белок-модификатор выбран из группы, состоящей из тирозилпротеинсульфотрансферазы 1 (TPST1) и TPST2.

16. Композиция по п.15, отличающаяся тем, что белок-модификатор представляет собой TPST2.

17. Композиция по п.16, отличающаяся тем, что TPST2 включает лидерную последовательность IgE.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что TPST2 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 5 или 7.

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 6 или 8.

20. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что синтетический белок представляет собой антиген, антитело или иммуноадгезин.

21. Композиция по п. 20, отличающаяся тем, что иммуноадгезин представляет собой eCD4-Ig.

22. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что eCD4-Ig содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 1 или 3.

23. Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID NO: 2 или 4.

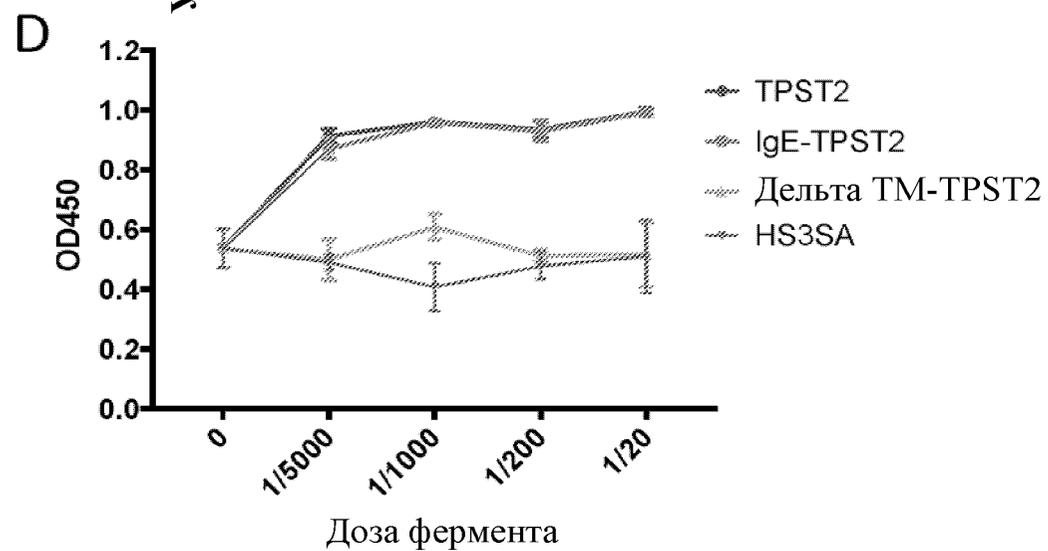
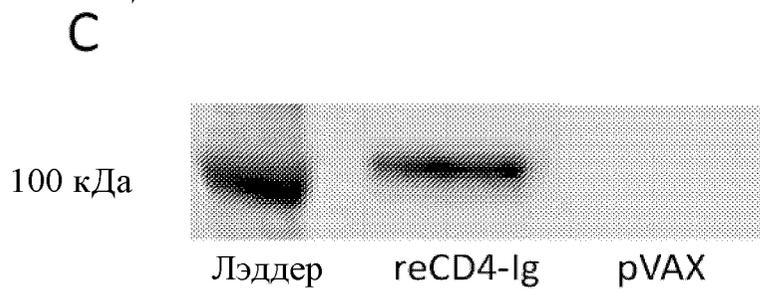
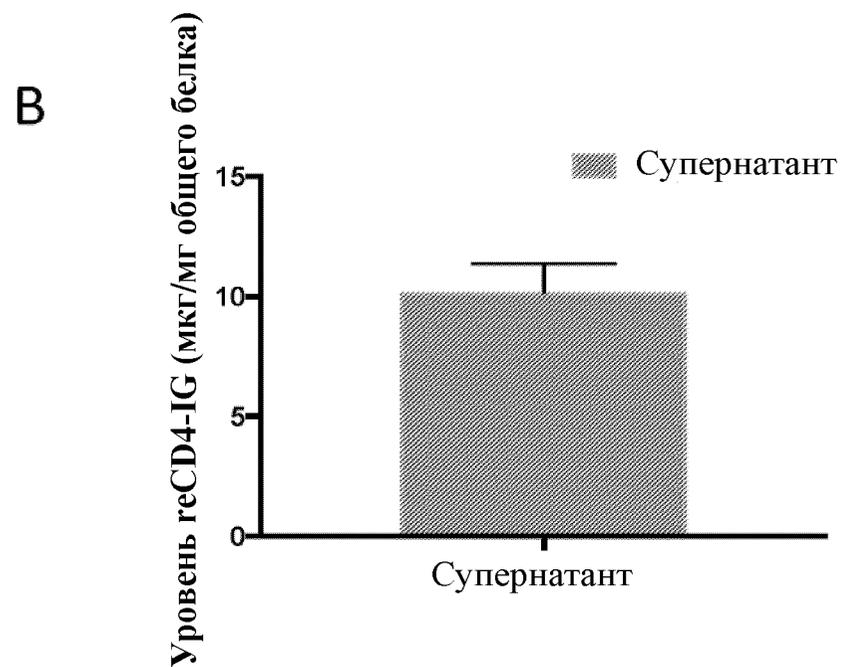
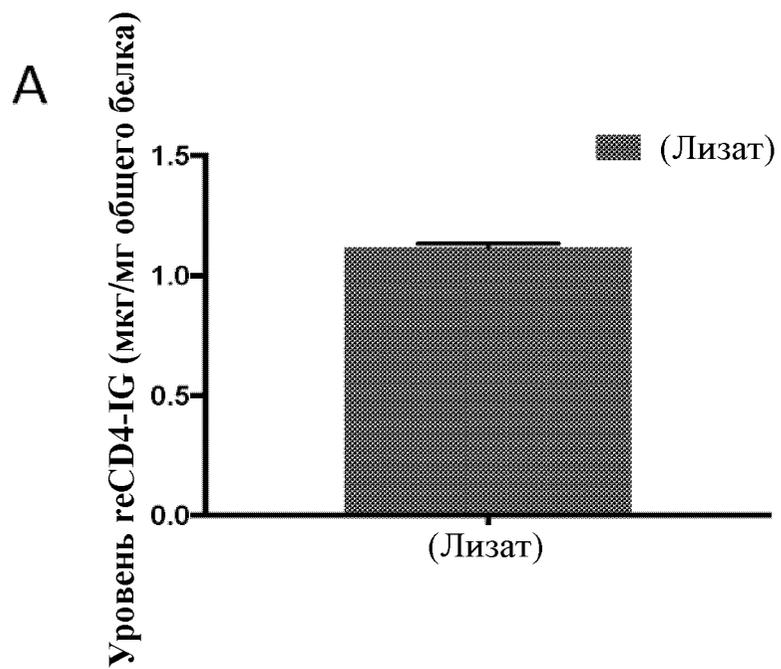
24. Композиция по любому из пп. 13-23, отличающаяся тем, что одна или более молекул нуклеиновой кислоты сконструированы в векторе экспрессии.

25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

26. Способ лечения заболевания, нарушения или инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой композиции по пп. 13-25.

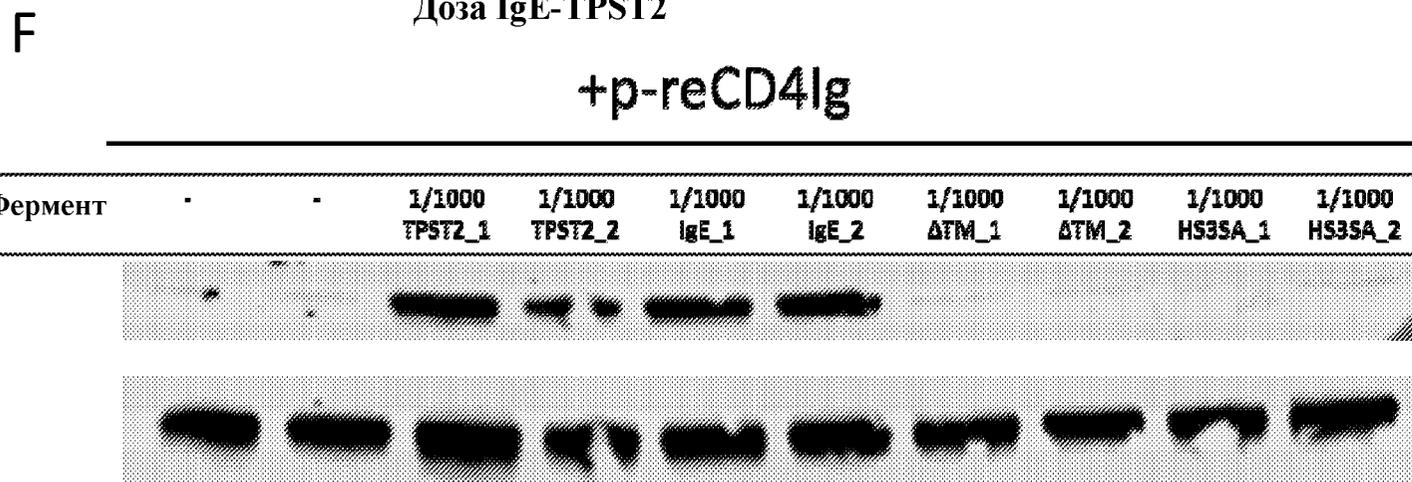
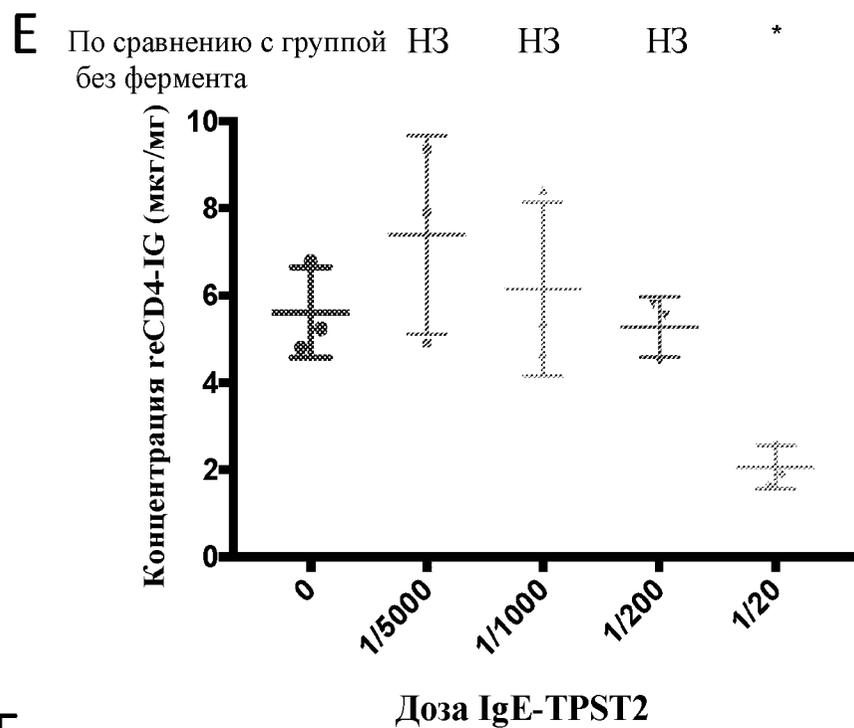
27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что введение композиции включает этап электропорации.

По доверенности



1/14

ФИГ. 1А - ФИГ. 1D



Антитела к сульфотирозину

Антитела к IgG человека

ФИГ. 1Е - ФИГ. 1F

A

+p-eCD4lg

Фермент

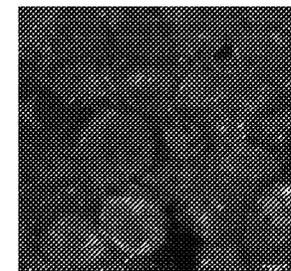
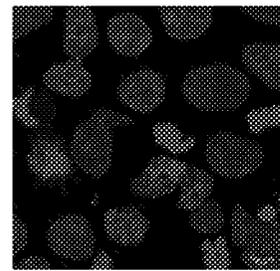
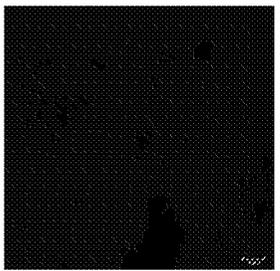
A-Golgin 97

A-TPST2

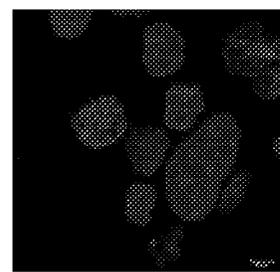
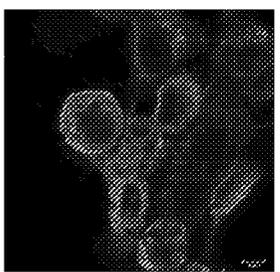
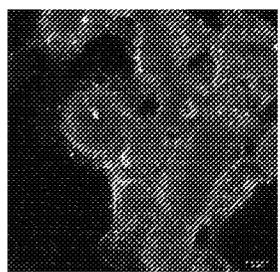
DAPI

Наложение

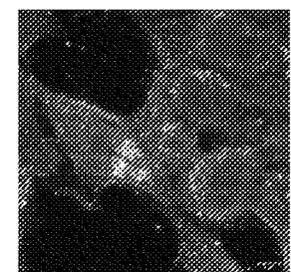
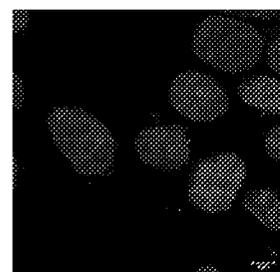
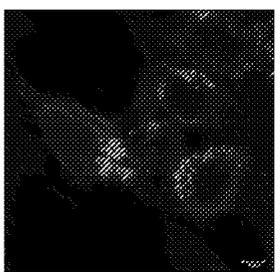
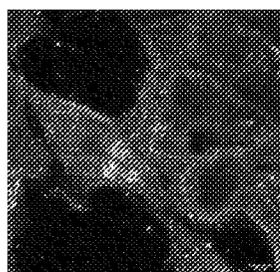
-



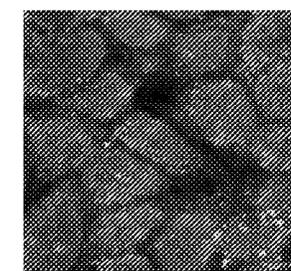
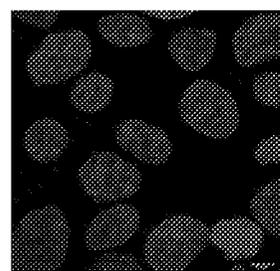
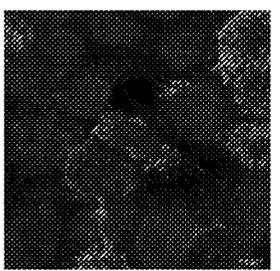
TPST2



IgE-TPST2



ΔTM-TPST2



3/14

ФИГ. 2А

+pVAX

Фермент

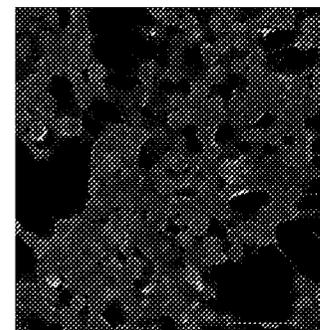
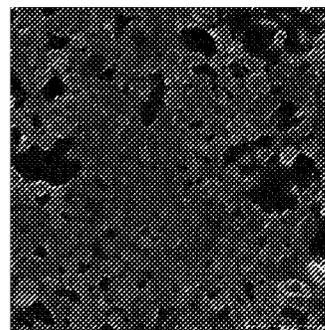
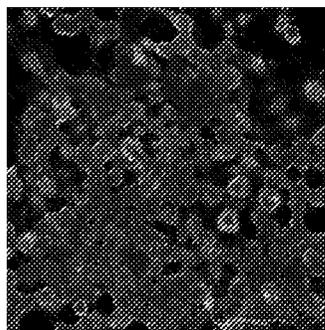
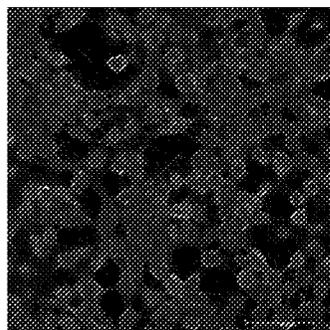
-

TPST2

IgE-
TPST2

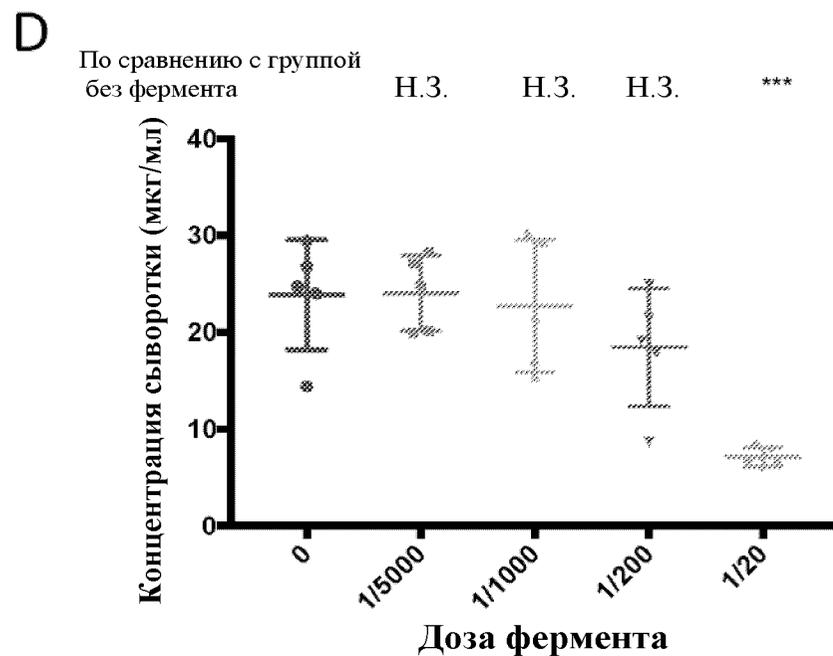
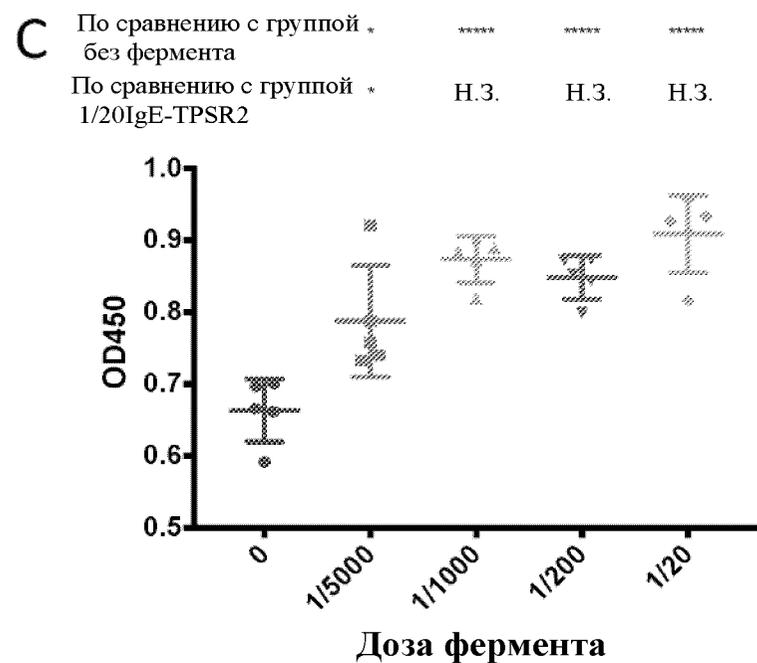
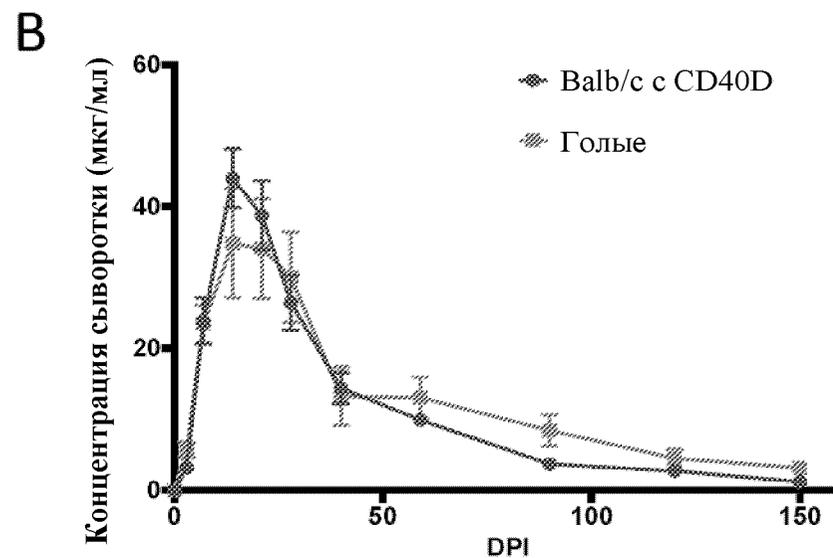
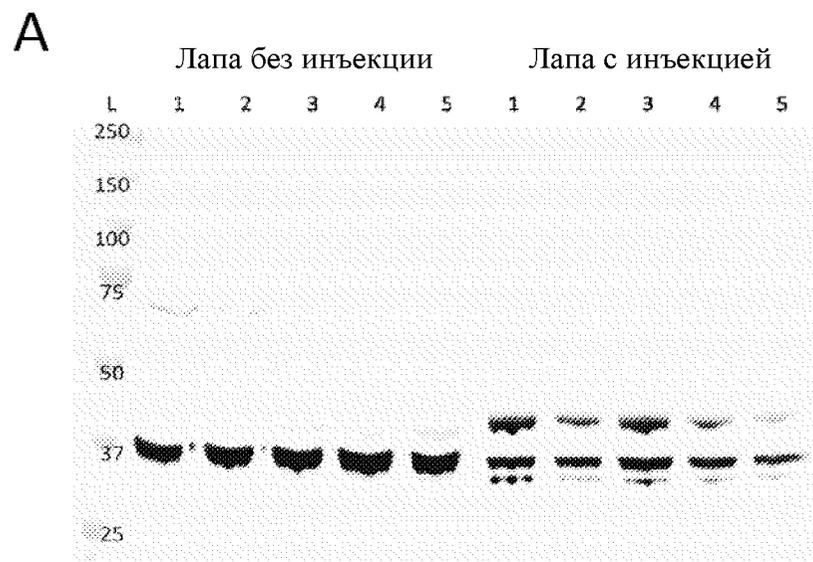
Δ TM-
TPST2

Зеленый: A-Golgin
Красный: A-TPST2
Синий: DAPI

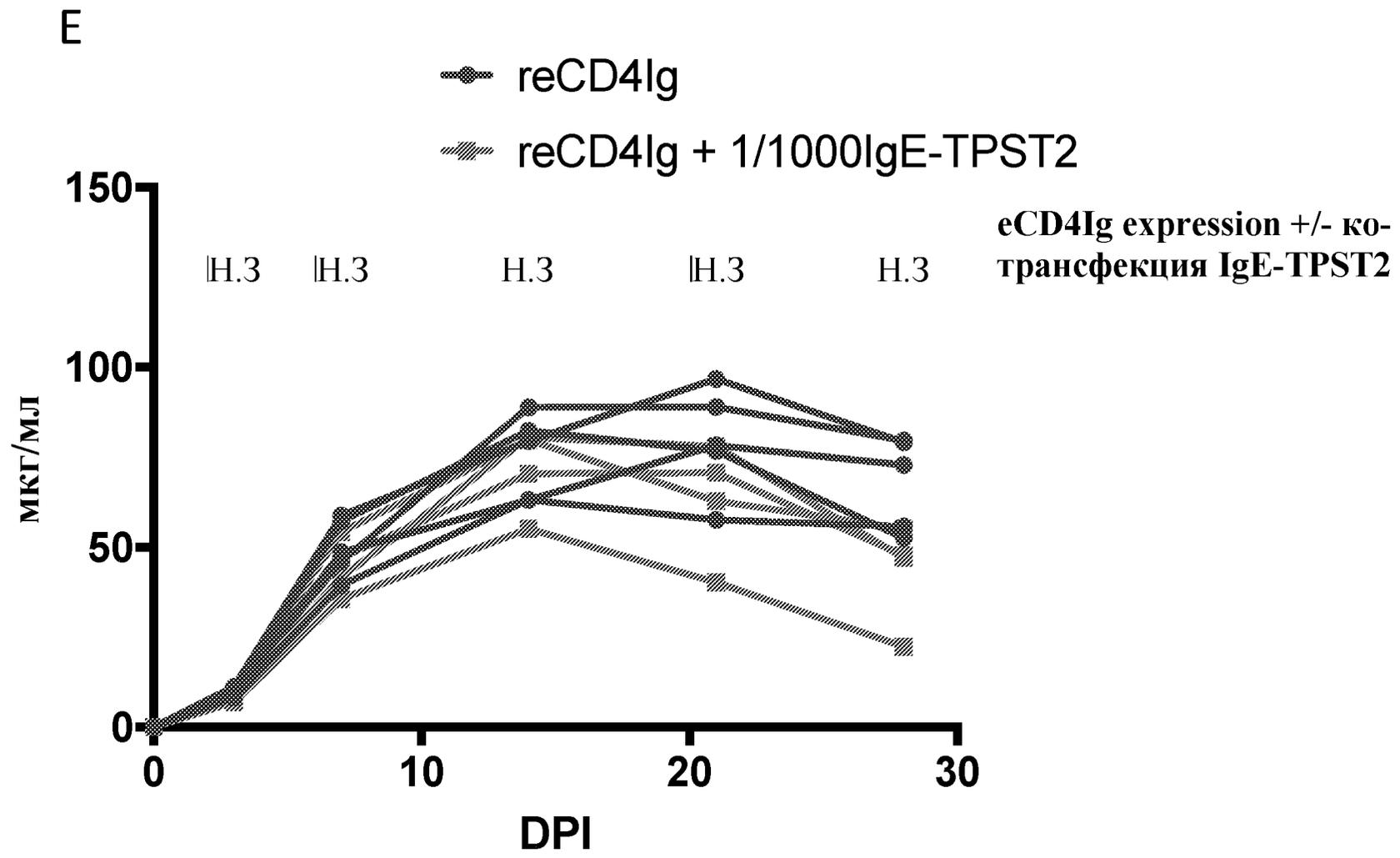


5/14

ФИГ. 2С



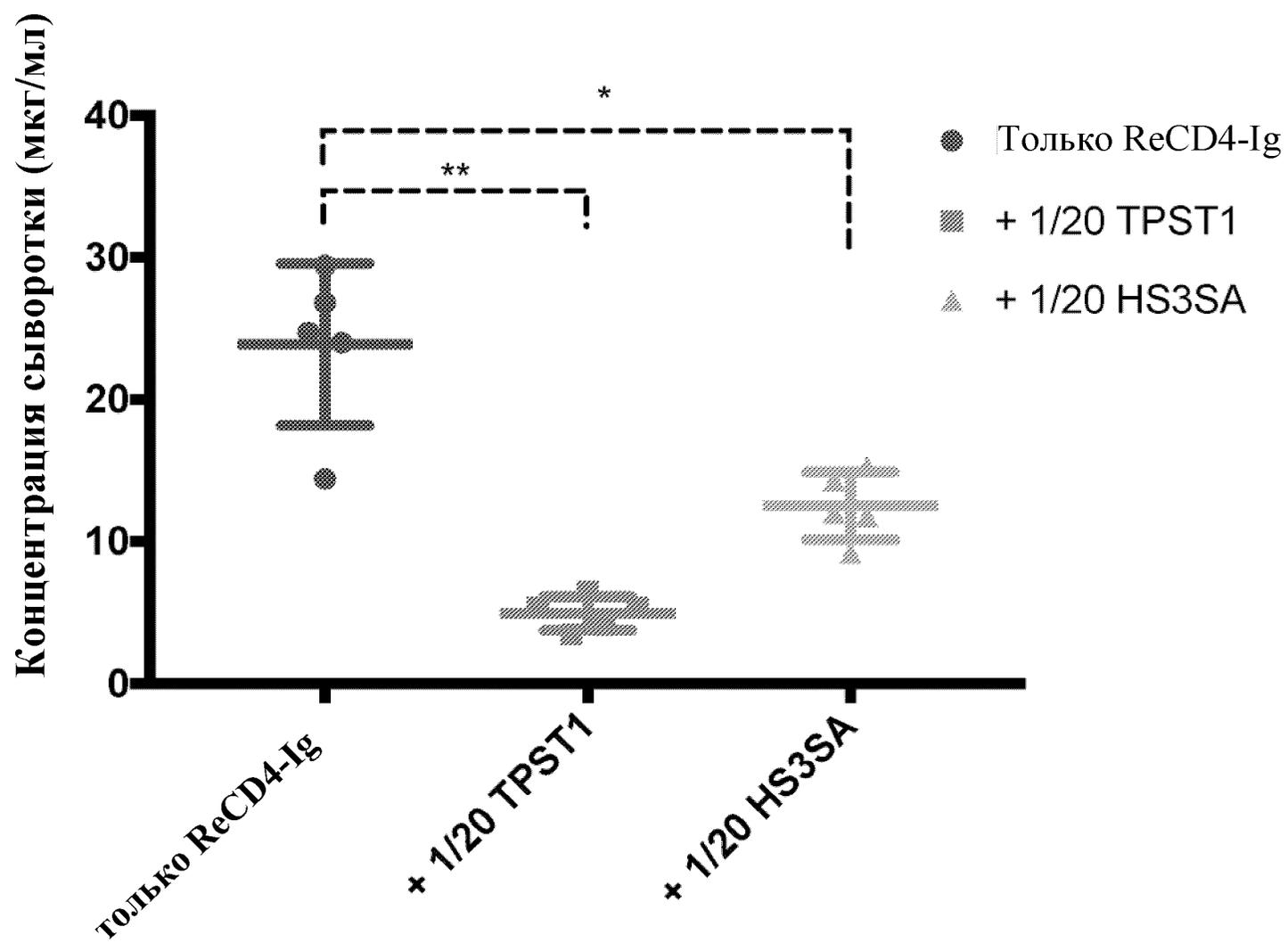
ФИГ. 3А - ФИГ. 3D



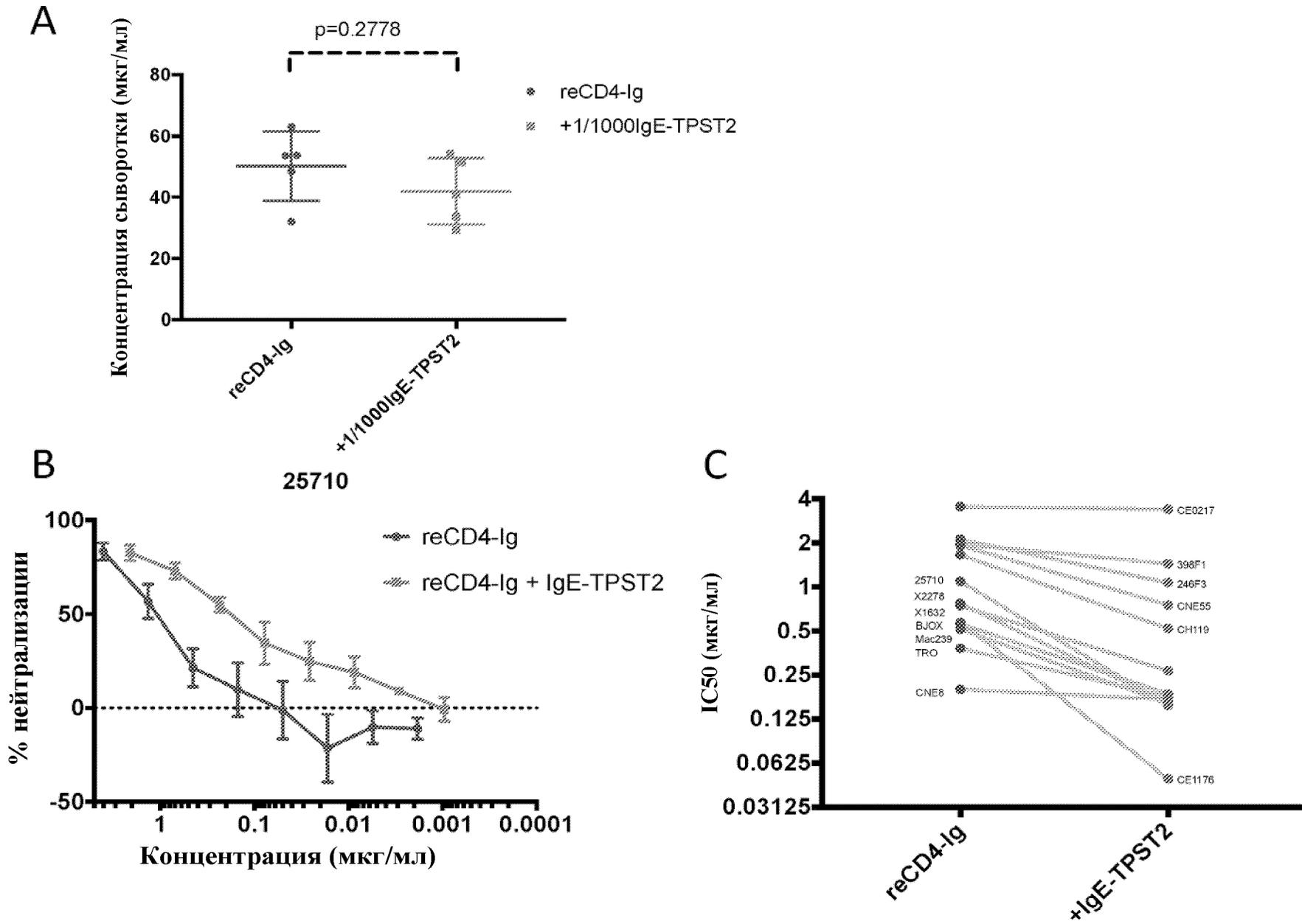
7/14

ФИГ. 3Е

F



ФИГ. 3F



ФИГ. 4А - ФИГ. 4С

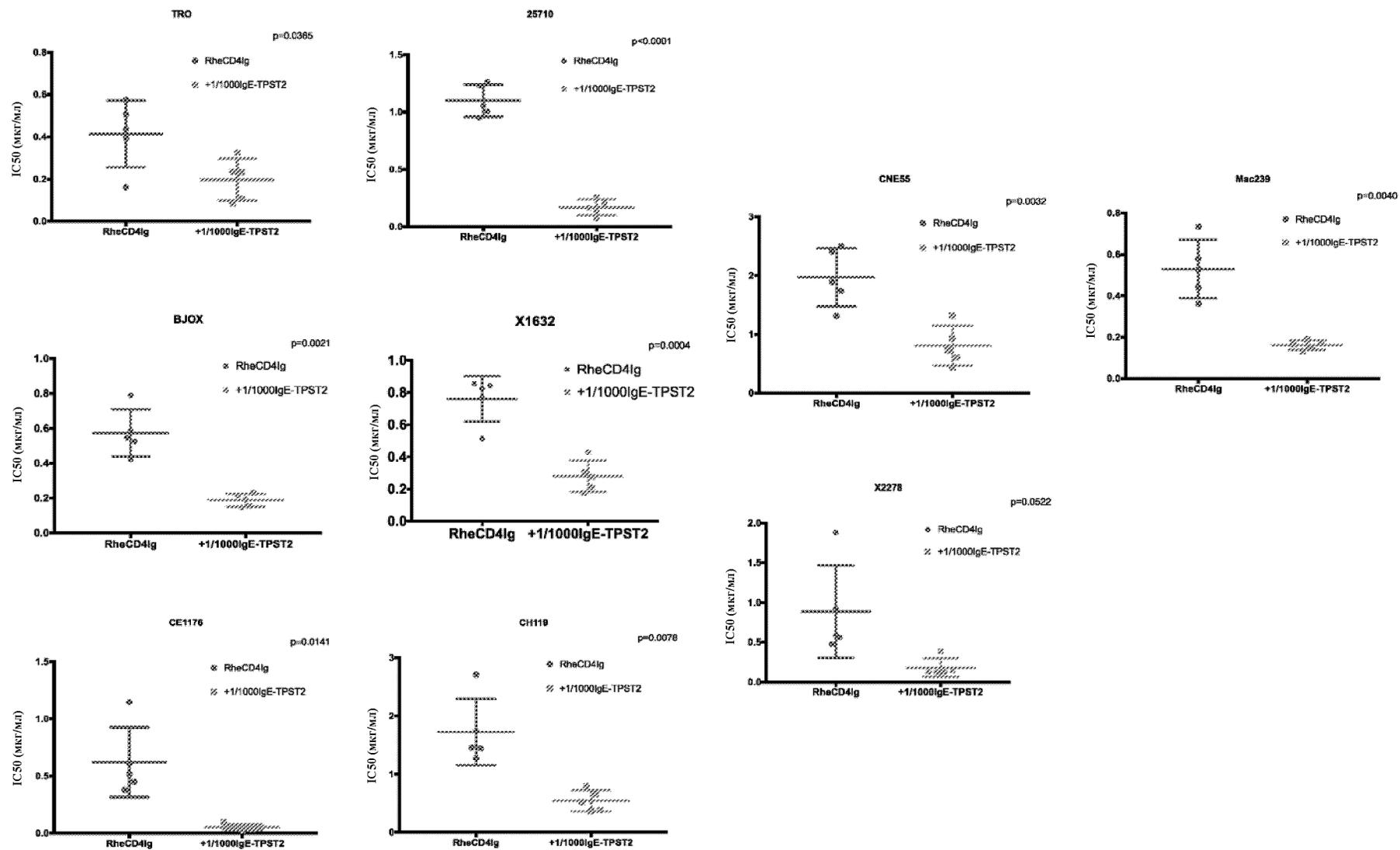
D

	Уровень	Клада	reCD-4Ig (мкг/мл)	reCD4-Ig + IgE-TPST2 (мкг/мл)	Сыворотка необработанных мышей (кратно)
CE1176	2	C	0.57 ± 0.27	0.05 ± 0.02	<20
25710	2	C	1.09 ± 0.12	0.16 ± 0.06	<20
Mac239	3	SIV	0.51 ± 0.13	0.16 ± 0.02	<20
X2278	2	B	0.77 ± 0.52	0.16 ± 0.10	<20
CNE8	2	AE	0.20 ± 0.15	0.17 ± 0.10	<20
TRO	2	B	0.38 ± 0.14	0.18 ± 0.09	<20
BJOX	2	BC	0.56 ± 0.11	0.19 ± 0.03	<20
X1632	2	G	0.75 ± 0.13	0.27 ± 0.09	<20
CH119	2	BC	1.66 ± 0.51	0.52 ± 0.16	<20
CNE55	2	AE	1.92 ± 0.44	0.75 ± 0.30	<20
246F3	2	AC	2.11 ± 0.88	1.07 ± 0.79	<20
398F1	2	A	1.97 ± 0.75	1.44 ± 0.96	<20
CE0217	2	C	3.54 ± 0.87	3.40 ± 0.99	<20
MLV			>5.00	>5.00	<20
Среднее IC50			0.83	0.27	

10/14

ФИГ. 4D

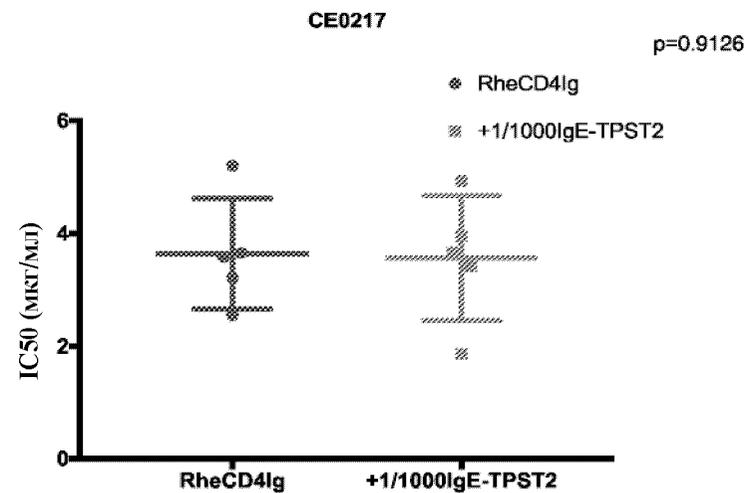
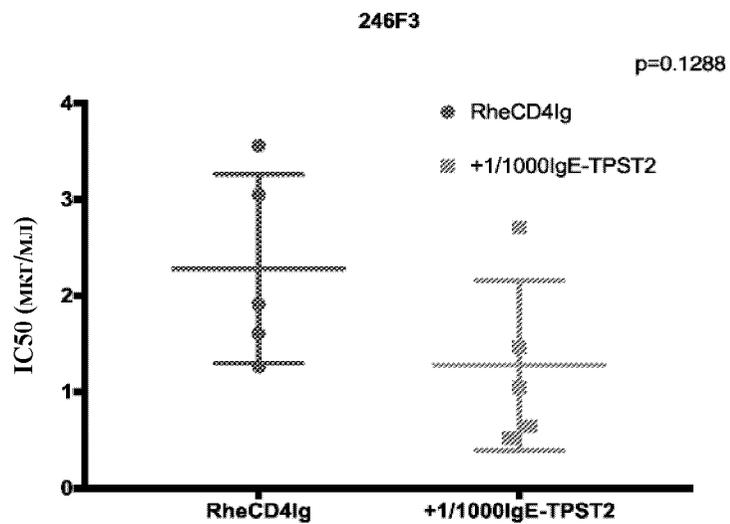
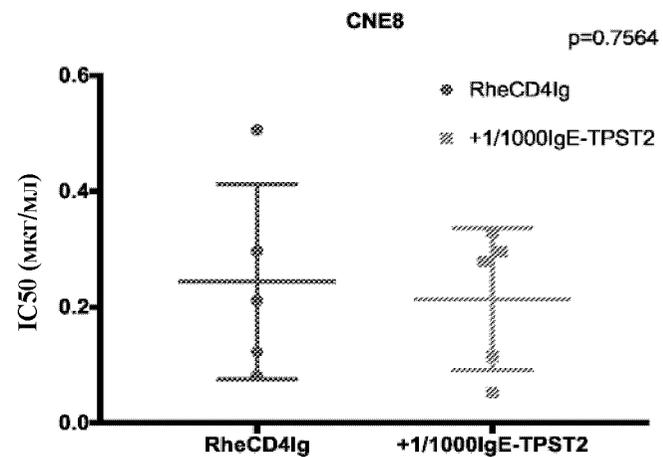
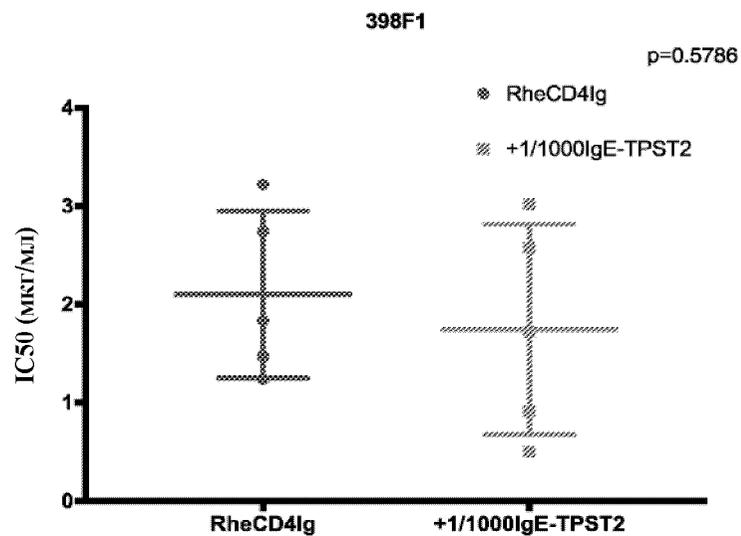
A



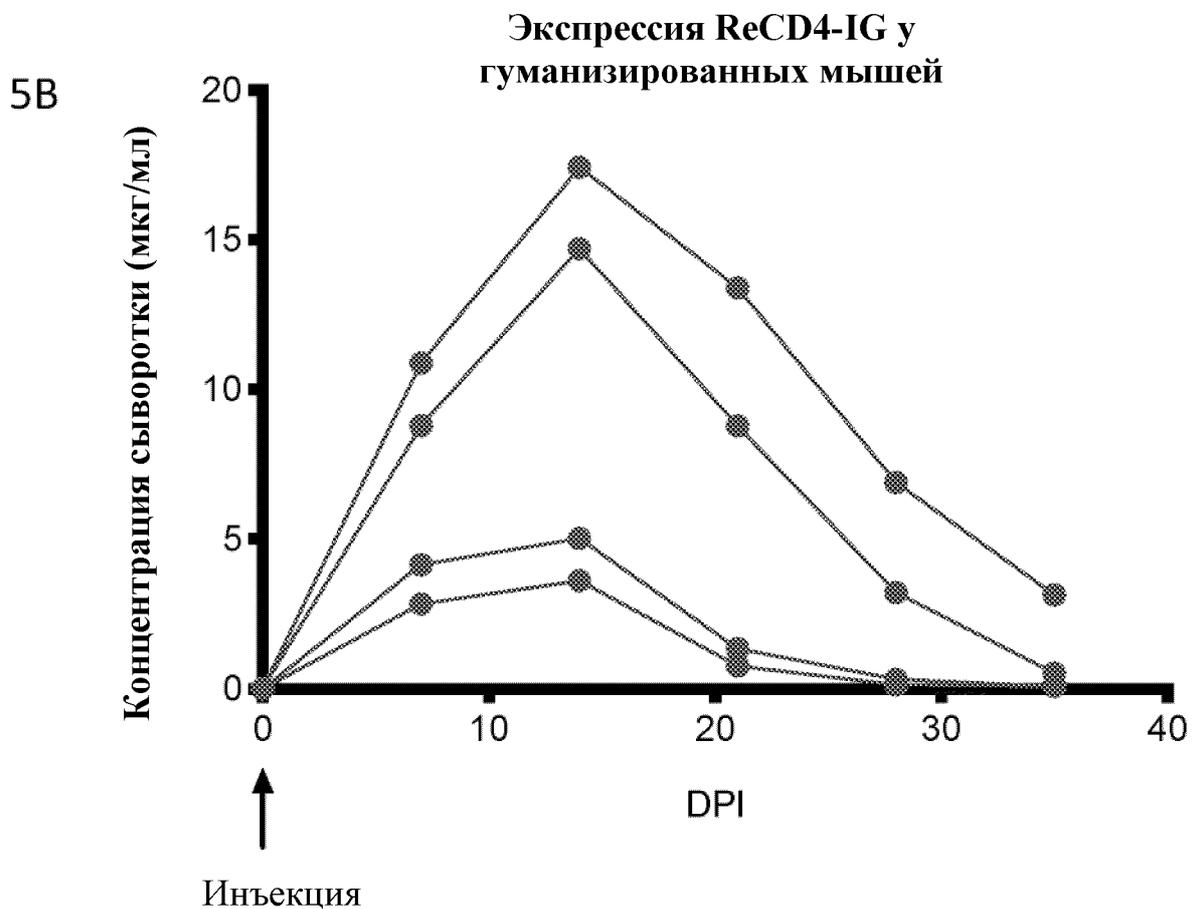
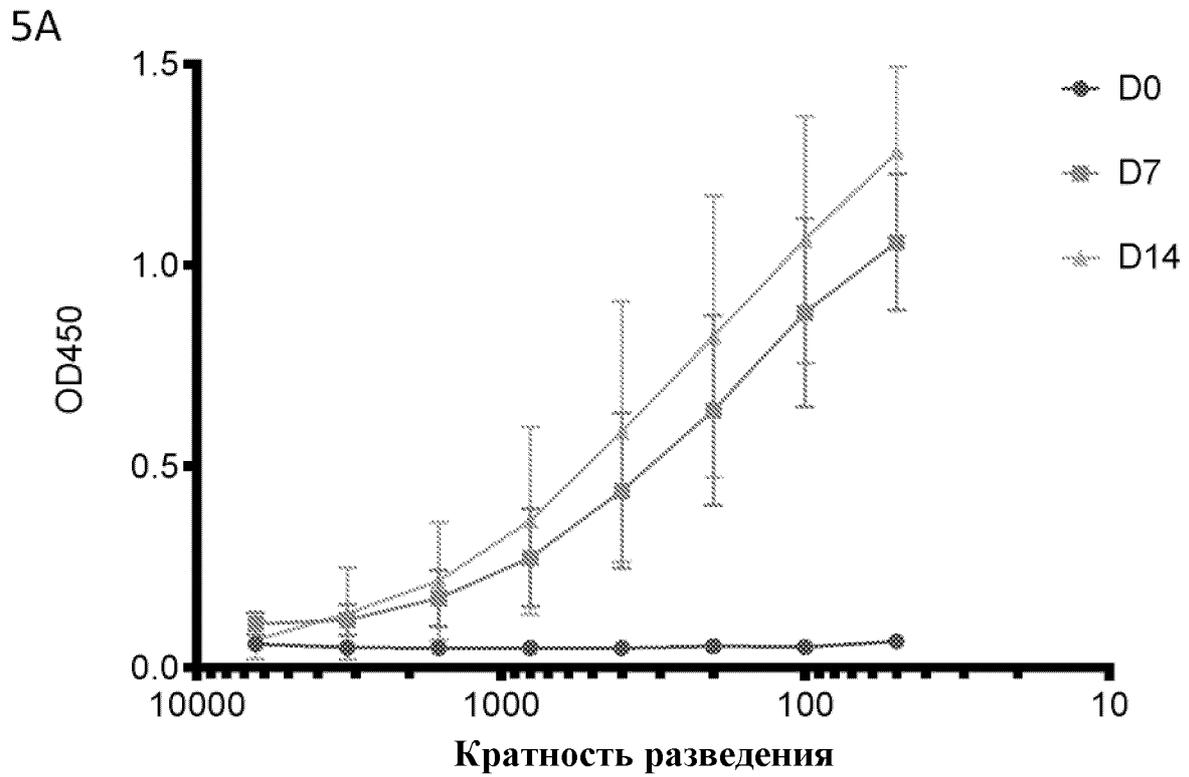
11/14

ФИГ. 4Е

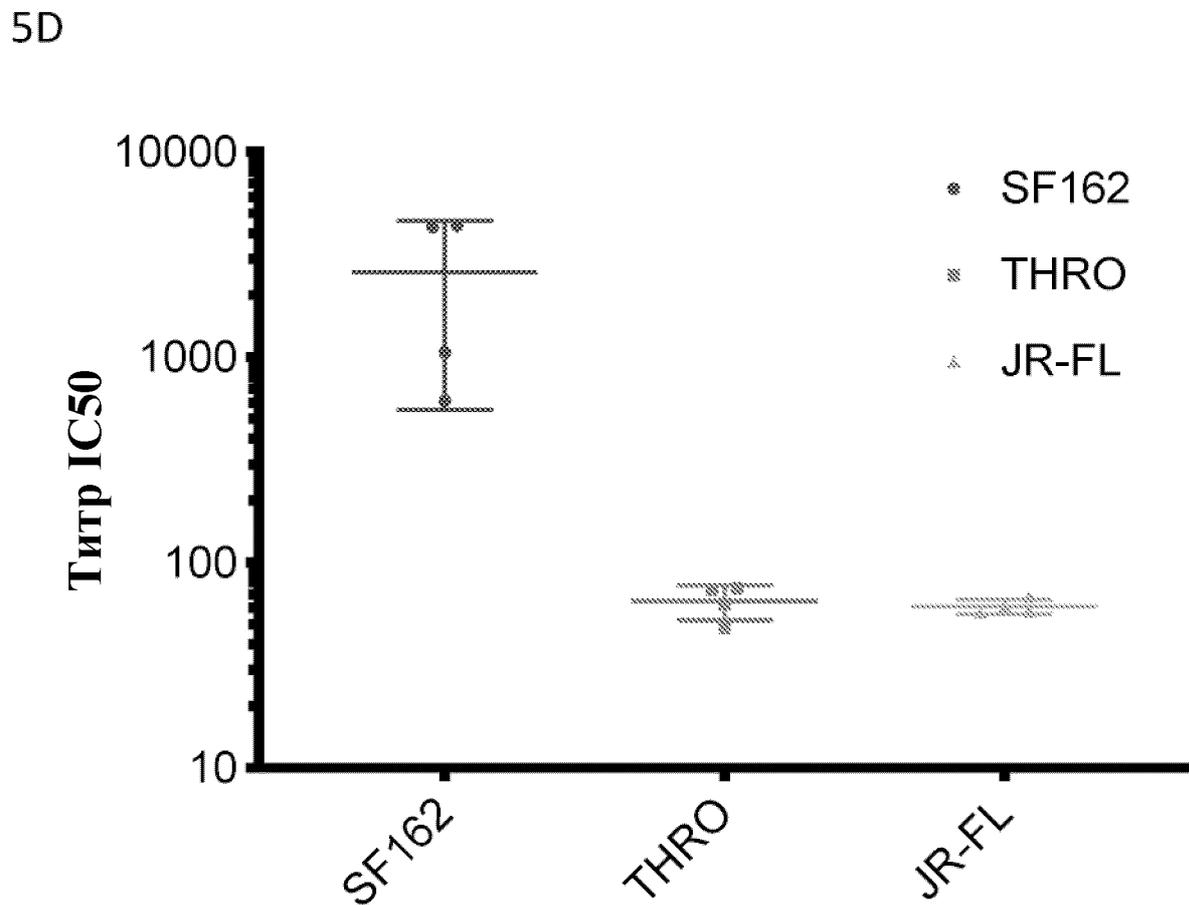
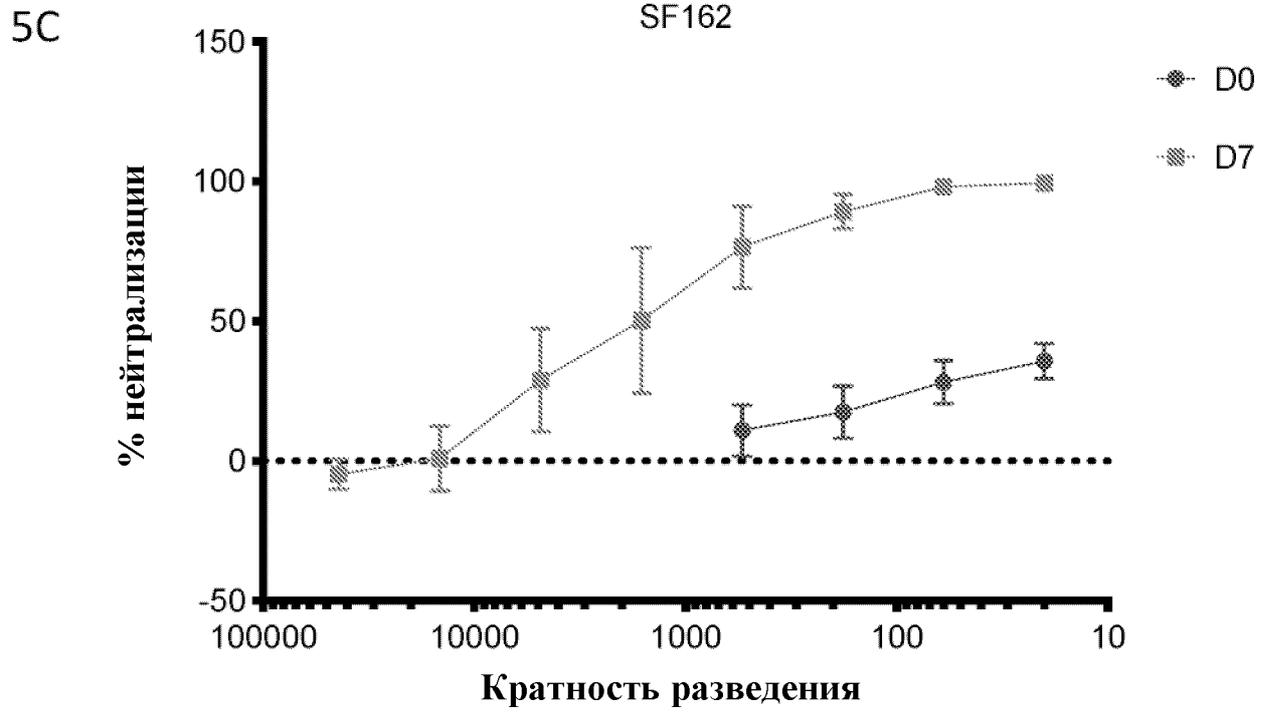
B



ФИГ. 4F



ФИГ. 5А - ФИГ. 5В



ФИГ. 5С - ФИГ. 5D