

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041088**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.09.12**

**(51)** Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201792500**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.05.12**

---

**(54) ААV-ОПОСРЕДОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГРИППА И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

---

**(31)** 62/161,192; 62/323,348

**(32)** 2015.05.13; 2016.04.15

**(33)** US

**(43)** 2018.04.30

**(86)** PCT/US2016/032063

**(87)** WO 2016/200543 2016.12.15

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

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

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

**(56)** V.S. ADAM ET AL.: "Adeno-Associated Virus 9-Mediated Airway Expression of Antibody Protects Old and Immunodeficient Mice against Influenza Virus", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 21, no. 11, 10 September 2014 (2014-09-10), pages 1528-1533, XP055314303, US, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00572-14, cited in the application, abstract, page 1528, right-hand column, paragraph 2, page 1529, left-hand column, paragraph 2, Results and Discussion

LIMBERIS M.P., ADAM V., WONG, G., JASON G., KOBASA D., ROSS T.M., KOBINGER G.P., TRETIAKOVA A., AND WILSON J.M.: "Intranasal antibody gene transfer in mice and ferrets elicits broad protection against pandemic influenza", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 5, no. 187, 187RA72, 29 May 2013 (2013-05-29), pages 1-8, XP002763465, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.3006299, cited in the application, abstract, Discussion

CORTI DAVIDE ET AL.: "A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 333, no. 6044, 12 August 2011 (2011-08-12), pages 850-856, XP002711146, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1205669, cited in the application, abstract, page 854, left-hand column, paragraph 2

CYRILLE DREYFUS ET AL.: "Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 337, no. 6100, 14 September 2012 (2012-09-14), pages 1343-1348, XP002693350, ISSN: 1095-9203, DOI: 10.1126/SCIENCE.1222908 [retrieved on 2012-08-09], cited in the application, abstract, figure 2  
US-A1-2010080813  
US-B2-8852595

---

**(57)** Представлены ААV векторы, экспрессирующие антитела против гриппа. Также описаны фармацевтические композиции, которые можно использовать для их доставки в профилактических или противовирусных целях. Представлены способы доставки таких векторов.

---

**B1**

**041088**

**041088**

**B1**

### **Поданные в электронной форме материалы, которые включены по ссылке**

Заявитель настоящим включает по ссылке материал со списком последовательностей, поданный в электронной форме с настоящим описанием. Этот файл имеет название "UPN\_15-7484PCT\_ST25.txt".

### **Положение об исследовании с федеральным финансированием**

Это изобретение выполнено отчасти с правительственной поддержкой по W911NF-13-2-0036, выданному в Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA). Правительство имеет определенные права на изобретение.

### **Предпосылки изобретения**

Инфекция гриппа является седьмой ведущей причиной смерти в США и насчитывает до 49000 смертей в год, значительную долю от почти 500000 смертей по всему миру [Prevention, C.f.D.C.a. Estimates of deaths associated with seasonal influenza: United States, 1976-2007. 2010; доступно в MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 59:1057-1062]. Экономическое бремя от ежегодных эпидемий гриппа оценивают порядка 87 миллиардов долларов США. Больше половины этой суммы составляет больничный уход, требуемый почти для 1 миллиона пациентов, из которых 70% являются пожилыми пациентами (в возрасте >65 лет) [Molinari, N.A., et al., Vaccine, 2007. 25(27), p. 5086-96]. Кроме того, индивидуумов с ослабленным иммунитетом, таких как пациенты с ВИЧ/СПИД, реципиенты трансплантированных органов или те, кто страдают от аутоиммунных заболеваний, относят к группам высокого риска гриппа, и они имеют повышенную восприимчивость к инфицированию, а также его осложнениям, которые включают смертельную пневмонию и острый респираторный дистресс синдром [Oliveira, E.C., et al., J. Intensive Care Med, 2003. 18(2), p. 80-91.]. Грипп является РНК-вирусом, который относится к семейству Orthomyxoviridae. Существует три рода вирусов гриппа: А [Medina, R.A. и A. Garcia-Sastre, Nat. Rev. Microbiol., 2011. 9(8), p. 590-603.], В [Paul Glezen, W., et al., Am. J. Public. Health, 2013. 103(3), p. e43-51] и С. Эти типы гриппа разделяют на основании антигенных различий между матриксными и ядерными белками. В США грипп А и В вызывает сезонные эпидемии в течение зимних месяцев. Неизвестно о том, чтобы грипп С вызывал эпидемии и был связан с легко текущими дыхательными заболеваниями.

Передача гриппа А или В от человека к человеку обычно происходит в результате распространения аэрозоля или мелких капель через чихание или кашель инфицированного субъекта. Вирус гриппа обычно попадает в носовые дыхательные пути. Там гемагглютинин (НА) связывается с рецепторами сиаловой кислоты, присутствующими на клетках эпителия дыхательных путей, и оболочка вируса сливается с мембраной клетки-хозяина. Впоследствии вирусная РНК попадает в цитозоль и в конечном итоге в ядро клетки-хозяина, где она реплицируется. После репликации вируса происходит лизис клетки-хозяина и высвобождение нескольких тысяч вирусов. Этот цикл продолжается, вирус реплицируется и в конечном итоге диссеминирует нижележащие дыхательные пути, где он вызывает тяжелое заболевание, которое может быть смертельным для определенных групп субъектов высокого риска [Medina, цитировано выше].

Хотя охват вакциной против гриппа в США возрос в последнее десятилетие, исследования показали низкий эффект сезонных вакцин против гриппа у пожилых пациентов и пациентов с ослабленным иммунитетом [Ljungman, P., Clin Microbiol Infect, 2012. 18 Suppl 5, p. 93-9]. Несколько аспектов вируса гриппа и иммунного ответа организма-хозяина человека на инфекцию гриппа стоят на пути к простому профилактическому лекарству. Ключевые мишени адаптивного иммунного ответа, такие как белок НА вируса, быстро меняются, делая ответ иммунологической памяти только частично защищающим от новых инфекций [Medina, цитировано выше]. Ответ человека на естественную инфекцию или вакцину против гриппа обычно ограничен в объеме, обеспечивая защиту только от близко родственных субтипов гриппа. Это привело к ежегодной вакцинации субъектов в возрасте от 6 месяцев и старше против сезонных штаммов вируса гриппа, появление которых прогнозируют во время предстоящего сезона.

Вирусы гриппа А могут инфицировать человека и различных других млекопитающих, включая свиней, лошадей, собак, а также птиц [Medina, цитировано выше]. Эти вирусы делят на два субтипа на основании структуры двух поверхностных белков гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). Известно 18 субтипов НА и 11 субтипов НА [CDC. Types of Influenza Viruses. 2014; доступно по адресу: <http://www.cdc.gov/flu/приблизительно/viruses/-types.htm>]. Грипп А связан с большими эпидемиями и пандемиями, в особенности с пандемией 1918 года, которая связана со значимой распространенностью болезни и гибелью. Эпидемический грипп, также известный как сезонный грипп, обычно не осложнен и остается ограниченным верхними дыхательными путями только человека [Molinari, цитировано выше; Glezen, цитировано выше]. Вирусная пневмония встречается редко, но популяции восприимчивых субъектов, включая беременных женщин, пожилых людей, пациентов с уже существующими сердечно-сосудистыми и легочными заболеваниями, считают группами высокого риска осложнений гриппа В. Обычно считают, что сезонный грипп ведет к легкому заболеванию.

Возникновение новой пандемии гриппа остается угрозой, которая может вести к существенной смертности и экономическим потерям по всему миру. Полагают, что репертуар иммунной памяти, возникающей от предыдущих инфекций гриппа и вакцинаций, помогает притуплять осложнения новой инфекции и увеличивает эффект вакцины. Это не относится к случаю, когда вирус гриппа, находящийся в животных резервуарах, приобретает тропизм к дыхательным путям человека и передается человеку

[Juno, J., et al., Clin. Dev. Immunol., 2012. 2012, p. 797180]. Эти зоонозные штаммы достаточно отличаются от тех, что обычно циркулируют в популяции человека, и могут вести к пандемиям с летальными последствиями, поскольку их неэффективно контролируют вакцины, разработанные для штаммов вируса человека [Juno, цитировано выше]. Как установлено во время пандемии H1N1 2009 года [Shapshak, P., et al., Diagn. Ther., 2011. 15(2), p. 63-81], время разработки вакцины недостаточно мало, чтобы обеспечивать вакцинацию популяции в ответ на возникающую пандемию. В отличие от эпидемии, пандемия гриппа происходит не часто, но может вести к значительной смертности. Пандемические вирусы гриппа возникают из генетического ассортимента между вирусами, не относящимися к человеку (т.е. птиц), и вирусам человека. Рекомбинация сегментов вирусов является ключевым механизмом для быстрого создания нового вируса. Эти события "антигенной изменчивости" вводят в популяцию человека иммунологически новый вирус гриппа, в котором нет уже существующего иммунитета. Две пандемии гриппа человека в прошлом веке связаны с генетическими линиями, которые возникли из рекомбинации сегментов генома с геномом не относящегося к человеку происхождения. Во время самой последней пандемии (2009) более молодые люди были непропорционально поражены заболеваниями нижних дыхательных путей, которые требовали госпитализации, относительно годов между пандемиями [Dawood, F.S., et al., Lancet Infect. Dis., 2012. 12(9), p. 687-95.].

Вакцины против гриппа не всегда эффективны при защите от гриппа. В начале 2013 года сообщалось о вспышке гриппа в вакцинированной популяции на тральщиках ВМС США из 102 молодых здоровых мужчин (в возрасте от 21 до 44 лет). Почти 25% этих вакцинированных субъектов имели симптомы гриппа, которые требовали медицинского ухода. ПЦР анализ указал на штамм гриппа H3N2, который имеет 99% гомологию со штаммами, циркулировавшими в сезоне гриппа 2013-2014 гг., которые схожи с антигенным компонентом H3N2 вакцины против гриппа 2013-2014 годов [T.L. Aquino, et al., Influenza Outbreak in a Vaccinated Population - USS Ardent, mmwr 63(42); 947-949 2014].

Появилось два моноклональных антитела в качестве кандидатов в профилактические средства против гриппа. Для гриппа А антитело FI6 [Oliveira, et al., цитировано выше], которое разработано группой Lanzavecchia [US 2010/0080813], и для гриппа В антитело CR8033 [Dreyfus, C., et al., Science, 2012. 337(6100), p. 1343-8; патент США 8852595], разработанное группами Wilson (The Scripps Research Institute) и Friesen (Crucell). Сообщалось, что FI6 высокоэффективно против нескольких штаммов гриппа А (включая пандемические штаммы А/H1N1/1918 и А/H1N1/2009) и имеет широкую сильную реактивность и нейтрализующий профиль для всех НА группы 1 и группы 2 [Corti, D., et al., Science, 2011. 333(6044), p. 850-6]. Важно, что показано, что эти антитела не создают ускользнувших мутантов, даже после нескольких последовательных пассажей [Oliveira, цитировано выше; Paul Glezen, цитировано выше]. Сообщалось о том, что, когда это антитело доставляли через вектор, оно защищало мышей и хорьков от летального инфицирования несколькими штаммами гриппа А [Limberis, M.P., et al., Sci. Transl. Med., 2013. 5(187), p. 187ra72; Limberis, M.P., et al., Clin. Vaccine Immunol., 2013. 20(12), p. 1836-7; Adam et al. Clin. Vaccine Immunol. 2014 Nov; 21(11):1528-33].

Существует одно универсальное антитело, CR9114 [Dreyfus, C. et al, Science, 2012, 337(6100), p. 1343-8], которое связывается как с вирусами гриппа А группы 1 и группы 2, так и вирусом гриппа В. Однако полезность этого антитела ограничивают относительно высокие концентрации антитела, необходимые для нейтрализации одного из различных штаммов гриппа А и В. IC<sub>50</sub> для вирусов группы 1 находится в диапазоне от 0,1 до 100 мкг/мл, причем только два штамма попадают между 0,1 и 1 мкг/мл, а оставшийся - между 1 и 100 мкг/мл. IC<sub>50</sub> для вирусов группы 2 еще менее благоприятен, причем только один штамм попадает ниже 1 мкг/мл [Dreyfus, цитировано выше]. Относительно высокие концентрации CR8071 необходимы для защиты *in vivo* от гриппа В, а субоптимальные дозы вели к более выраженной потере массы по сравнению с не иммунизированными мышами (фиг. S2 и возникновению ускользнувших мутантов после лишь 15 пассажей [Dreyfus, цитировано выше]. Другое антитело CR8020 к гриппу В вело к возникновению ускользнувших мутантов уже после четырех пассажей [Dreyfus, цитировано выше].

В настоящее время существует одна одобренная терапия (FluMist Quadrivalent), которую доставляют интраназально. Однако она не подходит для субъектов, которые имеют тяжелую аллергию на яйца, и субъектов, которым от 2 до 17 лет и которые принимают аспирин или медикаменты, содержащие аспирин [Shapiro R.J., S.K., et al. "The potential American market for generic biological treatments and the associated cost savings". 2008; доступно по адресу: [http://www.sonecon.com/docs/studies-/0208\\_Generic-BiologicsStudy.pdf](http://www.sonecon.com/docs/studies-/0208_Generic-BiologicsStudy.pdf)].

Аденоассоциированные вирусы (AAV) являются членами семейства Parvoviridae. Показано, что эти небольшие ДНК вирусы имеют существенные перспективы в качестве векторов для достижения стабильной экспрессии трансгена после доставки *in vivo*. AAV изначально обнаружены как контаминанты в лабораторных препаратах аденовируса [Melnick, J.L., et al., Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. J. Bacteriol., 1965. 90(1), p. 271-4]. Определение иммунологических характеристик этих изолятов указывает на существование шести серотипов AAV. Сероэпидемиологические исследования указывают на широкую экспозицию человека для различных серотипов AAV, причем больше 60% популяции демонстрирует Nab к большинству из шести серотипов AAV к возрасту в 10 лет [Calcedo, R., et al.,

J. Infect. Dis., 2009. 199(3), p. 381-90]. В начале 2000 гг. репертуар векторов AAV был расширен за счет выделения нескольких сотен новых вирусов AAV у человека и не являющихся человеком приматов [Gao, G., et al., J. Virol., 2004. 78(12), p. 6381-8]. Выделено больше чем 120 генотипов векторов AAV, включая исходные шесть серотипов от человека и NHP тканевых источников, они охарактеризованы филогенетически и организованы в шесть различных клад [Gao, G., et al., J. Virol., 2004. 78(12), p. 6381-8].

В данной области сохраняется потребность в терапии против гриппа, эффективной при терапевтическом и/или профилактическом использовании.

#### Сущность изобретения

В одном из аспектов изобретение относится к композиции, которую можно использовать для пассивной иммунизации против инфекции гриппа. Композиция содержит антитело против гриппа А, экспрессированное с AAV вектора, и антитело против гриппа В, экспрессированное со второго AAV вектора. В одном из вариантов осуществления первый не реплицирующийся рекомбинантный AAV имеет капсид AAV9 (rAAV9) и геном вектора, который содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (a) инвертированный концевой повтор AAV (ITR) (b) энхансер; (b) промотор бета-актина курицы; (c) интрон; (d) 5'-UTR; (e) лидерный пептид, функционально связанный с тяжелой цепью F16v3; (f) тяжелую варируемую цепь F16v3; (g) Fc-цепь IgG1 человека (CH2-3); (h) лидерный пептид, функционально связанный с легкой варируемой цепью каппа иммуноглобулина; (i) константную легкую цепь иммуноглобулина; (j) участок узнавания фурина; (k) линкер F2A; (l) сигнал полиаденилирования и (m) инвертированный концевой повтор AAV.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит второй не реплицирующийся rAAV9, который имеет геном вектора, который содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (a) инвертированный концевой повтор AAV (ITR) (b) энхансер; (b) промотор бета-актина курицы; (c) интрон; (d) 5'-UTR; (e) лидерный пептид, функционально связанный с тяжелой цепью CR8033; (f) тяжелую варируемую цепь CR8033; (g) Fc-цепь IgG1 человека (CH2-3); (h) лидерный пептид, функционально связанный с легкой варируемой цепью каппа иммуноглобулина; (i) кДНК константной легкой цепи; (j) участок узнавания фурина; (k) линкер F2A; (l) сигнал полиаденилирования и (m) инвертированный концевой повтор AAV, и водную жидкую суспензионную основу.

В другом аспекте представлен способ защиты пациента-человека от гриппа, который включает введение эффективного количества композиции против гриппа, как представлено в настоящем описании. Подходящим образом, пациенту вводят дозу в количестве приблизительно от  $1 \times 10^{10}$  приблизительно до  $3 \times 10^{13}$  копий генома. В определенных вариантах осуществления композицию вводят интраназально. В других вариантах осуществления композицию вводят внутримышечно или внутривенно.

В дополнительном аспекте предусмотрен продукт, который содержит контейнер, содержащий композицию против гриппа, как описано в настоящем документе, необязательный разбавитель и инструкции для введения.

В еще одном дополнительном аспекте изобретение относится к способу предотвращения гриппа, который включает введение вектора, экспрессирующего синтетическое антитело против гриппа, как раскрыто в настоящем описании. Такая терапия может быть в комбинации с другими векторами, экспрессирующими различные антитела, или другими противовирусными композициями.

Необязательно, способ можно использовать в качестве вакцины, т.е. перед воздействием гриппа.

Другие аспекты и преимущества изобретения легко видны из следующего подробного описания изобретения.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1А, 1В приведено схематическое представление компонентов вектора GTP101.

На фиг. 1А приведено схематическое представление mAb AAV-FI6.

На фиг. 1В приведено представление mAb AAV-CR8033.

На фиг. 2 представлена потоковая диаграмма с обзором производственного процесса.

На фиг. 3А и 3В приведено определение минимальной эффективной дозы (MED) AAV2/9.CB7.FI6, которая необходима для защиты от заражения с использованием PR8.

Фиг. 3А представлены массы мышей, которых лечили интраназально (IN или i.n.) с использованием варьирующих доз AAV2/9.CB7.FI6 после заражения с использованием  $5 LD_{50}$  PR8.

Фиг. 3В представлена выживаемость зараженных мышей. Мышей умерщвляли, когда они, по видимому, находились в дистрессе или их масса тела снижалась  $>30\%$ .

На фиг. 4А и 4В представлено определение экспрессии FI6 в легких (BALF) и на назальных (NLF) поверхностях. Мышам давали IN различные дозы AAV2/9.CB7.FI6 и оценивали уровень экспрессируемого антитела в поверхностной жидкости, выстилающей легкие и нос, которую собирали при некропсии.

На фиг. 4А представлены результаты для экспрессии FI6 в BALF.

На фиг. 4В представлены результаты для экспрессии FI6 в NLF поверхностях.

На фиг. 5 представлено количественное определение вирусной нагрузки в легких наивных мышей и мышей, вакцинированных с использованием AAV2/9.CB7.FI6. Трех мышей из невакцинированной (наивной) и вакцинированной AAV2/9.CB7.FI6 групп вскрывали в сутки 6 для того, чтобы количественно

определять вирусную нагрузку в легких.

На фиг. 6А и 6В представлено быстрое начало защиты от заражения гриппом.  $1 \times 10^{11}$  к.г. (копий генома) AAV2/9.CB7.FI6 доставляли IN мышам BALB/c и через 8 ч мышей заражали с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8.

На фиг. 6А представлены массы мышей после заражения в сутки 0.

На фиг. 6В представлена выживаемость зараженных мышей. Мышей умерщвляли, когда, по-видимому, они находились в дистрессе или их масса тела снижалась >30%.

На фиг. 7А и 7В представлено определение MED для AAV2/9.CB7.CR8033, которая необходима для защиты от заражения с использованием В/Lee/40.

На фиг. 7А представлены массы мышей, которых предварительно лечили IN варьирующими дозами AAV2/9.CB7.CR8033, после заражения с использованием 5 LD<sub>50</sub> В/Lee/40.

На фиг. 7В представлена выживаемость зараженных мышей. Мышей умерщвляли, когда, по-видимому, они находились в дистрессе или их масса тела снижалась  $\geq 30\%$ .

На фиг. 8 представлен эффект смешивания двух AAV векторов, оказываемый на защиту от заражения гриппом А (PR8). Мышам дозировали или  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 (треугольники) или смесь  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9. CB7.CR8033 (квадраты). Мышей заражали через 14 суток с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8 (грипп А). Мышей умерщвляли, когда, по-видимому, они находились в дистрессе или их масса тела снижалась  $\geq 30\%$ .

На фиг. 9 представлен эффект смешивания двух AAV векторов, оказываемый на защиту от заражения гриппом В. Мышам дозировали или  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 (треугольники) или смесь  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 (квадраты). Мышей заражали через 14 суток с использованием 5 LD<sub>50</sub> В/Lee/40 (грипп В). Мышей умерщвляли, когда, по-видимому, они находились в дистрессе или их масса тела снижалась  $\geq 30\%$ .

На фиг. 10 представлены уровни циркулирующих в сыворотке AAV2/9-специфичных NAb. Мышам интраназально (i.n.) вводили AAV2/9 вектор в дозах в диапазоне от  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{11}$  к.г./мышь и анализировали AAV2/9 нейтрализующее антитело в сыворотке в сутки 28 после доставки AAV2/9.

На фиг. 11А-11Г представлена опосредованная вектором профилактика заражения гриппом А (PR8). Самкам мышей BALB/c в возрасте 6 недель (n=5/группа) давали i.n. смесь  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 в общем объеме 50 мкл PBS. Вектор приготавливали в трех различных растворах: PBS-pH 6,8, PBS-pH 7,2 или PBS-pH 7,4. Мышей заражали с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8 через 7 суток после введения вектора. Массы животных регистрировали ежедневно и мышей умерщвляли, когда, по-видимому, они находились в дистрессе или когда они теряли  $\leq 30\%$  от их массы тела до заражения. Мышам давали i.n.  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9. CB7.FI6 в PBS-pH 6,8 (фиг. 11А), PBS-pH 7,2 (фиг. 11D или PBS-pH 7,4 (фиг. 11G), и заражали их с использованием PR8 через 7 суток.

На фиг. 11А, 11D и 11G представлены массы мышей с течением времени; черные круги представляют мышей, которые получали вектор через пипетку (доставка жидкости), темно-серые квадраты представляют мышей, которые получали вектор, который обрабатывали через IMAD, и светло-серые треугольники представляют мышей, которые не получали вектор (наивные мыши) и служили в качестве контролей для заражения PR8. Наивных мышей умерщвляли в сутки 8 из-за сильной потери массы. В конце эксперимента (сутки 21) выживших умерщвляли, собирали BALF для оценки экспрессии антител и легкие обрабатывали для количественного определения геномов AAV9 посредством Taqman ПЦР.

На фиг. 11В, 11Е и 11Н представлена экспрессия антител с помощью ELISA белка А, которую количественно определяли в BALF мышей, получавших смесь из  $1 \times 10^9$  к.г. каждого из AAV2/9.CB7.CR8033 и AAV2/9.CB7.FI6, приготовленного в PBS-pH 6,8, PBS-pH 7,2 и PBS-pH 7,4 соответственно. Результаты представлены в нг/мл для устройства (IMAD) и контроля с пипеткой (жидкость).

На фиг. 11С, 11F и 11I представлены AAV9 геномы, которые определяли количественно с помощью Taqman ПЦР в легких мышей, которые получали смесь из  $1 \times 10^9$  к.г. каждого из AAV2/9.CB7.CR8033 и AAV2/9.CB7.FI6, приготовленного в PBS-pH 6,8, PBS-pH 7,2 и PBS-pH 7,4 соответственно.

На фиг. 12А-12G представлена опосредованная вектором профилактика заражения с использованием PR8 и вируса гриппа В (В/Lee/40). Самкам мышей BALB/c в возрасте 6 недель (n=5/группа) давали i.n. смесь  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 в общем объеме 50 мкл PBS. Вектор приготавливали в PBS-pH 7,4. Мышей заражали с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8 (фиг. 12А) или вируса В/Lee/40 (фиг. 12D) через 7 суток. Массы животных регистрировали ежедневно и мышей умерщвляли, когда, по-видимому, они находились в дистрессе или когда они теряли  $\leq 30\%$  их массы тела до заражения. Представлены массы мышей, зараженных с использованием PR8 (фиг. 12А) или В/Lee/40 (фиг. 12D) с течением времени; черные круги представляют мышей, которые получали вектор через пипетку (доставка жидкости), темно-серые квадраты представляют мышей, которые получали вектор, который обрабатывали через IMAD, и светло-серые треугольники представляют мышей, которые не получали вектор (наивные мыши) и служили в качестве контролей для заражения PR8. За исключением одной выжившей,

наивной мыши 4 из 5 умерщвляли в сутки 8. В конце эксперимента (сутки 21) выживших умерщвляли, собирали BALF для оценки экспрессии антител и легкие обрабатывали для количественного определения AAV9 геномов посредством Taqman ПЦР.

На фиг. 12B представлена экспрессия антител по ELISA белка А, которую количественно определяли в BALF.

На фиг. 12C представлены AAV9 геномы, присутствующие в легких, которые количественно определяли посредством Taqman ПЦР у мышей, получавших смесь из  $10^9$  к.г. каждого из AAV2/9.CB7.CR8033 и AAV2/9.CB7.FI6, приготовленного в PBS-pH 7,4, и зараженных с использованием PR8.

На фиг. 12E представлена экспрессия антител в BALF, которую количественно определяли с помощью ELISA белка А, и на фиг. 12F представлены AAV9 геномы, присутствующие в легких, которые количественно определяли посредством Taqman ПЦР у мышей, получавших смесь из  $1 \times 10^9$  к.г. каждого из AAV2/9.CB7.CR8033 и AAV2/9.CB7.FI6, приготовленного в PBS-pH 7,4, и зараженных с использованием V/Lee/40.

На фиг. 12G представлено количество суспензии вектора (0,5 мл), пропущенной через IMAD для того, чтобы оценивать физическую потерю раствора вектора. Как показано, наблюдали физическую потерю жидкости 4-6,6% от начального объема, когда раствор вектора пропускали через IMAD.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем описании представлена композиция, которая представляет собой продукт лекарственного средства из двух частей, состоящий из двух не реплицирующихся рекомбинантных аденоассоциированных вирусных (AAV) векторов серотипа 9, которые экспрессируют рекомбинантные антитела, которые обеспечивают пассивную иммунизацию против гриппа А и грипп В соответственно.

Композиция, представленная в настоящем описании, имеет несколько преимуществ относительно доступных в настоящее время вакцин против гриппа. Конструкции антител против гриппа А и против гриппа В, совместно экспрессируемые *in vivo*, обеспечивают пассивную иммунизацию против инфекции гриппа А и гриппа В. Другими словами, в отличие от традиционной вакцины, в которой доставляют антиген гриппа и которая полагается на иммунную систему пациента для того, чтобы индуцировать иммунный ответ и генерировать антитела, композиция, представленная в настоящем описании, доставляет антитела против гриппа пациенту. Таким образом, вакцину можно использовать для пациентов, у которых иммунная система не способна генерировать удовлетворительный защитный иммунный ответ после иммунизации антигеном гриппа. Кроме того, композиция, представленная в настоящем описании, может обеспечивать более быстрое начало защиты после введения, чем подход с вакциной на основе антигена.

Другие преимущества включают тот факт, что композицию можно доставлять интраназально; таким образом, подход является минимально инвазивным и не связан с риском легкой инфекции или другими побочными эффектами, связанными с доставкой существующих интраназальных вакцин, содержащих аттенуированный вирус. Еще одно преимущество состоит в том, что композицию можно использовать для пациентов, которые имеют аллергию на яйца.

Также композиция не противопоказана пациентам, принимающим аспирин или медикаменты, содержащие аспирин. Кроме того, гAAV композиции, представленные в настоящем описании, по существу снижают число повторных парентеральных введений, которые необходимы, чтобы белковые терапевтические средства были эффективными. В определенных вариантах осуществления повторное введение необходимо только приблизительно 1 раз в год и сводится к доставке в клетки эпителия носа. В соответствии с еще одним другим преимуществом композиции, представленные в настоящем описании, можно получать в более узких временных рамках, чем многие традиционные вакцины против гриппа на основе вирусов. Таким образом, композиция по изобретению относится к более практичному способу защиты популяции, находящейся в группе риска.

В определенных вариантах осуществления векторы, представленные в настоящем описании, экспрессируют эффективные уровни функционального антитела при доставке интраназально в дозе приблизительно 3 мл или меньше, 2 мл или меньше или 1 мл или меньше, 0,5 мл, или меньше, например, в диапазоне приблизительно от 100 до 250 мкл. В целом, композиции приготавливают при pH приблизительно от 5,5 приблизительно до 8,5, от 6 до 8, или от 6,5 до 7,5, или 6,8, 7,2 или 7,4. Таким образом, векторы, представленные в настоящем описании, высокоэффективны для представления терапевтических уровней антитела в дозах, которые удобны для отмеренных доз, или в продуктах или наборах, содержащих предварительно измеренные дозы. В определенных вариантах осуществления композиции приготавливают для интраназальной доставки таким образом, что объем и размер капельки спрея предпочтительно направлены на клетки интраназального эпителия. Показано, что экспрессия в носовом эпителии придает защитный пассивный иммунитет. Композиции также можно приготавливать для интраназальной доставки, которая направлена в легкие. Нацеливание в легкие может идти в дополнение к носовому эпителию или предпочтительнее, чем в носовой эпителий, например, посредством корректировки объема и/или размера капельки, доставляемой интраназально. По сравнению со стандартной вакциной против гриппа, доставляемой внутримышечно, AAV, доставляемый интраназально, ведет к более быстрому началу экспрессии Ab (в пределах часов или пары суток). Однако в определенных вариантах осуществления компо-

зиции, описанные в настоящем документе можно приготавливать для доставки через другие пути, такие как внутримышечная инъекция, внутривенная инъекция или другие подходящие пути. В таких случаях подходящие составы и объемы может определять специалист в данной области.

Конструкции антител.

В определенных вариантах осуществления композиция, представленная в настоящем описании, составляет два антитела к гриппу, которые экспрессируются в клетке *in vivo* через не реплицирующийся вирусный вектор и секретируются из нее для обеспечения защитного иммунитета. Как проиллюстрировано в примерах в настоящем описании, вирусный вектор представляет собой гAAV и композиция содержит два различных гAAV исходных раствора, каждый из которых содержит отличающийся геном вектора. В первом исходном растворе геном вектора содержит кодирующие последовательности для антитела к гриппу А. Во втором исходном растворе геном вектора содержит кодирующие последовательности для антитела к гриппу В.

Антитело к гриппу А представляет собой синтетическую конструкцию F16. См., например, в публикации патента США № 2010/0080813 аминокислотные последовательности тяжелой цепи, вариательной цепи легкой цепи, вариательных областей и определяющих комплементарность областей F16v3. Также см. патент США 8124092. В определенных вариантах осуществления конструируют экспрессирующую F16v3 кассету, которая кодирует F16 легкие вариательные области F16 (номера доступа Genbank PDB: AEL31310.1, GI: 342674599 и 342674581), сцепленные с константными (CH1, CH2 и CH3) доменами IgG1 человека, и каппа последовательности легкой цепи зародышевой линии, сцепленные с CL доменом человека, создавая архитектуру моноклонального антитела. В другом варианте осуществления экспрессирующая F16 кассета содержит полноразмерную тяжелую цепь F16v3 (см. н. 2440-2760 (CH1), н. 2761-3426 (CH2-CH3) в SEQ ID NO: 1). кДНК, кодирующая иллюстративную легкую цепь, предусмотрена в н. 3511-3909 в SEQ ID NO: 1. (лидерные н. 3511-3510, н. 3571-3909 цепи каппа) В другом варианте осуществления синтетическая конструкция F16 содержит, как минимум, вариательную область тяжелой цепи F16v3, константные области тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3) и легкую цепь иммуноглобулина.

В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домены иммуноглобулина, которые составляют антитело против гриппа А, разрабатывают для экспрессии в клетках человека. Такие последовательности могут включать, например, вариательную область тяжелой цепи F16v3 (н. 2053-2439 в SEQ ID NO: 1) и константные области CH2 и CH3 (н. 2761-3426 в SEQ ID NO: 1). Однако другие кодирующие последовательности для аминокислотных последовательностей F16v3, представленных в настоящем описании, можно конструировать, и они находятся в объеме данного изобретения. См., например, другие последовательности, кодирующие вариательную область тяжелой цепи (например, аминокислоты из SEQ ID NO: 2), CH1 (например, аминокислоты из SEQ ID NO: 3) и/или CH2-CH3 (например, аминокислоты из SEQ ID NO: 4). Также см. SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23.

В определенных вариантах осуществления "вариательная" легкая цепь представляет собой цепь каппа, полученную из источника зародышевой линии. Например, в примерах, приведенных в настоящем описании, используют ген зародышевой линии Icl|IGKV4-1\*01 [*Homo sapiens*] (см., например, н. 3571-3909 в SEQ ID NO: 1 или н. 3265-3606 в SEQ ID NO: 8). Необязательно, можно выбирать другую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность легкой цепи каппа (SEQ ID NO: 5) и/или константной легкой цепи (SEQ ID NO: 7). В другой альтернативе можно выбирать другую подходящую последовательность зародышевой линии. В другом варианте осуществления легкая цепь представляет собой цепь лямбда. Предпочтительно последовательность зародышевой линии, которая не изменяет антигенную специфичность партнера тяжелой цепи, выбирают в качестве источника легкой цепи. Источники таких последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии представлены, например, в базе данных Kabat, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) и <http://www.imgt.org/genedb/table?mode=3d&selectGenes=IGKV4-1&selectSpecies=Homo%20sapiens>.

Антитело к гриппу В представляет собой синтетическое антитело CR8033. См., например, в патенте США 8852595 аминокислотные последовательности тяжелой цепи CR8033, легкой цепи, вариательных областей и определяющих комплементарность областей. Антитело имеет тяжелую цепь, которая представляет собой сконструированную последовательность, полученную из антитела CR8033 против гриппа. В одном из вариантов осуществления сконструированное антитело, представленное в настоящем описании, содержит вариательную тяжелую цепь с оптимизацией кодонов (например, н. 1753-2133 в SEQ ID NO: 8), CH1 (например, н. 2134-2454 в SEQ ID NO: 8) и CH2-CH3 (например, н. 2455-3120 в SEQ ID NO: 8). В определенных вариантах осуществления можно не использовать область CH1. В других вариантах осуществления можно выбирать различные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариательную область тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 9), CH1 (например, SEQ ID NO: 10) и/или CH2-3 (например, SEQ ID NO: 11).

В других вариантах осуществления легкие цепи можно получать из антитела F16. См., например, Corti et al., *Science*, 2011 Aug 12; 333 (6044):860-6, Epub 2011 Jul 28.

В определенных вариантах осуществления синтетическую конструкцию антитела F16, представленную в настоящем описании, можно экспрессировать *in vitro* и использовать, например, в белковой

терапии или для создания антиидиотипических антител. Эта конструкция антитела состоит, как минимум, из комбинации тяжелой цепи F16 с легкой цепью из источника зародышевой линии.

В других вариантах осуществления конструкцию синтетического антитела CR8033, представленную в настоящем описании, можно экспрессировать *in vitro* и использовать, например, в белковой терапии или для генерации антиидиотипических антител. Эта конструкция антитела состоит, как минимум, из тяжелой цепи CR8033 в комбинации с легкой цепью из источника зародышевой линии.

Такие способы экспрессии и использование известны в данной области.

Геномы векторов.

Для того чтобы экспрессировать выбранный домен иммуноглобулина, можно разрабатывать молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит кодоны, которые выбраны для оптимальной экспрессии полипептидов иммуноглобулинов у выбранного вида млекопитающего, например, человека. Кроме того, молекула нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную лидерную последовательность для каждой тяжелой цепи и легкой цепи выбранного антитела, которая кодирует сигнальный лидерный пептид IL-2, слитый выше по направлению считывания от полипептидов тяжелой и цепи, состоящих из переменных и константных областей. Однако другую гетерологичную лидерную последовательность можно использовать вместо одного или обоих из сигнального/лидерного пептидов IL-2. Сигнальный/лидерный пептиды могут представлять собой одно и то же или различное для каждой тяжелой цепи и легкой цепи конструкции иммуноглобулина. Они могут представлять собой сигнальные последовательности, которые нативно встречаются в иммуноглобулине (например, IgG), или могут быть из гетерологичного источника. Такие гетерологичные источники могут представлять собой секреторные сигнальные пептиды цитокина (например, IL-2, IL-12, IL-18 или т.п.), инсулина, альбумина,  $\beta$ -глюкуронидазы, щелочной протеазы или фибронектина или последовательности из тканеспецифических секреторируемых белков, среди прочего.

Как используют в настоящем описании, "экспрессирующая кассета" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит по меньшей мере первую открытую рамку считывания (ORF) и необязательно вторую ORF. ORF может содержать два, три или четыре домена антитела. Например, ORF может содержать полноразмерную тяжелую цепь. Альтернативно, ORF может содержать один или два домена антитела. Например, ORF может содержать переменный домен тяжелой цепи и один константный домен тяжелой цепи. В другом примере ORF может содержать переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Таким образом, экспрессирующую кассету можно разрабатывать как бицистронную, т.е. содержащую регуляторные последовательности, которые управляют экспрессией открытых рамок считывания в ней с общих регуляторных последовательностей. В этом случае две ORF обычно разделяют линкером. Подходящие линкеры, такие как внутренний сайт связывания рибозима (IRES) и/или саморасщепляющийся пептидный линкер фурина-2а (F2a) [см., например, Radcliffe and Mitrophanous, *Gene Therapy* (2004), 11, 1673-1674], известны в данной области. Подходящим образом ORF функционально связывают с регуляторными управляющими последовательностями, которые управляют экспрессией в клетке-мишени. Такие регуляторные управляющие последовательности могут включать поли-А, промотор и энхансер. Для того чтобы содействовать совместной экспрессии с AAV вектора, первая и вторая экспрессирующие кассеты могут совместно использовать по меньшей мере один энхансер и/или последовательность поли-А.

В одном из вариантов осуществления gAAV упаковывают в выбранный капсид AAV, молекула нуклеиновой кислоты содержит экспрессирующую кассету, содержащую: последовательность 5' инвертированного концевой повтора AAV (ITR), промотор, 5'-UTR, необязательную последовательность Козака, первый сигнальный пептид, функционально связанный с первой цепью иммуноглобулина, содержащей тяжелую цепь, последовательность линкера, второй сигнальный пептид, функционально связанный со второй цепью иммуноглобулина, и 3' AAV ITR, где один из и второй иммуноглобулин представляют собой легкую цепь иммуноглобулина, где указанная экспрессирующая кассета совместно экспрессирует цепи иммуноглобулина в клетке-хозяине в условиях, которые позволяют цепям собираться в конструкцию функционального антитела, обладающего специфичностью антитела, с учетом тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь представляет собой синтетическую тяжелую цепь иммуноглобулина F16v3 против гриппа и легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа из зародышевой линии.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующая кассета содержит AAV ITR из источника, отличного от капсида AAV, чтобы формировать псевдотипированный AAV. В одном из вариантов осуществления экспрессирующая кассета дополнительно содержит конститутивный промотор и RGB поли-А. Можно выбирать другие подходящие элементы вектора, такие как промоторы и последовательности поли-А. Например, минимальный промотор и/или минимальный поли-А можно выбирать для того, чтобы экономить пространство. Обычно в этом варианте осуществления каждый промотор располагают смежно (слева или справа (или 5' или 3')) с энхансерной последовательностью и последовательности поли-А располагают смежно с ITR, с ORF между ними. Хотя предпочтительно экспрессировать последовательности тяжелых цепей первыми, порядок ORF можно варьировать, как позволяют домены иммуноглобулинов, кодируемые ими. Например, константные и переменные последовательности легкой цепи

можно располагать слева от энхансера, а тяжелую цепь могут кодировать ORF, расположенные справа от энхансера. Альтернативно, тяжелую цепь можно располагать слева от энхансера, а ORF справа от энхансера, чтобы кодировать легкую цепь. Альтернативно, возможна противоположная конфигурация.

В другом варианте осуществления гAAV упакован в выбранный капсид AAV, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность 5' инвертированного концевой повтора AAV (ITR), промотор, 5'-UTR, необязательную последовательность Козака, сигнальный пептид IL-2, функционально связанный с тяжелой цепью иммуноглобулина F16, F2a, сигнальный пептид IL-2, функционально связанный с легкой цепью каппа зародышевой линии, и 3' AAV ITR. В одном из вариантов осуществления капсид AAV представляет собой AAV9 или AAV8. В дополнительном варианте осуществления ITR из AAV2 или другого источника, который отличается от источника капсида AAV.

Подходящие регуляторные управляющие последовательности можно выбирать и получать из различных источников. В одном из вариантов осуществления минимальный промотор и/или минимальный поли-А можно использовать для сохранения размера.

Как используют в настоящем описании, термин "минимальный промотор" обозначает короткую последовательность ДНК, состоящую из ТАТА-бокса, и другие последовательности, которые служат для точного указания места инициации транскрипции, к которому добавляются регуляторные элементы для контроля экспрессии. В одном из вариантов осуществления промотор относится к нуклеотидной последовательности, которая содержит минимальный промотор плюс регуляторные элементы, которые способны управлять экспрессией кодирующей последовательности или функциональной РНК. Этот тип промоторной последовательности состоит из проксимальных и более дистальных элементов выше по направлению считывания, последние элементы часто обозначают как энхансеры. В одном из вариантов осуществления минимальный промотор представляет собой минимальный промотор цитомегаловируса (CMV). В другом варианте осуществления минимальный промотор извлекают из CMV человека (hCMV), например, минимальный промотор, полученный из предраннего промотора hCMV (см. US 20140127749 и Gossen and Vujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:5547-5551), которые включены в настоящее описание посредством ссылки). В другом варианте осуществления минимальный промотор извлекают из вирусного источника, такого как, например, ранние или поздние промоторы SV40, предранние промоторы цитомегаловируса (CMV) или ранние промоторы вируса саркомы Пауса (RSV); или из промоторов эукариотических клеток, например промотор бета-актина (Ng, Nuc. Acid Res. 17:601-615, 1989; Quitsche et al., J. Biol. Chem. 264:9539-9545, 1989), промотор GADPH (Alexander, M. C. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096, 1988, Ercolani, L. et al., J. Biol. Chem. 263:15335-15341, 1988), промотор ТК-1 (тимидинкиназы), промоторы HSP (белка теплового шока), промотор UbB или UbC, PGK, промотор Efl- $\alpha$  или какой-либо эукариотический промотор, содержащий ТАТА-бокс (опубликованная заявка США № 2014/0094392). В другом варианте осуществления минимальный промотор содержит мини-промотор, такой как мини-промотор CLDN5, описанный в опубликованной заявке США № 2014/0065666. В другом варианте осуществления минимальный промотор представляет собой промотор тимидинкиназы (ТК). В одном из вариантов осуществления минимальный промотор является тканеспецифическим, таким как один из специфичных промоторов мышечных клеток минимальный промотор TnISlow, минимальный промотор TnIFast или промотор креатинкиназы мышцы (опубликованная заявка США № 2012/0282695). Каждый из этих документов включен в настоящее описание посредством ссылки.

Рекомбинантный AAV вектор (AAV вирусная частица) может содержать упакованную в капсид AAV молекулу нуклеиновой кислоты, экспрессирующую функциональное антитело, как описано в этом документе. Экспрессирующая кассета может содержать регуляторные элементы для открытой рамки(рамок) считывания в каждой экспрессирующей кассете и молекула нуклеиновой кислоты может обязательно содержать дополнительные регуляторные элементы.

AAV вектор может содержать полноразмерный 5' инвертированный концевой повтор (ITR) и полноразмерный 3'-ITR AAV. Описана укороченная версия 5'-ITR, называемая AITR, в которой удалены D-последовательность и сайт концевой разрешения (trs). Сокращение "sc" относится к самокомплементарному. "Самокомплементарный AAV" относится к конструкции, в которой кодирующая область, которую несет рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты AAV, разработана для того, чтобы формировать внутримолекулярную двухцепочечную ДНК-матрицу. При инфекции, вместо того, чтобы ожидать опосредованного клеткой синтеза второй цепи, две комплементарные половины scAAV объединяются для того, чтобы формировать один блок двухцепочечной ДНК (дцДНК), который готов для немедленной репликации и транскрипции. См., например, D.M. McCarty et al., "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), vol. 8, 16 Nov., p. 1248-1254. Самокомплементарные AAV описаны, например, в патентах США № 6596535; 7125717 и 7456683, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Когда нужно получить псевдотипированный AAV, ITR выбирают из источника, который отличается от источника капсида AAV. Например, ITR AAV2 можно выбирать для использования с капсидом AAV, обладающим конкретной эффективностью к выбранному клеточному рецептору, целевой ткани

или вирусной мишени. В одном из вариантов осуществления последовательности ITR из AAV2 или ее версию с делецией (A<sub>1</sub>ITR) используют для удобства и ускорения разрешения контролирующего органа. Однако можно выбирать ITR из других источников AAV. Когда источником ITR является AAV2, а источником капсида AAV является другой AAV, получаемый вектор можно называть псевдотипированным. Однако можно использовать другие источники ITR AAV.

Описаны различные капсиды AAV. Способы создания AAV векторов тщательно описаны в литературе и патентных документах, включая, например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Источники капсида AAV можно выбирать из AAV, которые нацелены на желаемую ткань. Например, подходящие AAV могут включать, например, AAV9 [US 7906111; US 2011|0236353-A1], rh10 [WO 2003/042397] и/или hu37 [см., например, US 7906111; US 2011|0236353-A1]. Однако другие AAV включают, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 [патенты США № 7790449; 7282199] и др. Однако можно выбирать другие источники капсидов AAV и другие вирусные элементы, как позволяют другие конструкции иммуноглобулинов и другие элементы векторов.

Способы создания и выделения AAV вирусных векторов, подходящих для доставки субъекту, известны в данной области. См., например, патенты США № 7790449; 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689 и US 7588772 B2]. В одной системе клеточную линию продуцента временно трансфицируют конструкцией, которая кодирует трансген, фланкированный с использованием ITR, и конструкцией(ями), которая кодирует гер и сар. Во второй системе пакующую клеточную линию, которая стабильно поставляет гер и сар, временно трансфицируют конструкцией, кодирующей трансген, фланкированный с использованием ITR. В каждой из этих систем AAV вирионы образуются в ответ на инфекцию аденовирусом- или герпесвирусом-помощником, что требует отделения gAAV от контаминирующего вируса. Совсем недавно разработаны системы, которые не требуют инфицирования вирусом-помощником, чтобы извлекать AAV необходимые хелперные функции (т.е. E1, E2a, VA, и E4 аденовируса или UL5, UL8, UL52 и UL29 герпесвирус и полимеразы герпесвируса), которые также поставляет система, в транс. В этих более новых системах хелперные функции может обеспечивать временная трансфекция клеток конструкциями, которые кодируют необходимые хелперные функции, или можно конструировать клетки, которые стабильно содержат гены, кодирующие хелперные функции, экспрессией которых можно управлять на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. В еще одной другой системе трансген, фланкированный с использованием ITR, и гены гер/сар вводят в клетки насекомого посредством инфекции векторами на основе бакуловирусов. Обзоры этих продуцирующих систем см., в целом, например, в Zhang et al., 2009, "Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production", Human Gene Therapy, 20:922-929, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Способы получения и использования этих и других AAV продуцирующих систем также описаны в следующих патентах США, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме: 5139941; 5741683; 6057152; 6204059; 6268213; 6491907; 6660514; 6951753; 7094604; 7172893; 7201898; 7229823 и 7439065.

В одном из вариантов осуществления сигнал полиаденилирования (поли(A)) представляет собой минимальный сигнал поли(A), т.е. минимальную последовательность, необходимую для эффективного полиаденилирования. В одном из вариантов осуществления минимальный поли(A) представляет собой синтетический поли(A), такой как тот, что описан в Levitt et al, Genes Dev., 1989 Jul, 3(7):1019-25 и Xia et al., Nat. Biotechnol. 2002 Oct; 20(10):1006-10. Epub 2002 Sep 16. В другом варианте осуществления поли(A) извлекают из поли(A) бета-глобина кролика. В одном из вариантов осуществления поли-А действует двунаправленно (An et al., 2006, PNAS, 103(49):18662-18667. В одном из вариантов осуществления поли(A) извлекают из ранней сигнальной последовательности поли-А SV40. Каждый из этих документов включен в настоящее описание посредством ссылки.

Необязательно один энхансер или один и тот же энхансер может регулировать транскрипцию нескольких гетерологичных генов в конструкции плазмиды. Различные энхансеры, пригодные для использования в изобретении, известны в данной области и включают, например, ранний энхансер CMV, энхансер Нохс8, pPE1 и pPE2. Дополнительные энхансеры, которые можно использовать в настоящем описании, описаны в Andersson et al., Nature, март 2014, 507(7493):455-61, включенном в настоящее описание посредством ссылки. Другие энхансерные элементы могут включать, например, энхансер аполипопротеина, энхансер данио, энхансерный элемент GFAP и тканеспецифические энхансеры, такие как описано в WO 2013/1555222, постгепатитный посттранскрипционный регуляторный элемент лесного сурка. Дополнительно или альтернативно, можно выбирать другой, например, гибридный предранний (IE)-PDGR промотор цитомегаловируса человека (HCMV) или другие промотор-энхансерные элементы. Для усиления экспрессии другие элементы могут представлять собой интроны (такие как интрон промега или хи-мерный интрон из глобина курицы и иммуноглобулина человека). Другие энхансеры, которые можно использовать в настоящем описании, можно найти в Mammalian Promoter/Enhancer Database, которая находится по адресу <http://promoter.cdb.riken.jp/>.

Конструкции, описанные в настоящем документе, дополнительно могут содержать другие управляющие экспрессией или регуляторные последовательности, например включая подходящие последовательности инициации транскрипции, терминации, промоторные и энхансерные последовательности; сиг-

налы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (поли-А); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака; последовательности, которые повышают стабильность белка; и, когда желательно, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. В демонстрационных примерах, приведенных далее, используемая последовательность Козака представляет собой ССАССАТГ (н. (1988), (1992) в SEQ ID NO: 1); однако можно выбирать другие подходящие последовательности. Промотор можно выбирать из конститутивного промотора, тканеспецифического промотора, специфичного промотора определенной клетки, промотора, отвечающего на физиологические сигналы, или регулируемого промотора [см., например, WO 2011/126868 и WO 2013/049492].

Эти управляющие последовательности "функционально связаны" с последовательностями генов конструкций иммуноглобулинов. Как используют в настоящем описании, термин "функционально связан" относится как к управляющим экспрессией последовательностям, которые идут непрерывно с геном, представляющим интерес, так и к управляющим экспрессией последовательностям, которые действуют в транс или на расстоянии для того, чтобы управлять геном, представляющим интерес.

Примеры конститутивных промоторов, подходящих для управления экспрессией доменов антител включают, но не ограничиваясь этим, промоторы бета-актина курицы (СВ) или бета-актина других биологических видов, промотор цитомегаловируса человека (СМV), ранние и поздние промоторы вируса обезьян 40 (SV40), промотор U6, промоторы металлотioneина, промотор EFl $\alpha$ , промотор убиквитина, промотор гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), промотор дигидрофолатредуктазы (DHFR) (Scharfmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4626-4630 (1991), промотор аденозиндезаминазы, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK), промотор пируваткиназы, промотор фосфоглицеринмутаза, промотор  $\beta$ -актина (Lai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10006-10010 (1989), UbB, UbC, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса и другие конститутивные промоторы, известные специалистам в данной области. Примеры специфичных промоторов конкретных тканей или клеток, пригодных для использования в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваясь этим, эндотелин-1 (ET-1) и Flt-1, которые специфичны к клеткам эндотелия, FoxJ1 (который направлен на реснитчатые клетки).

Несмотря на то, что это менее желательно, можно использовать индуцибельные промоторы, подходящие для управления экспрессией доменов антител, которые включают промоторы, чувствительные к экзогенным агентам (например, фармакологическим средствам) или физиологическим сигналам. Эти чувствительные элементы включают, но не ограничиваясь этим, чувствительный к гипоксии элемент (HRE), который связывает HIF-1 $\alpha$  и  $\beta$ , чувствительный к ионам металлов элемент, такой как описано в Mayo et al. (1982, Cell 29:99-108); Brinster et al. (1982, Nature, 296:39-42) и Searle et al. (1985, Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489); или чувствительный к тепловому шоку элемент, такой как описано в Nouer et al. (в Heat Shock Response, ред. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., p. 167-220, 1991).

В одном из вариантов осуществления экспрессией открытой рамки считывания управляют посредством регулируемого промотора, который обеспечивает строгий контроль транскрипции ORF (гена), например фармакологическое средство или факторы транскрипции, активируемые фармакологическим средством или, в альтернативных вариантах осуществления, физиологические сигналы. Примеры регулируемых промоторов, которые представляют собой лиганд-зависимые комплексы факторов транскрипции, которые можно использовать, включают, без ограничения, членов семейства ядерных рецепторов, активируемых их соответствующими лигандами (например, глюкокортикоид, эстроген, прогестин, ретиноид, экдизон и их аналоги и миметики), и гТТА, активируемые тетрациклином. Примеры таких систем включают, без ограничения, ARGENT™ Transcriptional Technology (ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, Mass.). Примеры таких промоторных систем описаны, например, в WO 2012/145572, включенном в настоящее описание посредством ссылки. В других вариантах осуществления, малые переключатели на основе РНК описаны в <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605380>.

Другие промоторы могут включать, например, предранний энхансер/промотор цитомегаловируса человека (СМV), ранний энхансер/промотор SV40, промотор JC полимовируса, промоторы основного белка миелина (MBP) или глиофибрилярного кислого белка (GFAP), ассоциированный с латентностью промотор (LAP) вируса простого герпеса (HSV-1), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV), специфичный промотор нейронов (NSE), промотор тромбоцитарного фактора роста (PDGF), hSYN, промотор меланин-концентрирующего гормона (MCH), СВА, промотор глиофибрилярного кислого белка (GFAP), промотор матриксного металлопротеина (MPP) и промотор бета-актина курицы. Промоторы могут быть одинаковыми или различными для каждой экспрессирующей кассеты.

В определенных вариантах осуществления каждый из геномов векторов содержит экспрессирующую иммуноглобулин кассету, фланкированную инвертированными концевыми повторами (ITR). Экспрессирующие кассеты содержат кодирующие последовательности, управляемые промотором СВ7, гибридом между предранним энхансером (С4) цитомегаловируса (СМV) и промотором бета-актина курицы. Транскрипцию с этого промотора усиливает присутствие интрона (С1) бета-актина курицы.

5'-нетранслируемую область (UTR) гена с-мус человека располагают выше по направлению считывания от кодирующей mAb области в качестве энхансера трансляции. Сигнал полиаденилирования для экспрессирующей кассеты представляет собой поли-А бета-глобина кролика (RBG). Лидерные (сигнальные) пептиды предшествуют как тяжелой, так и легкой цепям антитела и опосредуют секрецию антитела из трансдуцированной клетки. Тяжелую и легкую цепи разделяют линкером, содержащим сайт расщепления фурина и последовательность FMDV 2A. Этот линкер опосредует посттрансляционное расщепление тяжелой и легкой цепей и, за исключением одной замены аминокислоты (концевой лизин в тяжелой цепи заменен на остаток аргинина), полностью удаляется из конечного mAb продукта.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит конститутивный промотор. В другом варианте осуществления 5'-UTR представляет собой усеченный UTR из гена с-мус человека. Последовательность линкера может представлять собой F2A или IRES. Тяжелый сигнальный пептид и легкий сигнальный пептид могут представлять собой одно и то же или различное. В одном из вариантов осуществления лидерная последовательность представляет собой лидерную последовательность интерлейкина (IL) IL-2, который может представлять собой IL-2 дикого типа (MYRMQLLSICIALSLALVTNS, SEQ ID NO: 24), так как используют в тяжелой цепи FI6v3, или синтетическую лидерную последовательность, такую как в мутировавшем IL-2, использованную в легкой цепи каппа зародышевой линии (MYRMQLLLLLIALSLALVTNS, SEQ ID NO: 5), или мутировавшую лидерную последовательность IL-2, используемую для тяжелой цепи CR8033 (MRMQLLLLLIALSLALVTNS, SEQ ID NO: 25). Можно использовать другие лидерные последовательности, включая сигнальные пептиды врожденных антител или другие гетерологичные лидерные последовательности. В одном из вариантов осуществления можно выбирать поли-А дикого типа или синтетический поли-А. Как используют в настоящем описании, вектор может представлять собой любой подходящий генетический элемент, который трансфицирует, трансдуцирует или инфицирует клетку-хозяина и экспрессирует иммуноглобулины, которые собираются в функциональное антитело. Такие векторы можно выбирать из лентивирусного вектора, бакуловирусного вектора, парвовирусного вектора, плазмиды, модифицированной РНК и молекулы ДНК, где мРНК и ДНК могут быть в форме наночастиц.

В одном из вариантов осуществления геном вектора для AAV вектора, несущего антитело к гриппу А, содержит следующее.

Инвертированные концевые повторы (ITR): AAV2 ITR (GenBank No. NC001401) представляют только цис-последовательности, необходимые для репликации и упаковки генома вектора. AAV, имеющий ITR и другого источника, нежели его капсид, называют "псевдотипированным". В определенных вариантах осуществления ITR из источника, отличного от AAV2, можно выбирать для этой конструкции, чтобы генерировать другой псевдотипированный AAV. Альтернативно, можно выбирать ITR того же источника, что и капсид.

Предранний энхансер цитомегаловируса (CMV) (260 п.о., C4; GenBank No. K03104.1). В другом варианте осуществления можно выбирать другой энхансер. См. обсуждение энхансеров далее.

Промотор бета-актина курицы (281 п.о.; CB; GenBank No. X00182.1). В определенных вариантах осуществления можно выбирать другой промотор. См. обсуждение промоторов далее. В других вариантах осуществления может содержаться множество энхансеров и/или промоторов.

Интрон бета-актина курицы: интрон 875 п.о. из гена бета-актина курицы (GenBank No. X00182.1) присутствует в экспрессирующей кассете вектора.

с-мус 5'-UTR: нуклеотиды 381-428 из мРНК гомолога вирусного онкогена миелоцитоматоза птиц *v-mus Homo sapiens* (MYC) номер доступа GenBank NM002467).

кДНК лидерного (сигнального) пептида: последовательность кДНК с оптимизацией кодонов (<http://www.uniprot.org/uniprot/P60568>), предшествующая и совпадающая рамкой считывания с тяжелой цепью FI6. кДНК тяжелой вариабельной цепи FI6v3: последовательность кДНК с оптимизацией кодонов человек, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи человека против гриппа (номер доступа GenBank AEL31303.1).

Константная тяжелая 1 (CH1) цепь: синтезировали кДНК с оптимизацией кодонов, кодирующую белковую последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина человека, номер доступа GenBank VAF64540.1.

FI6 Fc-цепь (CH2-3): кДНК с оптимизацией кодонов, кодирующую часть иммуноглобулина человека с номером доступа GenBank 2J6E\_A, за исключением C-концевого лизина, который заменяли на аргинин, и положения 57, где аспарагиновая кислота заменяла глутаминовую кислоту).

кДНК лидерного (сигнального) пептида: синтезировали последовательность кДНК с оптимизацией кодонов, которая предшествует универсальной легкой цепи (ILhu1), описанной в [Zhang et al., цитировано выше).

кДНК универсальной легкой цепи: синтезировали последовательность кДНК человека с оптимизацией кодонов (номер доступа GeBank ACJ71709.1).

кДНК константной легкой цепи: синтезировали последовательность кодонов человека номер доступа GenBank AGH70219.1).

Участок узнавания фурина: синтезировали аргинин-лизин-аргинин-аргинин и кДНК с оптимизаци-

ей кодонов.

Линкер F2A: синтезировали пептид из 24 аминокислот, полученный из FMDV (GenBank No. CAA2436.1), и кДНК с оптимизацией кодонов.

Сигнал полиаденилирования: сигнал полиаденилирования бета-глобина кролика 127 п. о. (GenBank No. V00882.1) дает цис-последовательности для эффективного полиаденилирования мРНК антитела.

В определенных вариантах осуществления геном вектора для AAV вектора, несущего антитело к гриппу В, содержит инвертированные концевые повторы (ITR): AAV2 ITR; предранний энхансер цитомегаловируса (CMV); промотор бета-актина курицы; интрон бета-актина курицы; усеченный 5' UTR из с-туса; кДНК лидерного (сигнального) пептида; кДНК тяжелой варибельной цепи CR8033; константную тяжелую 1 (CH1) цепь: кДНК с оптимизацией кодонов; Fc-цепь CR8033 (CH2-3); кДНК лидерного (сигнального) пептида; кДНК универсальной легкой цепи; кДНК константной легкой цепи; участок узнавания фурина; линкер F2A; сигнал полиаденилирования.

В определенных вариантах осуществления элементы вектора для гриппа А и/или гриппа В могут варьировать. Например, геном вектора как проиллюстрировано выше, но без AAV ITR, можно использовать в другой экспрессирующей системе (например, бакуловирусовая, лентивирусовая, плазмидная, депротенинированная ДНК). Другие подходящие элементы вектора, включая, например, промоторы, энхансеры, линкеры, поли-А, интроны, для использования в AAV или не AAV экспрессирующей системе описаны в настоящем описании.

Две или больше ORF, которые несет молекула нуклеиновой кислоты, упакованная в вектор, можно экспрессировать из двух экспрессирующих кассет, одна или обе из которых могут быть бицистронными.

Кодирующие последовательности для выбранного иммуноглобулина (например, тяжелая и/или легкая цепь(и)) или другие элементы (например, лидерные последовательности) можно получать и/или синтезировать. Способы секвенирования нуклеиновой кислоты (например, РНК и ДНК) известны специалистам в данной области. Когда известна последовательность нуклеиновой кислоты, существуют основанные на веб и коммерчески доступные компьютерные программы, а также компании, оказывающие услуги, которые осуществляют обратную трансляцию аминокислотных последовательностей в кодирующие последовательности нуклеиновых кислот. См., например, backtranseq от EMBOSS, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>; Gene Infinity ([http://www.geneinfinity.org/sms/sms\\_backtranslation.html](http://www.geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html)); ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>). В одном из вариантов осуществления РНК и/или кДНК кодирующие последовательности разрабатывают для оптимальной экспрессии в клетках человека. Способы синтеза нуклеиновых кислот известны специалистам в данной области, и их можно использовать для описанных в настоящем описании конструкций нуклеиновых кислот целиком или частями.

Кодирующие области с оптимизацией кодонов можно разрабатывать многими различными способами. Эту оптимизацию можно осуществлять с использованием способов, которые доступны онлайн (например, GeneArt), опубликованных способов или компании, которая представляет услуги по оптимизации кодонов, например, такой как DNA2.0 (Menlo Park, CA). Один алгоритм оптимизации кодонов описан, например, в патентной заявке США № WO 2015/012924, включенной в настоящее описание посредством ссылки. См. также, например, публикацию патента США № 2014/0032186 и публикацию патента США № 2006/0136184. Подходящим образом для продукта модифицируют открытую рамку считывания (ORF) по всей длине. Однако в некоторых вариантах осуществления можно изменять только фрагмент ORF. Используя один из этих способов, можно применять частоты к какой-либо заданной полипептидной последовательности и получать фрагмент нуклеиновой кислоты кодирующей области с оптимизацией кодонов, которая кодирует полипептид.

Для использования в получении AAV вирусного вектора (например, рекомбинантного (r) AAV), экспрессирующие кассеты могут нести любой подходящий вектор, например плазида, который доставляют в пакующую клетку-хозяина. Плазмиды, которые можно использовать в этом изобретении, можно конструировать так, чтобы они подходили для репликации и упаковки в прокариотических клетках, клетках млекопитающих или как тех, так и других. Подходящие способы трансфекции и пакующие клетки-хозяева известны и/или могут быть легко разработаны специалистом в данной области.

Способы генерации и выделения AAV, пригодных для использования в качестве векторов, известны в данной области. См., в целом, например, Grieger & Samulski, 2005, "Adenoassociated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications", *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99:119-145; Buning et al., 2008, "Recent developments in adenoassociated virus vector technology", *J. Gene Med.* 10:717-733; и источники, цитируемые далее, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Для упаковки трансгена в вирионы ITR являются единственными компонентами AAV, необходимыми в цис в той же конструкции, что и молекула нуклеиновой кислоты, содержащая экспрессирующие кассеты. Гены сар и гер можно представлять в транс.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующие кассеты, описанные в настоящем документе, конструируют в генетическом элементе (например, челночной плазмиде), который переносит последовательности конструкций иммуноглобулинов, которые он несет, в пакующую клетку-хозяина для получения вирусного вектора. В одном из вариантов осуществления выбранный генетический элемент можно доставлять в упаковывающую AAV клетку любым подходящим способом, включая трансфекцию,

электропорацию, липосомную доставку, способы со слиянием мембран, высокоскоростные гранулы, покрытые ДНК, вирусную инфекцию и слияние протопластов. Также можно получать стабильные упаковывающие AAV клетки. Альтернативно, экспрессирующие кассеты можно использовать для того, чтобы создавать вирусный вектор, отличный от AAV, или для получения смесей антител *in vitro*. Способы, используемые для получения таких конструкций, известны специалистам по манипуляциям с нуклеиновыми кислотами и включают генетическую инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические способы. См., например, *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, ред. Green и Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

#### AAV векторы.

Как используют в настоящем описании, "AAV9 капсид" относится к AAV9, имеющему аминокислотную последовательность с номером доступа GenBank AAS99264, включенную в настоящее описание посредством ссылки. Некоторые вариации в этой кодируемой последовательности находятся в объеме данного изобретения и могут включать последовательности, обладающие приблизительно 99% идентичностью с указанной аминокислотной последовательностью с номером доступа GenBank AAS99264 и в US7906111 (также WO 2005/033321) (т.е. меньше приблизительно 1% вариаций относительно упомянутой последовательности). Однако в других вариантах осуществления можно выбирать другие варианты AAV9 или AAV9 капсиды, обладающие по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью с указанными выше последовательностями. Способы создания капсида, кодирующих его последовательностей и способы получения гAAV вирусных векторов описаны. См., например, Gao, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003) и US 2013/0045186 A1.

Термин "промежуточная стадия AAV9" или "промежуточная стадия AAV9 вектора" относится к собранному капсиду гAAV, который не имеет желаемых геномных последовательностей, упакованных в него. Также его можно называть "пустым" капсидом. Такой капсид может не содержать поддающиеся обнаружению геномные последовательности экспрессирующей кассеты или содержать только частично упакованные геномные последовательности, которых недостаточно для того, чтобы добиться экспрессии продукта гена. Эти пустые капсиды не функциональны для переноса гена, представляющего интерес, в клетку-хозяина.

Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV), описанный в настоящем документе, можно создавать с использованием способов, которые известны. См., например, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Такой способ включает культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую капсид AAV; функциональный ген гер; экспрессирующую кассету, состоящую, как минимум, из инвертированных концевых повторов AAV (ITR) и трансгена; и достаточные хелперные функции, чтобы допускать упаковку экспрессирующей кассеты в капсидный белок AAV.

В кратком изложении, клетки получают в подходящих клетках клеточной культуры (например, HEK293). Способы изготовления векторов генной терапии, описанных в настоящем документе, включают способы, хорошо известные в данной области, такие как создание ДНК плазмиды, используемой для получения векторов генной терапии, создания векторов и очистки векторов. В некоторых вариантах осуществления вектор генной терапии представляет собой AAV вектор и создаваемые плазмиды представляют собой AAV цис-плазмиду, кодирующую AAV геном и ген, представляющий интерес, AAV транс-плазмиду, содержащую гены гер и сар AAV, и аденовирусную плазмиду-помощник. Процесс создания вектора может включать такие стадии способа, как инициация клеточной культуры, пассирование клеток, посев клеток, трансфекция клеток плазмидной ДНК, смена среды после трансфекции на бессывороточную среду и сбор вектор-содержащих клеток и сред для культивирования. Собранные вектор-содержащие клетки и среды для культивирования обозначают в настоящем описании как неочищенный клеточный урожай.

После этого неочищенный клеточный урожай можно подвергать таким стадиям способа, как концентрирование урожая вектора, диафильтрация урожая вектора, микрофлюидизация урожая вектора, нуклеазное расщепление урожая вектора, фильтрование микрофлюидизированного промежуточного продукта, грубая очистка хроматографией, грубая очистка ультрацентрифугированием, замена буфера тангенциальным поточным фильтрованием и/или приготовление и фильтрование для того, чтобы получить большое количество вектора.

Двухстадийную очистку аффинной хроматографией при высокой концентрации соли, за которой следует хроматография на анионообменных смолах, используют для того, чтобы очищать векторный лекарственный продукт и удалять пустые капсиды. Эти способы описаны более подробно в патентной заявке США № 62/322,071, поданной 13 апреля 2016 г., и патентной заявке США № 62/226,357, поданной 11 декабря 2015 г. и озаглавленной "Scalable Purification Method for AAV9", которые включены в настоящее описание посредством ссылки. Способы очистки AAV8 приведены в патентной заявке США № 62/322,098, поданной 13 апреля 2016 г., и патентной заявке США № 62/266,341, поданной 11 декабря 2015 г., и rh10, патентная заявка США № 62/322,055, поданная 13 апреля 2016 г., и патентная заявка США № 62/266,347, озаглавленная "Scalable Purification Method for AAVrh10", поданная 11 декабря 2015 г., и для AAV1, патентная заявка США № 62/322,083, поданная 13 апреля 2016 г., и па-

тентная заявка США № 62/26,351, "Scalable Purification Method for AAV1", поданная 11 декабря 2015 г., все они включены в настоящее описание по ссылке.

Для того чтобы вычислять содержание пустых и полных частиц, строят график зависимости объемов полос VP3 для выбранного образца (например, в примерах в настоящем описании препарата, очищенного в градиенте йодиксанола, где число к.г. = число частиц) от загруженных к.г. частиц. Получаемое линейное уравнение ( $y=mx+c$ ) используют для того, чтобы вычислять число частиц в объемах полос для пиков тестовых изделий. Затем число частиц (ч-ц.), загруженных в 20 мкл, умножают на 50, чтобы получать частицы (ч-ц.)/мл. Ч-ц./мл, деленное на к.г./мл, дает соотношение частиц и копий генома (ч-ц./к.г.). Ч-ц./мл-к. г./мл дает пустые ч-ц./мл. Пустые ч-ц./мл, деленные на ч-ц./мл и умноженные на 100, дают процентную долю пустых частиц.

В целом, способы анализа пустых капсидов и AAV векторных частиц с упакованными геномами известны в данной области. См., например, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999), 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003), 7:122-128. Для того чтобы тестировать денатурированный капсид, способы включают проведение SDS-электрофореза обработанного исходного раствора AAV в полиакриламидном геле, которое состоит из какого-либо геля, способного разделять три капсидных белка, например, в градиентном геле, содержащем 3-8% Tris-ацетата в буфере, где гель разгоняют до разделения материала образца, и переноса геля на нейлоновые или нитроцеллюлозные мембраны, предпочтительно нейлоновые. Затем антитела против капсида AAV используют в качестве первичных антител, которые связываются с денатурированными капсидными белками, предпочтительно моноклональное антитело против капсида AAV, наиболее предпочтительно моноклональное антитело B1 против AAV-2 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000), 74:9281-9293). Затем используют вторичное антитело, которое связывается с первичным антителом и содержит средство для обнаружения связывания с первичным антителом, более предпочтительно антитело против IgG, содержащее молекулу для обнаружения, ковалентно связанную с ним, наиболее предпочтительно антитело овцы против IgG мыши, ковалентно связанное с пероксидазой хрена. Способ обнаружения связывания используют для того, чтобы полуколичественно определять связывание между первичными и вторичными антителами, предпочтительно способ обнаружения способен обнаруживать излучение радиоактивных изотопов, электромагнитное излучение или колориметрические изменения, наиболее предпочтительно набор для хемилюминесцентного обнаружения. Например, для SDS-PAGE образцы из фракций колонки можно брать и нагревать в SDS-PAGE загрузочном буфере, содержащем восстанавливающее средство (например, DTT), и капсидные белки разрешают на предварительно отлитых градиентных полиакриламидных гелях (например, Novex). Окрашивание серебром можно осуществлять с использованием SilverXpress (Invitrogen, CA) по инструкциям производителя или другого подходящего способа окрашивания, т. е. окрашивание SYPRO Ruby или кумасси. В одном из вариантов осуществления концентрацию геномов AAV вектора (vg) во фракциях колонки можно измерять посредством количественной ПЦР в реальном времени (Q-PCR). Образцы разводят и расщепляют ДНКазой I (или другой подходящей нуклеазой) для того, чтобы удалять экзогенную ДНК. После инактивации нуклеазы образцы дополнительно разводят и амплифицируют с использованием праймеров и флуорогенного зонда TaqMan™ со специфичностью к последовательности ДНК между праймерами. Число циклов, необходимое для достижения определенного уровня флуоресценции (пороговый цикл, Ct) измеряют для каждого образца на Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System. Плазмидную ДНК, содержащую последовательности, идентичные тому, что содержится в AAV векторе, используют для того, чтобы создавать калибровочную кривую в реакции Q-PCR. Значения порогового цикла (Ct), получаемые из образцов, используют для того, чтобы определять титр генома вектора посредством их нормализации по значению Ct для калибровочной кривой плазмиды. Также можно использовать анализ конечной точки на основе цифровой ПЦР.

В одном из аспектов используют оптимизированный способ Q-PCR, в котором используют сериновую протеазу широкого спектра, например, протеиназу K (например, коммерчески доступную в Qiagen). Более конкретно, оптимизированный qPCR анализ титра генома схож со стандартным анализом, за исключением того, что после расщепления ДНКазой I, образцы разводят буфером для протеиназы K и обрабатывают протеиназой K, после чего следует тепловая инактивация. Подходящим образом образцы разводят буфером для протеиназы K в количестве, равном размеру образца. Буфер для протеиназы K можно концентрировать до 2 раз или выше.

Обычно обработка протеиназой K составляет приблизительно 0,2 мг/мл, но может варьировать от 0,1 приблизительно до 1 мг/мл. Стадию обработки в целом проводят приблизительно при 55°C в течение приблизительно 15 мин, но ее можно осуществлять при более низкой температуре (например, приблизительно от 37 приблизительно до 50°C) в течение более длительного периода времени (например, приблизительно от 20 приблизительно до 30 мин) или при более высокой температуре (например, приблизительно вплоть до 60°C) в течение более короткого периода времени (например, приблизительно от 5 до 10 мин). Аналогичным образом, тепловая инактивация в целом происходит приблизительно при 95°C в течение приблизительно 15 мин, но температура может быть более низкой (например, приблизительно от 70 приблизительно до 90°C), а время увеличено (например, приблизительно от 20 приблизительно до 30 мин). Затем образцы разводят (например, в 1000 раз) и подвергают анализу TaqMan, как описано в

стандартном анализе.

Дополнительно или альтернативно, можно использовать капельную цифровую ПЦР (ddPCR). Например, описаны способы определения титров одноцепочечного и самокомплементарного генома AAV вектора с помощью ddPCR. См., например, M. Lock et al., *Hu Gene Therapy Methods, Hum. Gene Ther. Methods*. 2014 Apr; 25(2):115-25, doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

Вкратце, способ отделения гAAV9 частиц, имеющих упакованные геномные последовательности, от промежуточных стадий AAV9 без геномов, включает проведение жидкостной хроматографии быстрого разрешения для суспензии, содержащей рекомбинантные AAV9 вирусные частицы и промежуточные AAV9 капсидные продукты, где AAV9 вирусные частицы и промежуточные стадии AAV9 связываются с сильной анионообменной смолой, уравновешенной при pH 10,2, и на них воздействуют градиентом соли, при этом осуществляя мониторинг элюата на поглощение ультрафиолета приблизительно при 260 и приблизительно 280. Несмотря на то, что это менее оптимально для гAAV9, pH может находиться в диапазоне приблизительно от 10,0 до 10,4. В этом способе полные AAV9 капсиды собирают из фракции, которую элюируют, когда соотношение A260/A280 достигает точки перегиба. В одном из примеров для стадии аффинной хроматографии диафильтованный продукт можно наносить на аффинную смолу Capture Select™ Poros-AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2/9. При этих ионных условиях значительная процентная доля остаточной клеточной ДНК и белков течет через колонку, тогда как AAV частицы эффективно задерживаются.

Подходящим составом является водная суспензия, забуференная при физиологически совместимых pH и концентрации соли. Необязательно, в составе присутствует одно или несколько поверхностно-активных средств.

Подходящее поверхностно-активное средство или комбинацию поверхностно-активных средств можно выбирать среди неионных поверхностно-активных веществ, которые являются нетоксичными. В одном из вариантов осуществления выбирают бифункциональное блок-сополимерное поверхностно-активное средство, оканчивающееся первичными гидроксильными группами, например, такое как Pluronic® F68 [BASF], также известный как полоксамер 188, который имеет нейтральный pH и усредненную молекулярную массу 8400. Можно выбирать другие поверхностно-активные средства и другие полоксамеры, т.е. неионные три-блок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)), Solutol HS 15 (макрогол-15 гидроксистеарат), Labrasol (полиоксикаприловый глицерид), простой полиокси 10 олеиловый эфир, Tween (сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот), этанол и полиэтиленгликоль. В одном из вариантов осуществления состав содержит полоксамер. В названии этих сополимеров обычно содержится буква "P" (от "poloxamer"), после чего следуют три цифры: первые две цифры, умноженные на 100, дают приблизительную молекулярную массу полиоксипропиленового ядра, а последняя цифра, умноженная на 10, дает процентную долю содержания полиоксиэтилена. В одном из вариантов осуществления выбирают полоксамер 188. Поверхностно-активное средство может присутствовать в количестве вплоть от приблизительно 0,0005 приблизительно до 0,001% суспензии.

#### Использования и схемы

В одном из вариантов осуществления способ лечения гриппа и/или предотвращения инфекции вирусом гриппа включает совместное введение синтетического антитела FI6v3 и синтетического антитела CR8033, предусмотренных в настоящем описании. Необязательно, такую схему пассивной иммунизации можно комбинировать с традиционной вакциной, с дополнительным антителом против гриппа или с другими противовирусными ингредиентами можно выбирать.

В определенных вариантах осуществления два антитела совместно экспрессируют с различных гAAV9 векторов. В другом варианте осуществления гAAV-опосредованную доставку искусственного антитела объединяют с другой экспрессирующей антитело системой.

Векторы предпочтительно суспендируют в физиологически совместимом носителе для введения пациенту-человеку или не относящемуся к человеку млекопитающему. Подходящие носители может легко выбирать специалист в данной области, учитывая показание, на которое направлен переносимый вирус. Например, один подходящий носитель включает физиологический раствор, который можно готовить с различными буферными растворами (например, фосфатно-солевым буфером). Другие образцовые носители включают стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, мальтозу и воду. Выбор носителя не является ограничением настоящего изобретения. Необязательно, композиции по изобретению могут содержать, в дополнение к гAAV и носителю(ям), другие стандартные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы.

В определенных вариантах осуществления два исходных раствора различных векторов (например, гAAV9.FI6v3+гAAV9.CR8033) готовят отдельно. В таком варианте осуществления их можно доставлять отдельно, но по существу одновременно друг с другом, например, в пределах от минут приблизительно до 1 ч. В определенных вариантах осуществления два исходных раствора различных векторов смешивают и комбинируют в одной композиции для введения. Независимо от того, доставляют ли

отдельно или в комбинированной суспензии, два исходных раствора векторов смешивают в соотношении приблизительно 1:1 на основании копий генома. В других вариантах осуществления это соотношение можно изменять, например, приблизительно от 3:1, приблизительно 2:1 приблизительно до 1:2 на основании полных копий генома.

В определенных вариантах осуществления гAAV9 состав представляет собой суспензию, которая содержит эффективное количество AAV вектора, суспендированного в фосфатно-солевом буфере (PBS) при полной концентрации приблизительно 200 мМ, 0,001% (мас./об.) Pluronic F68 и 5% глицерина. Подходящим образом, состав корректируют до физиологически приемлемого pH, например, в диапазоне pH от 6 до 9 или pH от 6,5 до 8, pH от 7,0 до 7,7 или pH от 7,2 до 7,8. Однако другие pH в самых широких диапазонах и эти поддиапазоны можно выбирать для другого пути доставки.

В одном из вариантов осуществления состав может иметь, например, концентрацию по меньшей мере приблизительно от  $1 \times 10^9$  до  $3 \times 10^{13}$  к.г./мл, как измеряют посредством oqPCR или цифровой капельной ПЦР (ddPCR), как описано, например, в M. Lock et al., *Hu Gene Therapy Methods, Hum. Gene Ther. Methods.* 2014 Apr; 25(2):115-25, doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления композицию, как представлено в настоящем описании, готовят для интраназальной доставки. Данное изобретение относится к продуктам, содержащим наборы, которые содержат устройство интраназальной доставки и контейнер для композиции по изобретению, необязательно с другими компонентами, например разбавителями и т.д.

В определенных вариантах осуществления устройство интраназальной доставки предусматривает струйный распылитель, который доставляет аэрозоль частиц, имеющих усредненный размер в диапазоне приблизительно от 30 приблизительно до 100 мкм в размере. В определенных вариантах осуществления диапазон усредненных размеров составляет приблизительно от 10 приблизительно до 50 мкм. Подходящие устройства описаны в литературе и некоторые коммерчески доступны, например, LMA MAD NASAL™ (Teleflex Medical; Ireland); Teleflex VaxiNator™ (Teleflex Medical; Ireland); Controlled Particle Dispersion® (CPD) от Kurve Technologies. Также см., PG Djupesland, *Drug Deliv and Transl. Res* (2013), 3:42-62. В определенных вариантах осуществления размером частицы и объемом доставки управляют для того, чтобы предпочтительно направленно воздействовать на клетки эпителия носа и минимизировать направленное воздействие на легкие. В других вариантах осуществления частицы аэрозоля составляют приблизительно от 0,1 приблизительно до 20 мкм или меньше для того, чтобы осуществлять доставку в клетки легких. Такие более мелкие размеры частиц могут минимизировать задерживание в носовом эпителии.

Любой подходящий способ или путь можно использовать для того, чтобы вводить AAV-содержащую композицию, как раскрыто в настоящем описании, и, необязательно, для того, чтобы совместно вводить другие активные лекарственные средства или терапию в сочетании с AAV-опосредованными антителами, описанными в настоящем документе. Пути введения включают, например, системное, оральное, внутривенное, интраперитонеальное, подкожное или внутримышечное введение.

В одном из вариантов осуществления предусмотрена замороженная композиция, которая содержит гAAV в буферном растворе, как раскрыто в настоящем описании, в замороженной форме. Необязательно, одно или несколько поверхностно-активных средств (например, Pluronic F68), стабилизаторы или консерванты присутствуют в этой композиции. Подходящим образом, для использования композицию размораживают и титруют до желаемой дозы с использованием подходящего разбавителя, например стерильного физиологического раствора или буферного физиологического раствора.

Необязательно, композицию, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации с другими противовирусными медикаментозными средствами и/или вакцинами против других вирусных мишеней, включая другие вакцины против гриппа, включая грипп А, грипп В и грипп С. Вирусы типа А являются наиболее вирулентными патогенами человека. Серотипы гриппа А, которые связаны с пандемиями, включают H1N1, который вызвал испанский грипп в 1918 году и свиной грипп в 2009 году; H2N2, который вызывал азиатский грипп в 1957 году; H3N2, который вызвал гонконгский грипп в 1968 году; H5N1, который вызвал птичий грипп в 2004 году; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3 и H10N7. Описаны нейтрализующие антитела широкого спектра действия против гриппа А. Как используют в настоящем описании, "нейтрализующее антитело широкого спектра действия" относится к нейтрализующему антителу, которое может нейтрализовать несколько штаммов из нескольких субтипов. Например, описано моноклональное антитело CR6261 [The Scripps Institute/Crucell], которое связывается с широким диапазоном вирусов гриппа, включая 1918 "испанский грипп" (SC1918/H1) и вирус класса H5N1 птичьего гриппа, который перепрыгнул с кур на человека во Вьетнаме в 2004 году (Viet04/H5). CR6261 распознает высококонсервативную спиральную область в проксимальном к мембране стебле гемагглютинаина, преобладающем белке на поверхности вируса гриппа. Это антитело описано в WO 2010/130636, который включен по ссылке в настоящее описание. Описано другое нейтрализующее антитело, F10 [XOMA Ltd], которое можно использовать против H1N1 и H5N1. [Sui et al., *Nature Structural and Molecular Biology* (Sui,

et al. 2009, 16(3):265-73] Можно выбирать другие антитела против гриппа, например Fab28 и Fab49. См., например, WO 2010/140114 и WO 2009/115972, которые включены по ссылке. Без труда можно выбирать другие антитела, такие как те, что описаны в WO 2010/010466, публикации опубликованного патента США US 2011/076265 и WO 2008/156763.

Способы использования этих гAAV, например, для пассивной иммунизации описаны, например, в WO 2012/145572. Другие способы доставки и использования будут видны специалисту в данной области. Например, схема, как раскрыто в настоящем описании, может включать, в дополнение к одной или нескольким из комбинаций, описанных в настоящем документе, дополнительную комбинацию с одним или несколькими из биологического лекарственного средства, низкомолекулярного лекарственного средства, химиотерапевтического средства, иммуностимуляторов, излучения, хирургического вмешательства и т.п. Биологическое лекарственное средство, как раскрыто в настоящем описании, основано на пептиде, полипептиде, белке, ферменте, молекуле нуклеиновой кислоты, векторе (включая вирусные векторы) или т.п.

При комбинированном лечении AAV-доставляемую конструкцию иммуноглобулина, описанную в настоящем документе, вводят до, во время или после начала терапии другим средством, таким как противовирусная терапия, антибиотики, а также какое-либо их сочетание, т.е. до и во время, до и после, во время и после или до, во время и после начала терапии. Например, AAV можно вводить между 1 и 30 сутками, предпочтительно 3 и 20 сутками, более предпочтительно между 5 и 12 сутками до начала терапии.

Как описано выше, термин "приблизительно", когда используют для того, чтобы модифицировать числовое значение, обозначает вариацию  $\pm 10\%$ , если не указано иное.

Как используют повсюду в этом описании и формуле изобретения, термин "содержать" и его варианты, включая "содержит" и "содержащий", среди прочих вариантов, включают другие компоненты, элементы, целые числа, стадии и т.п. Термин "состоит из" или "состоящий из" включает другие компоненты, элементы, целые числа, стадии и т.п.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или больше последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или больше последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или обладают точно определенной процентной долей аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые одинаковы (т.е. приблизительно 70% идентичность, предпочтительно 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более высокая идентичность) в точно определенной области (например, какая-либо одна из модифицированных ORF, представленных в настоящем описании, при сравнении и выравнивании по максимальному совпадению в окне сравнения или обозначенной области), как измеряют с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными далее, или посредством ручного выравнивания и визуальной проверки (см., например, веб-сайт NCBI или т.п.). В качестве другого примера полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием Fasta, программы в к.г.Г версии 6.1. Fasta представляет выравнивания и процент идентичности последовательностей областей для наилучшего перекрытия между запрашиваемой и поисковой последовательностями. Например, процент идентичности последовательностей между последовательностями нуклеиновых кислот можно определять с использованием Fasta с ее параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для матрицы замен), как представлено в к.г.Г версии 6.1, включенной в настоящее описание посредством ссылки. В целом, эти программы используют с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области может менять эти настройки при необходимости. Альтернативно, специалист в данной области может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которая представляет, по меньшей мере, уровень идентичности или выравнивание, как это представляют указанные алгоритмы и программы. Это определение также относится к или может быть применимо к комплементарной последовательности. Определение также включает последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, а также те, которые имеют замены. Как описано ниже, предпочтительные алгоритмы могут учитывать пропуски и т.п. Предпочтительно идентичность существует на протяжении области, которая составляет по меньшей мере приблизительно 25, 50, 75, 100, 150, 200 аминокислоты или нуклеотидов в длину, и часто на протяжении области, которая составляет 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500 аминокислот или нуклеотидов в длину, или на протяжении полноразмерной последовательности аминокислот или нуклеиновой кислоты.

Обычно, когда выравнивание получают на основе аминокислотной последовательности, выравнивание содержит инсерции и делеции, которые идентифицированы так по отношению к эталонной последовательности AAV, а нумерация аминокислотных остатков основана на эталонной шкале, предусмотренной для выравнивания. Однако какая-либо заданная последовательность AAV может иметь меньше аминокислотных остатков, чем эталонная шкала. В настоящем изобретении, при обсуждении родительской последовательности, термин "то же положение" или "соответствующее положение" относится к аминокислоте, расположенной под тем же номером остатка в каждой из последовательностей, относительно эталонной шкалы для выровненных последовательностей. Однако вне выравнивания каждый из белков может иметь эти аминокислоты расположенными под различными номерами остатков. Выравни-

вание осуществляют с использованием какой-либо из различных публично или коммерчески доступных программ множественного выравнивания последовательностей. Программы выравнивания последовательностей доступны для аминокислотных последовательностей, например программы "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" и "Match-Box". В целом, какие-либо из этих программ используют с настройками по умолчанию, хотя специалист в данной области может менять эти настройки при необходимости. Альтернативно, специалист в данной области может использовать другой алгоритм или компьютерную программу, которая представляет, по меньшей мере, уровень идентичности или выравнивание, как их представляют упомянутые алгоритмы и программы. См., например, J.D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

Как используют в настоящем описании, "эффективное количество" относится к количеству гAAV9 композиции, которое доставляет и экспрессирует в клетках-мишенях количество антител против гриппа, достаточное для того, чтобы снижать или предотвращать инфекцию гриппа. Эффективное количество можно определять на основании животной модели, вместо пациента-человека. Примеры подходящей мышинной модели описаны в настоящем документе.

Как используют в настоящем описании, термин "пациент" в целом относится к человеку с диагнозом или находящемуся в группе риска инфекции гриппом. Такого пациента также можно упоминать в настоящем описании как "субъекта". Термин "субъект" также может относиться к животным, не относящимся к человеку, например кошкам, собакам и не являющимся человеком приматам.

"Функциональное антитело" может представлять собой антитело или иммуноглобулин, который связывается с выбранной мишенью (например, антигеном на клетке злокачественной опухоли или патогене, таком как вирус, бактерия или паразит) с достаточной аффинностью связывания, чтобы вызывать желаемый физиологический результат, который может быть защитным (например, пассивная иммунизация) или терапевтическим.

Как используют в настоящем описании, "домен иммуноглобулина" относится к домену тяжелой цепи или легкой цепи антитела, как определено со ссылкой на стандартное полноразмерное антитело. Более конкретно, полноразмерное антитело содержит полипептид тяжелой (H) цепи, который содержит четыре домена: одну N-концевую переменную (VH) область и три C-концевые константные (CH1, CH2 и CH3) области, и полипептид легкой (L) цепи, который содержит два домена: одну N-концевую переменную (VL) область и одну C-концевую константную (CL) область. Fc-область может содержать два домена (CH2-CH3). Fab-область может содержать один константный и один переменный домен для каждой из тяжелой и легкой цепей. Аллотипы константных доменов, подходящие для этих конструкций, могут включать, например, G1m17.1 и G1m3.

Как используют в настоящем описании, "различные специфичности" указывают на то, что упоминаемые конструкции иммуноглобулинов (например, полноразмерное антитело, тяжелая цепь или другая конструкция, способная связывать конкретную мишень) связываются с различными сайтами-мишенями. Это может относиться к различным мишеням на одном и том же антигене, различным штаммам одного и того же патогена (например, различным вирусным штаммам) или к различным антигенам.

"Одинаковая специфичность" относится к способности иммуноглобулина связываться с конкретным сайтом-мишенью, который может присутствовать на нескольких штаммах патогена (например, вируса гриппа) или для одного или подмножества штаммов вируса или другого патогена. Подходящим образом, эти специфичности являются такими, что не существует значимого или поддающегося измерению связывания не с сайтами-мишенями.

Термин "гетерологичный", когда используют в отношении белка или нуклеиновой кислоты, указывает на то, что белок или нуклеиновая кислота содержит две или больше последовательности или подпоследовательности, которые не встречаются в том же взаимоотношении друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантным путем, имея две или больше последовательности из не родственных генов, расположенных так, чтобы получить новую функциональную нуклеиновую кислоту. Например, в одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота имеет промотор от одного гена, расположенный для того, чтобы управлять экспрессией кодирующей последовательности из другого гена. Таким образом, в отношении кодирующей последовательности промотор является гетерологичным. Термин "гетерологичная легкая цепь" представляет собой легкую цепь, содержащую переменный домен и/или константный домен из антитела, которое обладает специфичностью к мишени, отличной от специфичности тяжелой цепи.

Как используют повсюду в описании, форма единственного числа относится к одному или нескольким. По существу, форма единственного числа, "один или несколько" и "по меньшей мере один" используют взаимозаменяемо в настоящем описании.

Пока не определено иное в этом описании, технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в каком их обычно понимает специалист в данной области и посредством ссылки на опубликованные тексты, которые представляют специалисту в данной области общие указания в отношении многих терминов, используемых в настоящем описании.

Следующие примеры иллюстрируют способы получения и использования смеси AAV2/9 векторов,

в которой один экспрессирует нейтрализующее антитело к гриппу А широкого спектра действия, называемое FI6; другой экспрессирует нейтрализующее антитело к гриппу В широкого спектра действия, называемое CR8033. В одном из вариантов осуществления композицию, называемую в настоящем описании GTP101, готовят в фосфат-буферном физиологическом растворе (PBS) с полной концентрацией соли, доведенной до 200 мМ, 0,001% (мас./об.) Pluronic F68 и 5% глицерина. AAV2/9 вводят интраназально (IN) после разведения в стерильном буферном растворе на уровне 4 доз. Начальные уровни доз выбраны на основании доклинических данных об эффекте и уточнены на основании не клинической оценки безопасности, при наивысшей дозе, ограниченной концентрацией, которой можно достичь без агрегации AAV векторных частиц. Диапазон доз от  $3 \times 10^{12}$  до  $2,4 \times 10^{13}$  копий генома (к.г.) вводили в виде  $4 \times 0,2$  мл на ноздрю через атомизирующее устройство для слизистой внутри носа (IMAD). Понятно, что данное изобретение охватывает вариации этих иллюстративных исследований. Например, можно использовать другие средства для интраназального введения, другие дозы, объемы и другие схемы. Дополнительно, композицию можно адаптировать для других путей введения.

Следующие примеры являются только иллюстративными и не являются ограничением изобретения, описанного в настоящем документе.

Пример 1. AAV векторы.

Разрабатывали, клонировали и упаковывали AAV9 векторы, экспрессирующие тяжелые и легкие цепи моноклональных антител FI6v3 и CR8 033 под управлением гибрида энхансера цитомегаловируса промотора  $\beta$ -актина курицы. цис-Плазмиды, используемые для того, чтобы конструировать каждый вектор, использованный в дальнейших исследованиях, представлены в SEQ ID NO: 1 (FI6v3) и SEQ ID NO: 8 (CR8033), которые включены по ссылке вместе и их признаками. AAV9 векторы создавали с использованием тройной трансфекции МСВ-клеток HEK293 человека с использованием способов, которые описаны ранее, например, в опубликованной патентной заявке США № US 2009/0275107; также см. M. Lock et al., Hum. Gene Ther., 2010; 21(10):1259-1271.

МСВ-клетки HEK293 человека трансфицируют с использованием:

(i) плазмид с геномами векторов,

(ii) AAV плазмиды-помощника, называемой pAAV2/9.KanR, которая содержит гены *her2* и *cap9* AAV дикого типа, и

(iii) аденовирусной плазмиды-помощника, называемой pAdAF6(Kan).

Размер геномов упакованных векторов GTP101 составляет 1) AAV-FI6: 4650 н. и 2) AAV-CR8033: 4585 н. Также можно использовать другие способы с использованием продуцентных клеточных линий бакуловирусных систем. Альтернативные цис-плазмиды и векторы можно создавать с использованием других кодирующих последовательностей, предусмотренных в настоящем описании.

А. Плазида 1 с геномом AAV вектора GTP101: pAAV.CB7.CI.FI6.RBG.

Плазида pAAV.CB7.CI.FI6.RBG с геномом вектора mAb AAV-FI6 (p3193) составляет 7471 п.о. в размере (фиг. 7B). Геном вектора, полученный из этой плазмиды, представляет собой одноцепочечный ДНК геном с ITR, полученными из AAV2, которые фланкируют экспрессирующую mAb кассету. Кодирующие последовательности FI6 кодируют mAb со специфичностью к гриппу А. Экспрессией с кассет трансгенов управляет промотор CB7, гибрид между предранним энхансером (C4) цитомегаловируса (CMV) и промотором бета-актина курицы, тогда как транскрипцию с этого промотора усиливает присутствие интрона бета-актина курицы (CI). 5'-Нетранслируемую область (UTR) гена *c-myc* человека располагают выше по направлению считывания от кодирующей mAb области в качестве энхансера трансляции. Сигналом поли-А для экспрессирующей кассеты является поли-А бета-глобина кролика (RBG). Лидерные (сигнальные) пептиды предшествуют как тяжелым, так и легким цепям антитела и опосредуют секрецию антитела из трансдуцированной клетки. Тяжелую и легкую цепи разделяет линкер, содержащий сайт расщепления фурина и последовательность FMDV 2A. Этот линкер опосредует посттрансляционное расщепление тяжелой и легкой цепей и, за исключением одной замены аминокислоты (концевой лизин в тяжелой цепи заменен остатком аргинина), полностью удаляется из конечного mAb продукта. Кассету трансляции антитела, содержащую 5'-UTR и кодирующую mAb последовательность с оптимизацией кодонов, синтезировали *de novo* и субклонировали в pZac2.1, чтобы получить p3191. Впоследствии осуществляли челночный перенос кассеты гена в остов CB7, pN406 с использованием ферментов NheI/NotI для того, чтобы заменять полилинкер на кассету трансляции антитела, чтобы получить pAAV.CB7.CI.FI6.RBG (p3193). Все составляющие части плазмиды верифицированы посредством прямого секвенирования с использованием Qiagen Genomic Services.

В. Плазида 2 с геномом AAV вектора GTP101: pAAV.CB7.CI.CR8 033.RBG.

Плазида pAAV.CB7.CI.CR8033.RBG с геномом вектора mAb AAV-CR8033 (p3523) составляет 7462 п.о. в размере. Геном вектора, полученный из этой плазмиды, представляет собой одноцепочечный ДНК геном с инвертированными концевыми повторами (ITR), полученными из AAV2, которые фланкируют экспрессирующую mAb кассету. Кодирующие CR8033 последовательности кодируют mAb со специфичностью к гриппу В. Экспрессией с кассет трансгенов управляет промотор CB7, гибрид между предранним энхансером (C4) цитомегаловируса (CMV) и модифицированным промотором бета-актина

курицы, тогда как транскрипцию с этого промотора усиливает присутствие интрона бета-актина курицы (C1). Усеченный 5'-UTR гена *c-myc* человека располагают выше по направлению считывания от кодирующей mAb области в качестве энхансера трансляции. Сигналом поли-А для экспрессирующей кассеты является поли-А бета-глобина кролика (RBG). Лидерные (сигнальные) пептиды предшествуют как тяжелой, так и легкой цепям антитела и опосредуют секрецию антитела из трансдуцированной клетки. Тяжелую и легкую цепи разделяет линкер, содержащий сайт расщепления фурина и последовательность FMDV 2A. Этот линкер опосредует посттрансляционное расщепление тяжелой и легкой цепей и, за исключением одной замены аминокислоты (концевой лизин в тяжелой цепи заменен на остаток аргинина), полностью удаляется из конечного mAb продукта. Кассету трансляции антитела, содержащую 5'-нетранслируемую область и кодирующую mAb последовательность с оптимизацией кодонов, кодирующую mAb TCN032, синтезировали *de novo* и субклонировали в pZac2.1, чтобы получить p3187. Легкую цепь TCN032 заменяли на "универсальную" легкую цепь, взятую из pAAV.CB7.C1.F16.RBG (p3193), описанного выше, с использованием сайтов ферментов EcoRV/BsiWI. В кодирующей последовательности тяжелой вариабельной цепи CR8033 проводили оптимизацию кодонов, синтезировали *de novo* и использовали для замены тяжелой вариабельной цепи TCN032 через участки рестрикции SphI/SalI. Осуществляли челночный перенос всей трансляционной кассеты в плазмиду с остовом и промотором CB7, pN437 с использованием ферментов SphI/NotI, чтобы заменять кассету трансляции TCN032 на кассету трансляции CR8033 и создавать плазмиду pAAV.CB7.C1.CR8033.RBG (p3523). Все составляющие части плазмиды верифицировали посредством прямого секвенирования с использованием Qiagen Genomic Services.

#### С. Клонирование канамицинового остова.

Кассеты трансгенов из (pAAV.CB7.C1.F16.RBG (p3193) и pAAV.CB7.C1.CR8033.RBG (p3523) клонируют во фланкированную AAV2 ITR конструкцию. Остов плазмиды в этой конструкции получают из pZac2.1, плазмиды на основе pKSS, и он содержит ген устойчивости к канамицину. Конечные плазмиды с геномами векторов представляют собой pAAV.CB7.C1.F16.RBG.KanR и pAAV.CB7.C1.CR8033.RBG.Kan. Все составляющие части конечных плазмид с геномами векторов верифицируют посредством секвенирования и подтверждают последовательности в качестве части GMP производственного процесса.

#### Д. Описание элементов последовательностей.

1. Инвертированные концевые повторы (ITR): AAV ITR (GenBank No. NC001401) представляют собой последовательности, которые идентичны на обоих концах, но в противоположной ориентации. Последовательности AAV2 ITR выполняют функцию как точки начала репликации ДНК вектора, так и сигнала упаковки генома вектора, когда AAV и аденовирусные хелперные функции представляют в транс. По существу, последовательности ITR представляют только *цис*-последовательности, необходимые для репликации генома вектора и упаковки.

2. Преданный энхансер цитомегаловируса (CMV) (260 п.о., C4; GenBank No. K03104.1). Этот элемент присутствует в обеих плаزمиде с геномами векторов.

3. Промотор бета-актина курицы (281 п.о.; CB; GenBank No. X00182.1) промотор и используют для управления экспрессией антител на высоком уровне. Этот элемент присутствует в обеих плаزمиде с геномами векторов.

4. Интрон бета-актина курицы: интрон 875 п.о. из гена бета-актина курицы (GenBank No. X00182.1) присутствует в экспрессирующей кассете вектора. Интрон участвует в транскрипции, но удаляется из зрелой мРНК посредством сплайсинга, соединяя вместе последовательности по обеим его сторонам. Присутствие интрона в экспрессирующей кассете показано для того, чтобы содействовать транспортировке мРНК из ядра в цитоплазму, таким образом усиливая накопление постоянного уровня мРНК для трансляции. Это является обычным признаком у векторов с генами, которые предназначены для повышенного уровня экспрессии гена. Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

5. *c-myc* 5'-UTR: нуклеотиды 381-428 мРНК гомолога вирусного онкогена миелоцитоматоза птиц *v-myc* Homo sapiens (MYC) (номер доступа GenBank NM002467). Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

6. кДНК лидерного (сигнального) пептида: синтезировали последовательность кДНК с оптимизацией кодонов (номер доступа GenBank AAB8686.1), предшествующую тяжелой цепи F16 и совпадающую с ней рамкой считывания.

7. кДНК тяжелой вариабельной цепи F16v3: синтезировали последовательность кДНК с оптимизацией кодонов человека (номер доступа GenBank AEL31303.1).

8. кДНК лидерного (сигнального) пептида: синтезировали последовательность кДНК с оптимизацией кодонов (ILco2, описанная в [Zhang, L., Q. Leng, и A.J. Mixson, J. Gene Med., 2005. 7(3), p. 354-6]), предшествующую тяжелой цепи CR8033 и совпадающую с ней рамкой считывания.

9. кДНК тяжелой вариабельной цепи CR8033: синтезировали последовательность кДНК человека с оптимизацией кодонов (номер доступа GenBank AFP87542.1).

10. Константная тяжелая 1 (CH1) цепь: синтезировали кДНК с оптимизацией кодонов (номер дос-

тупа GenBank BAF64540.1). Этот элемент присутствует в обеих плаزمиде с геномами векторов.

11. Fc-цепь CR8033 (CH2-3): синтезировали кДНК с оптимизацией кодонов (номер доступа GenBank 226787), за исключением C-концевого лизина, который заменяли на аргинин).

12. Fc-цепь FI6 (CH2-3): с помощью GeneArt синтезировали кДНК с оптимизацией кодонов (номер доступа GenBank 2J6E\_A), за исключением C-концевого лизина, который заменяли на аргинин, и положения 57, где аспарагиновая кислота заменяла глутаминовую кислоту.

13. кДНК лидерного (сигнального) пептида: синтезировали последовательность кДНК с оптимизацией кодонов, которая предшествует универсальной легкой цепи (ILhy1, которая описана в [Zhang et al., цитировано выше).

14. кДНК универсальной легкой цепи: синтезировали последовательность кДНК человека с оптимизацией кодонов (номер доступа GeBank ACJ71709.1). Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

15. кДНК константной легкой цепи: синтезировали последовательность кодонов человека (номер доступа GenBank AGH7 0219.1). Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

16. Участок узнавания фурина: синтезировали аргинин-лизин-аргинин-аргинин и кДНК с оптимизацией кодонов. Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

17. Линкер F2A: синтезировали пептид из 24 аминокислот, полученный из FMDV (GenBank No. CAA2436.1), и кДНК с оптимизацией кодонов. Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

18. Сигнал полиаденилирования: сигнал полиаденилирования 127 п.о. бета-глобина кролика (GenBank No. V00882.1) представляет цис-последовательности для эффективного полиаденилирования мРНК антитела. Этот элемент выполняет функцию сигнала терминации транскрипции, события специфического расщепления на 3'-конце образующегося транскрипта, и добавления длинного полиаденилового хвоста. Этот элемент присутствует в обеих плазмиде с геномами векторов.

Е. AAV2/9 плазида-помощник pAAV2.9.KanR.

Эта AAV2/9 плазида-помощник p5E18.AAV2/9n (p0061; 7330 п. о.) представляет собой AAV плазмиду-помощника, которая кодирует четыре белка AAV2 гер дикого типа и три капсидных белка AAV VP дикого типа из серотипа 9 AAV [J. Virol. 2004 Ju; 78(12):6381-8].

Для того чтобы создавать химерную упаковочную конструкцию, ген AAV2 сар из плазмиды p5E18, содержащей AAV2 гены гер и сар дикого типа, удаляли и заменяли на ПЦР-фрагмент из AAV2/9 гена сар, амплифицированный с ДНК печени, чтобы получить плазмиду p5E18VD2/AAV2/9. Следует отметить, что AAV промотор р5, который обычно управляет экспрессией гер, перемещают в этой конструкции с 5'-конца гер на 3'-конец сар. Это расположение служит для введения спейсера между промотором и геном гер (т.е. остовом плазмиды), понижающей регуляции экспрессии гер и увеличения способности поддерживать продуцирование вектора. Остов плазмиды в p5E18 происходит из pBluescript KS. Все составляющие части плазмиды верифицировали посредством прямого секвенирования. Ген устойчивости к ампициллину заменяют на ген устойчивости к канамицину, чтобы получить pAAV2/9n.KanR.

Ф. Аденовирусная плазида-помощник pAdDeltaF6(Kan).

Плазида pAdDelta ( $\Delta$ )F6(Kan) имеет размер 15774 п.о.

Плазида содержит области аденовирусного генома, которые важны для репликации AAV, а именно РНК E2A, E4 и VA (функции E1 аденовируса обеспечивают клетки 293), но не содержит другие аденовирусные репликационные или структурные гены. Плазида не содержит цис-элементы, критичные для репликации, такие как аденовирусные инвертированные концевые повторы, и, следовательно, не ожидают создания инфекционного аденовируса. Ее получали из молекулярного клона Ad5 с удаленными E1 и E3 (pBHG10, плазида на основе pBR322). Делеции вводили в ДНК Ad5 для того, чтобы устранять экспрессию не необходимых аденовирусных генов и снижать количество аденовирусной ДНК с 32 до 12 т.о.). Наконец, ген устойчивости к ампициллину заменяли на ген устойчивости к канамицину, чтобы получать pAdAF6(Kan). Аденовирусные гены E2, E4 и VAI, которые остаются в этой плазмиде, наряду с E1, который присутствует в клетках HEK293, необходимы для продуцирования AAV вектора.

Пример 2. Производственный процесс.

Клетки культивируют 10-слойных Corning CellStack (CS-10) и HS-36 и все открытые манипуляции осуществляют в помещениях со II классом биологической безопасности в среде ISO 5 класса. Процесс очистки осуществляют в закрытой системе, где возможно, однако, манипуляции при колоночной хроматографии не рассматривают как полностью закрытую систему. Для того чтобы минимизировать этот риск, используют пути потоков одноразового использования в качестве части производственной передвижной платформы для колоночной хроматографии GE ReadyMate. После очистки колоночной хроматографией продукт подвергают диафильтрации с использованием конечного состава буфер (1x PBS (200 mM NaCl) 0,001% Pluronic F68, 5% глицерина) и стерильному фильтрованию, чтобы получить BDS, который замораживают при  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ . После тестирования BDS, BDS размораживают, объединяют и разводят по мере необходимости стерильным буфером конечного состава и фильтруют на SAFC в его Fill Suite. В случае, когда два компонента вектора GTP101 производят отдельно, компоненты смешивают в

соотношении 1:1 перед заполнением.

Обзор производственного процесса приведен на фиг. 2.

А. Посев клеток: клетки НЕК293 экспрессируют продукты генов E1a и E1b, необходимые для производства высокого титра гAAV. Клетки НЕК293 являются прилипающими и высокоподверженными трансфекции, что дает высокие титры гAAV при трансфекции ДНК плазмидой. Клетки размножают до  $5 \times 10^9$ - $5 \times 10^{10}$  клеток, используя Corning T-flask и CS-10, которые позволяют создавать достаточную клеточную массу, чтобы засеивать 20 HS-36 для продуцирования вектора на BDS партию. Клетки культивируют в среде, состоящей из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), с добавлением 10% гамма-облученной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) из Новой Зеландии. Клетки являются субстрат-зависимыми, и нарушение ассоциации клеток выполняют с использованием TrypLE Select, реактива для нарушения ассоциации не животных клеток. Посев клеток выполняют с использованием стерильных одноразовых наборов мешков и трубок для биопроцессов. Клетки содержат при 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), в атмосфере 5% ( $\pm 0,5\%$ ) CO<sub>2</sub>.

В. Временная трансфекция: после 3 суток роста (среды DMEM+10% FBS) среды клеточной культуры HS-36 заменяют на свежие бессывороточные среды DMEM и трансфицируют тремя продуцирующими плазмидами, используя оптимизированный способ трансфекции на основе PEI. Все плазмиды, используемые в процессе получения, производит Aldevron Inc. с использованием их системы качества GMP-Source™ и инфраструктуры, используя наиболее характерные признаки cGMP производства; прослеживаемость, контроль документов и сегрегация материалов.

Достаточный комплекс для трансфекции ДНК плазмидой подготавливают в BSC для того, чтобы трансфицировать 20 HS-36 (на BDS партию). Изначально получают смесь ДНК/PEI, содержащую 3,0 мг плазмиды с геномом вектора pAAV.CB7.CI.FI6.RBG.KanR или pAAV.CB7.CI.CR8033.RBG.KanR, 60 мг pAdDeltaF6(Kan), 30 мг AAV плазмиды-помощника pAAV2.rh10.KanR и PEI марки GMP (PEIPro, PolyPlus Transfection SA). В альтернативном случае, когда используют смешанные трансфекции плазмидами с геномом вектора, используют 1,5 мг каждой из двух цис-плазмид. После хорошего перемешивания раствор оставляют стоять при комнатной температуре в течение 25 мин, и затем добавляют в бессывороточные среды для того, чтобы гасить реакцию, и затем добавляют в HS-36. Смесь для трансфекции выравнивают между всеми 36 слоями в HS-36 и клетки инкубируют при 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) в атмосфере 5% ( $\pm 0,5\%$ ) CO<sub>2</sub> в течение 5 суток.

С. Сбор клеточных сред: трансфицированные клетки и среды собирают из каждого HS-36 с использованием одноразовых мешков для биопроцессов посредством асептического дренирования среды из блоков. После сбора среды в объем ~80 л добавляют MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 2 мМ (кофактор для бензоназы) и добавляют нуклеазу бензоназу (№ по каталогу: 1.016797.0001, Merck Group) до конечной концентрации 25 Ед./мл. Продукт (в одноразовом мешке для биопроцессов) инкубируют при 37°C в течение 2 ч в инкубаторе, чтобы представить достаточное время для ферментативного расщепления остаточной клеточной и плазмидной ДНК, присутствующей в урожае в результате процедуры трансфекции. Эту стадию осуществляют для того, чтобы минимизировать количество остаточной ДНК в конечном векторном FDP. После периода инкубации добавляют NaCl до конечной концентрации 500 мМ, чтобы содействовать извлечению продукта во время фильтрации и последующему тангенциальному поточному фильтрованию (см. далее стадии 4 и 5).

Д. Осветление: клетки и клеточный дебрис удаляют из продукта с использованием капсулы объемного фильтра (1,2 мкм/0,22 мкм), соединенного последовательно в виде стерильного закрытого набора из трубки и мешка, которые приводит в действие перистальтический насос. Осветление гарантирует, что нижележащие фильтры и хроматографические колонки будут защищены от засорения, а снижение бионагрузки на фильтрование гарантирует, что в конце серии фильтров какая-либо биоагрузка, потенциально введенная во время предшествующего процесса получения, будет удалена прежде очистки, идущей ниже по потоку операций. Среда пропускают через капсульный фильтр Sartorius Sartoguard PES (1,2/0,22 мкм) (Sartorius Stedim Biotech Inc.).

Е. Крупномасштабное тангенциальное поточное фильтрование: снижение объема (10-кратное) осветленного продукта достигают с использованием тангенциального поточного фильтрования (TFF), используя специальный стерильный замкнутый набор из трубки, мешка и мембраны для биообработки, производимый в Spectrum Labs. Принцип TFF состоит в протекании раствора под давлением параллельно мембране подходящей пористости (100 кДа). Разность давлений перемещает молекулы меньшего размера через мембрану и эффективно в поток отходов, при этом удерживая молекулы больше пор мембраны. Посредством рециркуляции раствора параллельный поток "метет" по поверхности мембраны, предотвращая засорение пор мембраны. Выбирая подходящие размер пор мембраны и площадь поверхности, можно быстро снижать объем жидкого образца, при этом удерживая и концентрируя желаемую молекулу. Диафильтрование в TFF применениях включает добавление свежего буфера в рециркулирующий образец с той же скоростью, с которой жидкость проходит через мембрану и в поток отходов. Увеличивая объем диафильтрования, из рециркулирующего образца удаляют возрастающие количества низкомолекулярных соединений. Это ведет к умеренной очистке осветленного продукта, но также позволяет до-

биться замены буфером, совместимым с последующей стадией аффинной колоночной хроматографии. Соответственно, 100 кДа PES мембрану (Spectrum Labs) используют для концентрирования, затем осуществляют диафильтование с использованием 4 объемов буфера, состоящего из: 20 mM Tris pH 7,5 и 400 mM NaCl. Диафильтованный продукт хранят в течение ночи при 4°C и затем дополнительно осветляют с использованием капсулы 1,2 мкм/0,22 мкм объемного фильтра для того, чтобы удалять какой-либо преципитированный материал.

F. Аффинная хроматография: диафильтованный продукт наносят на аффинную смолу Capture Select™ Pogos-AAV2/9 (Life Technologies), которая эффективно захватывает серотип AAV2/9. При этих ионных условиях значительная процентная доля остаточной клеточной ДНК и белков течет через колонку, и при этом происходит эффективный захват AAV частиц. После нанесения колонку промывают для того, чтобы удалять дополнительные внесенные примеси, после чего следует пошаговое элюирование при низком pH (400 mM NaCl, 20 mM цитрата натрия; pH 2,5), который незамедлительно нейтрализуют посредством сбора в 1/10 объема нейтрализующего буфера (бис-трис пропан, 200 mM, pH 10,2).

G. Анионообменная хроматография: для достижения дополнительного снижения технологических примесей, включая пустые AAV частицы, объединенный Pogos-AAV2/9 элюат разводят 50-кратно (20 mM бис-трис пропан, 0,001% Pluronic F68; pH 10,2) для того, чтобы снизить ионную силу, чтобы сделать возможным связывание с монолитной матрицей CIMultus Q (BIA Separations). После промывания при низкой соли векторный продукт элюируют с использованием 60 CV линейного градиента соли NaCl, 10-180 mM NaCl). Этот пологий градиент соли эффективно отделяет капсидные частицы без генома вектора (пустые частицы) от частиц, содержащих геном вектора (полные частицы), и ведет к препарату, который главным образом не содержит пустые капсиды. Фракции собирают в пробирки, содержащие 1/100 объема 0,1% Pluronic F68 и 1/27 объема бис-трис pH 6,3, чтобы минимизировать неспецифическое связывание с пробирками и длительность воздействия высоким pH соответственно. Чистоту пика и фракции с элюированным урожаем идентифицируют посредством qPCR, объединяют и хранят при 4°C до конечного приготовления с использованием TFF. Данные qPCR о титре AEX объединенного продукта используют для того, чтобы оценивать целевой конечный объем для достижения титра  $2 \times 10^{13}$  к.г./мл для конечного приготовления (стадия, следующая непосредственно далее).

H. Конечное приготовление и стерилизующее фильтрование для получения BDS: TFF используют для получения конечного состава из объединенных AEX фракций с использованием 100 кДа мембраны (Spectrum Labs, Inc.). Этого достигают посредством диафильтования с 4 объемами буфера для приготовления (1× PBS (200 mM NaCl) 0,001% Pluronic F68, 5% глицерин) и концентрируют до вычисленного объема, чтобы получить целевую концентрацию. После диафильтования выполняют окончательное фильтрование продукта через 0,22 мкм фильтр (Millipore, Billerica, MA) для получения BDS. Образцы изымают для тестирования BDS (описано в разделе далее). Фильтрованную очищенную партию хранят в стерильных полипропиленовых пробирках и замораживают при  $\leq -60^\circ\text{C}$  в месте под карантином до выпуска для конечного заполнения.

I. Конечное заполнение: замороженный BDS размораживают (и объединяют, при необходимости) и заполняют им West Pharmaceutical 2 мл стеклянные сосуды "Ready-to-Use" (предварительно стерилизованные) с 13 мм пробками и уплотнителем при объеме заполнения от  $\geq 0,6$  до  $\leq 2,0$  мл на флакон. Операции заполнения происходят в соответствии со стандартизованными операциями заполнения, обеспечиваемыми техником, и квалификационное испытание процесса на SAFC. По завершении конечного заполнения осуществляют мониторинг всех операторов, работающих в блоке заполнения, с использованием чашек RODAC (чтобы обнаруживать жизнеспособные твердые частицы) на их стерильных перчатках, когда они оставляют BSC. Также осуществляют мониторинг поверхности BSC на жизнеспособные организмы по завершении заполнения. SAFC QC инспектирует флаконы по внешнему виду, твердым частицам, объему и целостности. Индивидуально помечаемые флаконы метят так, чтобы включить номер протокола, название продукта, номер партии, номер местоположения, и хранят в помеченных ящиках. Помеченные флаконы переносят в карантин  $\leq -60^\circ\text{C}$  до выпуска.

J. ddPCR титр к.г.: точность и надежность количественного ПЦР (qPCR) титрования копий генома (к.г.) являются превосходными для контроля качества AAV и дозирования вектора. Титры геномов измеряют с помощью нового способа qPCR на основании капельной цифровой ПЦР [Lock, M., et al., Absolute determination of single-stranded and self-complementary adenoassociated viral vector genome titers by droplet digital PCR. Hum Gene Ther Methods, 2014. 25(2), p. 115-25], который дает беспрецедентную точность и воспроизводимость. Обнаружение ДНК выполняют с использованием праймеров со специфичностью к определенным последовательностям и флуоресцентно меченых зондов, нацеленных на кодирующие области F16 и CR8033, чтобы сделать возможным количественное определение геномов-компонентов в FDP. Вдобавок, праймеры и зонды, нацеленные на область поли-А RBG, используют для того, чтобы определять общее содержание генома FDP. В анализ введено множество стандартов, валидирующих образцов и контролей (для фона и ДНК контаминации). Анализ квалифицируют по установлению и определению параметров анализа, включая чувствительность, предел обнаружения, диапазон квалификации и воспроизводимость между анализами и внутри анализа. Внутреннюю эталонную партию AAV2/9, полу-

ченную с использованием вновь разработанного процесса получения, устанавливают и используют для того, чтобы осуществлять квалификационные исследования. Следует отметить, что предыдущий опыт авторов изобретения подсказывает, что титр, получаемый посредством капельной цифровой ПЦР, обычно в 2 раза выше того, что получают посредством стандартного способа рPCR авторов изобретения. После квалификации нового способа титрования все предыдущие тестовые изделия, использованные в пилотных исследованиях, описанных в разделах 6 и 8, следует повторно анализировать и корректировать дозирование. Это может влиять на фактическое дозирование, используемое в не клинических и клинических исследованиях, хотя ожидание состоит в том, что разница не будет более чем двукратной.

L. Инфекционный титр: анализ инфекционных единиц (IU) используют для того, чтобы определять продуктивных захват и репликацию вектора GTP101 в клетках RC32 (экспрессирующие гер2 клетки HeLa). 96-луночный формат с конечной точкой использовали подобно тому, что опубликовано ранее. В кратком изложении, клетки RC32 совместно инфицируют серийными разведениями GTP101 BDS и единообразным разведением Ad5 с 12 повторениями при каждом разведении gAAV. Через 72 ч после инфекции клетки лизируют и проводят qPCR для того, чтобы обнаруживать амплификацию gAAV вектора через ввод. Вычисление TCID<sub>50</sub> при разведении в конечной точке (Спирман-Карбер) осуществляют для того, чтобы определять репликативный титр, выраженный в виде IU/мл. Поскольку значения "инфекционности" зависят от частиц, вступающих в контакт с клетками, связывания с рецептором, интернализации, транспортировки в ядро и репликации генома, на них влияет геометрия анализа и присутствие подходящих рецепторов и путей после связывания в используемой клеточной линии. Рецепторы и пути после связывания обычно не сохраняются в иммортализованных клеточных линиях, и, таким образом, титры анализа инфекционности не являются абсолютной мерой числа присутствующих "инфекционных" частиц. Однако соотношение капсидированных к.г. и "инфекционных единиц" (описываемое как соотношение к.г./IU) можно использовать в качестве меры соответствия продукта от партии к партии.

M. ДНК клетки-хозяина (человека) qPCR анализ используют для того, чтобы обнаруживать остаточную ДНК 293 человека в BDS. После внесения "не релевантной ДНК" общую ДНК (не релевантную, векторную и остаточную геномную) извлекают из ~1 мл продукта. ДНК клетки-хозяина количественно определяют с использованием qPCR, нацеленной на ген 18S rDNA. Количества обнаруживаемой ДНК нормализуют на основании извлечения внесенной не релевантной ДНК.

N. Белок клетки-хозяина (человека).

ELISA выполняют на BDS образце для того, чтобы измерять уровни контаминирующих белков клеток-хозяев HEK 293. Используют набор Cygnus Technologies HEK293 Host Cell Proteins 2nd Generation ELISA. Образцы и предварительно разведенные стандарты HEK293 HCP добавляют в микротитровальные лунки, предварительно покрытые аффинно-очищенным иммобилизованным антителом против HEK293 HCP, наряду с конъюгированным с пероксидазой поликлональным идентифицирующим антителом против HEK293 HCP. После инкубации лунки промывают для того, чтобы удалять несвязанные реагенты и добавляют ТМВ, субстрат пероксидазы. После проявления реакцию останавливают с использованием раствора серной кислоты. Поглощение получаемого окрашенного продукта измеряют с использованием считывателя микропланшетов и количество HEK293 HCP в каждом образце вычисляют по калибровочной кривой.

O. AAV, компетентный для репликации (гсAAV).

В качестве части плана тестирования BDS образец GTP101 FDP анализируют на присутствие AAV2/9, компетентного для репликации, (гсAAV) который потенциально может возникать во время процесса получения. Разработан анализ с тремя пассажами, который состоит из амплификации и пассирования на основе клеток, после чего следует обнаружение гсAAV ДНК посредством qPCR в реальном времени (мишень сар9). Компонент на основе клеток состоит из инокулирования монослоев клеток HEK293 (P1) разведениями тестового образца и аденовируса человека 5 типа дикого типа (Ad5). 10<sup>10</sup> DRP векторного продукта является максимальным количеством тестируемого продукта. Из-за присутствия аденовируса, компетентного для репликации, AAV будет амплифицироваться в клеточной культуре. После двух суток получают клеточный лизат и инактивируют Ad5 теплом. Затем осветленный лизат пассируют во втором раунде клеток (P2) для того, чтобы максимизировать чувствительность (снова присутствие Ad5). После 2 суток получают клеточный лизат и инактивируют Ad5 теплом. Затем осветленный лизат пассируют в третьем раунде клеток (P3) для того, чтобы максимизировать чувствительность (снова присутствие Ad5). После 2 суток клетки лизируют, чтобы высвободить ДНК, которую затем подвергают qPCR для того, чтобы обнаруживать последовательности AAV2/9 сар. Амплификация последовательностей AAV2/9 сар Ad5-зависимым образом указывает на присутствие гсAAV. Использование AAV2/9 суррогат-положительного контроля, содержащего гены AAV2 гер и AAV2/9 сар, позволяет определять предел обнаружения (LOD) анализа (0,1, 1 10 и 100 IU), и с использованием серийного разведения вектора GTP101 (1×10<sup>10</sup>, 1×10<sup>9</sup>, 1×10<sup>8</sup>, 1×10<sup>7</sup> DRP) приблизительный уровень гсAAV, присутствующего в тестовом образце, можно определять количественно.

P. Биологическая активность in vitro.

Чтобы связать qPCR титр к.г. с экспрессией гена, выполняют биологический анализ in vitro посредством трансдукции клеток HEK293 известным количеством к.г. на клетку и измерения секретри-

рованной экспрессии FI6 и CR8033 через 72 ч после трансдукции с использованием антиидиотипического ELISA со специфичностью к двум mAb. Сравнение с высокоактивными доклиническими препаратами и препаратами тох вектора делает возможной интерпретацию активности продукта.

Q. Общий белок, капсидный белок и определение чистоты белка.

В образцах векторов сначала количественно определяют общий белок по белковой калибровочной кривой для бычьего сывороточного альбумина (BSA), используя анализ с бичинхоиновой кислотой. Определение выполняют посредством смешивания равных частей образца с реактивом Micro-BCA, представленным в наборе. Ту же процедуру применяют к разведениям BSA Standard. Смеси инкубируют при 60°C и измеряют поглощение при 562 нм. Калибровочную кривую создают по поглощению стандартов известных концентраций с использованием четырехпараметрической аппроксимации. Неизвестные образцы количественно определяют в соответствии с четырехпараметрической регрессией.

Чтобы обеспечить полуколичественное определение чистоты AAV, после этого образцы нормализуют по титру генома и  $5 \times 10^9$  к.г. разделяют на SDS-полиакриламидном (SDS-PAGE) геле. Затем гель окрашивают красителем SYPRO Ruby. Полосы каких-либо примесей количественно определяют посредством сравнения с совместно подвергаемыми электрофорезу стандартами BSA 25, 50 и 100 нг белка на дорожку. Эти количества представляют 1, 2 и 4% образца общего белка AAV. Окрашенные полосы, которые выглядят дополнением к трем конкретным белками VP1, VP2 и VP3 AAV, считают белковыми примесями. Все полосы примесей сравнивают с эталонными белками и сообщают процент примесей по массе, а также приблизительную молекулярную массу. SDS-PAGE гели также используют для того, чтобы количественно определять белки VP1, VP2 и VP3 и определять их соотношение.

R. Белок BSA.

Этот анализ осуществляют для тестирования перед выпуском с использованием набора Bovine Albumin ELISA, полученного из Bethyl Laboratories. Этот набор представляет собой сэндвич ELISA. BSA, присутствующий в тестовом образце, захватывают с помощью антитела против бычьего альбумина, которое предварительно адсорбировано на поверхности микротитровальных лунок. После связывания образца смывают несвязанные белки и молекулы и добавляют биотинилированное идентифицирующее антитело в лунки, чтобы связываться с захваченным альбумином. Затем добавляют конъюгированную со стрептавидином пероксидазу хрена (SA-HRP) для того, чтобы катализировать колориметрическую реакцию с хромогенным субстратом TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Колориметрическая реакция дает синий продукт, который становится желтым, когда реакцию останавливают посредством добавления разбавленной серной кислоты. Поглощение желтого продукта при 450 нм пропорционально количеству анализируемого вещества альбумина, присутствующего в образце, и можно создавать четырехпараметрическую калибровочную кривую. Затем можно количественно определять концентрации альбумина в тестовых образцах посредством интерполяции их поглощения по калибровочной кривой, созданной параллельно с образцами. После факторизации разведений образцов, наконец, можно вычислять концентрации альбумина в исходном образце.

S. Эндонуклеаза бензоназа.

Бензоназу используют в процессе получения для деградации нуклеиновых кислот, чтобы содействовать очистке вектора, и по существу представляет технологическую примесь. Для тестирования перед выпуском используют коммерческий ELISA, чтобы измерять концентрацию остаточной бензоназы. Поскольку количество бензоназы, скорее всего, представляет собой следовое количество, если вообще имеет место, необходимо осуществлять ELISA с использованием спектра стандартов, который включает концентрации  $<1$  нг/мл.

T. Соотношение к.г. и IU.

Соотношение к.г./IU представляет собой меру соответствия продукта. qPCR титр (к.г./мл) делят на анализ "инфекционных единиц" (IU/мл), чтобы получать вычисленное соотношение к. г./IU.

U. Осмоляльность, pH и тестирование внешнего вида.

Эти анализы осуществляют для тестирования перед выпуском посредством BREL, используя протоколы тестов осмоляльности по снижению температуры замерзания. Внешний вид продукта определяют посредством визуального осмотра на прозрачность, цвет и отсутствие/присутствие инородных частиц. Продукт осматривают на белом и черном фонах. pH в FDP определяют с использованием калиброванного pH микроэлектрода с компенсацией температуры.

Пример 3. Оценка индивидуальных компонентов GTP101.

A. Определение минимальной эффективной дозы (MED) AAV2/9.CB7.FI6, необходимой для того, чтобы защищать от летального заражения гриппом A AAV2/9.CB7.FI6 доставляли интраназально (IN) самкам мышей BALB/c в возрасте 6 недель в дозах в диапазоне от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{10}$  к.г./мышь и заражали IN с использованием 5 LD<sub>50</sub> адаптированного к мышам H1N1 (PR8) через 14 суток. Как показано на фиг. 3A, 3B, MED (которую определяли как дозу, необходимую для 100% зараженных мышей, чтобы пережить заражение с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8) для AAV2/9.CB7.FI6 у мышей составляет  $1 \times 10^9$  к.г./мышь, при частичной защите, которую придает сниженная на половину логарифма доза ( $3 \times 10^8$  к.г./мышь).

В сутки 14 трех мышей на группу лечения, которые не были заражены, умерщвляли для того, чтобы оценивать уровень экспрессии F16 на поверхностях дыхательных путей, а именно в текучем веществе бронхоальвеолярного лаважа (BALF) и текучем веществе назального лаважа (NLF). Как показано на фиг. 4А и 4В, количество Ab F16, которое измеряли на поверхности легкого (BALF) или носа (NLF), коррелировало с дозой AAV2/9 вектора. Количество антитела, секретированного в NLF, трудно определять точно из-за небольшого объема слоя жидкости на поверхности дыхательных путей мыши (ASL), который оценивают в 1 мкл.

Вирусную нагрузку (бляшкообразующие единицы; БОЕ) оценивали через 6 суток после заражения PR8 (фиг. 5) и обнаруживали, что для мышей, которых лечили с использованием  $1 \times 10^{10}$  к.г. AAV2/9.CB7.F16, их легкие были чисты от PR8, и значительное снижение вирусной нагрузки наблюдали у мышей, которых лечили с использованием  $3 \times 10^9$  к.г. и также  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.F16. Обнаружено, что обе эти дозы являются защитными от заражения гриппом.

В. Начало AAV2/9-профилактики ингаляционного гриппа.

Быстрое начало эффекта полезно, когда имеют дело со вспышкой гриппа, при которой необходимо короткое время ответа. По существу, интервал между IN доставкой AAV2/9.CB7.F16 и заражением с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8 меняли для того, чтобы определять, насколько быстро можно добиться защиты. Кратчайший интервал между лечением вектором и заражением составлял 8 ч. Мыши, которым предварительно вводили вакцину и которых заражали через 8 ч, теряли некоторый вес, но выздоравливали и переживали заражение (фиг. 6А и 6В).

С. Определение MED для AAV2/9.CB7.CR8033, которая необходима для того, чтобы защищать от летального заражения гриппом.

В параллельных исследованиях у AAV2/9, экспрессирующего Ab CR8033 против гриппа, оценивали потенциал к защите против заражения гриппом В. Самкам мышей BALB/c в возрасте 6 недель давали AAV2/9.CB7. CR8033 в дозах в диапазоне от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{10}$  к.г./мышь и заражали их IN с использованием 5 LD<sub>50</sub> адаптированного к мышам В/Lee/40. Через 14 суток авторы изобретения обнаружили, что, аналогичным образом, MED составляла  $1 \times 10^9$  к.г./мышь (фиг. 7А и 7В). Мыши не переживали заражение вирусом В/Lee/40, когда им давали IN сниженную на половину логарифма дозу  $3 \times 10^8$  к. г./мышь.

Д. Диссеминация AAV2/9 вектора после IN доставки мышам.

Важным аспектом безопасности стратегии AAV-опосредованной профилактики, описанной в настоящем документе, является нацеливание опосредованной вектором трансдукции на клетки с конечной дифференцировкой на дыхательных поверхностях. Определяли потенциал диссеминации AAV2/9 вектора по всему организму у мышей, которые пережили заражение PR8. Мышам давали AAV2/9.CB7.F16 в варьирующих дозах и после заражения вскрывали мышей и собирали ткани (легкие, печень, селезенка, яичники, головной мозг, сердце) для того, чтобы оценивать биораспределение вектора. При дозах вектора  $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$  к.г./мышь все мыши (5 на группу) переживали заражение. При всех дозах наибольшие количества геномов вектора находили в легких (например, при наивысшей дозе вектора соотношение AAV2/9 геномов в легких/печени составляло 1783). Для более высокой дозы  $1 \times 10^{10}$  к.г./мышь, GG/диплоидный геном не наблюдали в селезенке, головном мозге и сердце. Очень низкие уровни AAV2/9 вектора обнаруживали в печени и яичнике и, как ожидали, большинство копий AAV2/9 генома наблюдали в печени. У мышей, которых лечили с использованием  $3 \times 10^9$  к.г., AAV2/9 не обнаруживали в печени, яичниках и селезенке, и низкие уровни капсида наблюдали в головном мозге и сердце. Как ожидали, имело место снижение геномов вектора в легких. У мышей, которых лечили с использованием  $1 \times 10^9$  к.г., геном вектора, несмотря на значительное снижение, наблюдали только в легких. Для выживших в группе лечения  $3 \times 10^8$  к.г./мышь уровень копий AAV2/9 генома не поддавался обнаружению (ниже предела обнаружения, LD).

Присутствие геномов вектора/диплоидного генома

	Легкие	Печень	Селезенка	Яичники	Головной мозг	Сердце
$1 \times 10^{10}$ к. г.	0,1783	0,0001	<LD	0,0005	<LD	<LD
$3 \times 10^9$ к. г.	0,0178	<LD	<LD	<LD	0,0043	0,0003
$1 \times 10^9$ к. г.	0,0011	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
$3 \times 10^8$ к. г.	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Пример 4. Влияние смешивания двух AAV, оказываемое на защитный эффект против гриппа А и гриппа В.

Оценивали влияние на профилактику гриппа А и гриппа В посредством смешивания двух различных препаратов AAV. Мышам дозировали IN смесь из  $1 \times 10^9$  к.г. с AAV2/9.CB7.F16 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 и заражали их с использованием 5 LD<sub>50</sub> вируса PR8 или вируса В/Lee/40. Если имеет место взаимное мешающее влияние или конкуренция за связывание рецепторов, то защитный эффект будет значительно ниже по сравнению с защитой, которую придает введение одного защитного AAV2/9 вектора.

В первом случае смесь из  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 оценивали по защите от заражения с использованием PR8 и сравнивали с защитой от PR8, которую обеспечивали, когда доставляли только  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6. Как показано на фиг. 8, не наблюдали взаимного мешающего влияния.

Затем смесь из  $1 \times 10^9$  к.г. с AAV2/9.CB7.FI6 и  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033 оценивали по защите от заражения с использованием B/Lee/40 (гриппа В) и сравнивали с защитой против гриппа В, которую обеспечивали, когда доставляли только  $1 \times 10^9$  к.г. AAV2/9.CB7.CR8033. Как продемонстрировано на фиг. 9, взаимное мешающее влияние отсутствовало.

Пример 5. Эффективное повторное введение вектора и защита от заражения гриппом А.

Важный признак системы доставки AAV2/9 вектора состоит в том, что его можно вводить больше чем один раз. Чтобы имитировать ситуацию уже существующего иммунитета против капсида AAV2/9, авторы изобретения доставляли IN AAV2/9 вектор, экспрессирующий нерелевантный для гриппа продукт трансгена в дозах в диапазоне от  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{11}$  к.г./мышь. Через 28 суток оценивали уровень циркулирующих в сыворотке AAV2/9-специфичных нейтрализующих антител (NAb) (фиг. 10). Как ожидали, уровень AAV2/9 NAb в сыворотке был непосредственно пропорционален дозе AAV2/9, доставленного IN.

Затем предварительно иммунизированным AAV2/9 мышам давали  $1 \times 10^{11}$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6. Если NAb против капсида AAV2/9 предотвращал эффективное повторное введение AAV2/9, то предварительно иммунизированные мыши не выдержат заражения PR8. Несмотря на высокие уровни циркулирующего в сыворотке AAV2/9 Nab, которые достигали разведения сыворотки 1:5120,

AAV2/9.CB7.FI6 эффективно повторно вводили, что вело к полной защите от 5 LD<sub>50</sub> заражения PR8.

Пример 6. Влияние временной инфекции на эффективность AAV2/9-опосредованной FI6 профилактики PR8.

После IN введения AAV2/9.CB7.FI6 существует возможность того, что пациент может переносить временную инфекцию воздушно-капельной инфекцией, отличной от гриппа, такой как риновирус или RSV. В результате инфекции будет повреждено и утрачено подмножество дыхательных клеток, которые выстилают поверхность носовых и легочных дыхательных путей. Оценивали влияние положительно-трандуцированных клеток, поражаемых в результате повреждения после вирусной инфекции, оказываемое на эффект AAV2/9.CB7.FI6-опосредованной профилактики гриппа. В кратком изложении,  $1 \times 10^{10}$  к.г. AAV2/9.CB7.FI6 доставляли IN самкам мышей BALB/c в возрасте 6 недель. Чтобы индуцировать повреждение эпителия, через две недели одну группу заражали с использованием  $1 \times 10^6$  БОЕ RSV и другую группу обрабатывали IN с использованием PBS. Через четыре недели всех мышей заражали IN с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8 и осуществляли мониторинг потери массы и выживаемости. В случае временной инфекции отсутствовало влияние, оказываемое на эффект AAV2/9-опосредованной профилактики.

Пример 7. Пилотные исследования токсичности и экспрессии.

А. Промежуточное не GLP исследование выполняют на иммунокомпетентных CD-1 мышах для того, чтобы оценивать безопасность, кинетику и иммунный ответ. Ожидали, что аутбредные CD-1 мыши будут отвечать на GTP101 (векторы AAV2/9.CB7.FI6 и AAV2/9.CB7.CR8033; исследуемый продукт (IP) GTP101) образом, сходным с человеком из-за их генетической гетерогенности. Это переходное исследование необходимо, поскольку большинство предшествующих работ осуществляли с использованием различных инбредных штаммов. Токсичность, вызываемую непосредственно продуктом трансгена, нельзя оценивать у CD-1 мышей, и взамен можно оценивать у инбредных мышей с ослабленным иммунитетом, как описано в другом месте в этом документе.

Чтобы модулировать у мышей осаждение IP через IMAD в носовых дыхательных путях человека, авторы изобретения снижали объем жидкости, в которой вектор доставляют для направленного воздействия на носовые дыхательные пути мыши. Предварительно авторы изобретения проводили исследования, в которых снижение объема до 20 мкл ограничивает экспрессию носовыми дыхательными путями [Limberis, M.P., et al., Sci. Transl. Med., 2013. 5(187), p. 187ra72]. У мышей это дополнительно можно ограничивать 5 мкл/ноздрю. Этот небольшой объем все еще позволяет тестирование у мышей максимальной дозы GTP101, предложенной в не клинических исследованиях.

3 группы доз, по 10 животных на дозу в один момент времени (5 самцов и 5 самок), контроль (PBS),  $3,2 \times 10^{10}$ ,  $3,2 \times 10^{11}$  и  $3,2 \times 10^{12}$  к.г./кг IP (см. следующую таблицу). В сутки 0 вводили IP, в сутки 10 наблюдали пиковую экспрессию и в сутки 60 протекал период выздоровления. Оценки безопасности включают массу тела, клинические наблюдения, химические анализы сыворотки и гематологию при умерщвлении, полную некропсию, массы органов и сохранение тканей при каждом умерщвлении, гистопатологию только выбранных тканей - легких, головного мозга, печени, почки, сердца при высокой дозе и в контроле. Гистопатологию в группе средней и низкой дозы выполняют, только если наблюдают аномалии при самой высокой дозе. Экспрессию двух трансгенов оценивают посредством сэндвич ELISA во время умерщвления в текущем веществе назального лаважа (NLF), BALF и сыворотке. В иммунологических

исследованиях оценивают уровни антитела против лекарственного средства (ADA) посредством ELISA (трансгены и капсид), а уровни Т-клеточных ответов оценивают в селезенке.

Не GLP пилотное токсикологическое исследование  
у иммунокомпетентных CD1 мышей

Доза (к. г./кг)	Момент некропсии (сутки)	Число самцов CD1 мышей на группу	Число самок CD1 мышей на группу
3,2×10 <sup>10</sup>	10	5	5
	60	5	5
3,2×10 <sup>11</sup>	10	5	5
	60	5	5
3,2×10 <sup>12</sup>	10	5	5
	60	5	5
PBS	10	5	5
	60	5	5

В. Токсикологическое исследование у иммунодефицитных мышей.

Это токсикологическое исследование осуществляют как максимальную дозу, предложенную для человека, которая составляет приблизительно 3,2×10<sup>11</sup> к.г./кг, у мышей RAG-1 KO, и группу средней дозы, использованную для предыдущих исследований. Размер группы составляет 10 животных на момент времени, на один пол, с умерщвлением в сутки 10 и 60. IP вводят в объеме вплоть до 10 мкл/ноздрю.

Не клиническое токсикологическое исследование  
у иммунодефицитных мышей

Доза	Момент некропсии	Число самцов мышей Rag-1 KO на группу	Число самок мышей Rag-1 KO на группу
3,2×10 <sup>11</sup> к. г./кг	10	10	10
	60	10	10
PBS	10	10	10
	60	10	10

Одна группа дозы, 20 животных на дозу на момент времени (10 самцов и 10 самок), доза IP 3,2×10<sup>11</sup> к.г./мышь. В сутки 0 вводят IP, в сутки 10 пиковая экспрессия и в сутки 60 период выздоровления. Оценки безопасности включают массу тела, клинические наблюдения, химические анализы сыворотки и гематологию при умерщвлении, полную некропсию, массы органов и сохранение тканей при каждом умерщвлении, гистопатологию только выбранных тканей (перечислены в табл. 8,8), Гистопатологию группы низкой дозы выполняют, только если наблюдают аномалии при самой высокой дозе. Экспрессию двух трансгенов оценивают посредством ELISA как в NLF, так и в BALF.

С. Исследования токсичности и биораспределения у приматов, не являющихся человеком.

Это исследование выполняют при дозе, которая в 10 раз выше, чем наивысшая доза, которую доставляют в исследованиях у человека, используя то же устройство и объемы, использованные в исследовании у человека, когда осуществляли нормализацию в соответствии с общей массой тела. В исследовании у человека наивысшая доза составляет 3,2×10<sup>11</sup> к.г./кг (всего 2,4×10<sup>13</sup> к.г. для человека 75 кг), вводят в виде 2×0,2 мл/ноздрю. NHP получают 3,2×10<sup>12</sup> к.г./кг (1,28×10<sup>13</sup> к.г. для макаки 4 кг), что является наивысшей дозой, которую можно вводить с использованием IMAD устройства в объемах, предусмотренных для человека, что составляет 2,4×10<sup>13</sup> к.г., вводимых в виде 2×0,2 мл/ноздрю.

Исследования токсичности и биораспределения выполняют у макак-резусов. В этом исследовании используют 6 самцов и 6 самок, всего 12 макак-резусов. Оценивают три момента времени, наивных животных умерщвляют в сутки 0 перед введением IP, сутки 10 соответствуют пиковой экспрессии, и сутки 60 соответствуют периоду долгосрочного выздоровления.

В каждый момент времени умерщвляют двух самцов и двух самок. Токсичность оценивают посредством оценки СВС/химических панелей.

Пример 8. Оценка устройства интраназальной доставки.

В следующей группе исследований оценивают способность AAV9, экспрессирующего антитела против гриппа А и В (FI6 и CR8033 соответственно) в сопряжении с атомизирующим устройством LMA® MAD Nasal™ для слизистой внутри носа (IMAD), чтобы эффективно защищать мышей от заражения пандемическим или сезонным гриппом. Во-первых, установлено, что эквивалентная комбинация векторов AAV9.FI6 и AAV9.CR8033, доставляемых интраназально (i.n.) в дозе 5×10<sup>10</sup> к.г./KG (или

$1 \times 10^9$  к.г.) на мышь, эффективно защищает мышей от летального заражения гриппом А (адаптированным к мышам H1N1, PR8) или гриппом В (адаптированным к мышам V/Lee/40) соответственно (фиг. 11А, 11D, 11G и 12А, 12D). С целью клинического продвижения AAV9 оценивали совместимость вектора с IMAD по потере объема и активности вектора. Для этих исследований 0,5 мл суспензии вектора пропускали через IMAD для того, чтобы оценивать физическую потерю раствора вектора, а также для того, чтобы оценивать влияние устройства на активность вектора. Как указано на фиг. 12G, физическую потерю жидкости 4-6,6% от начального объема наблюдали, когда раствор вектора обрабатывали с помощью IMAD. Авторы изобретения также оценивали три различных состава векторов: PBS-pH 6,8, PBS-pH 7,2 или PBS-pH 7,4 на совместимость с вектором. Группам мышей i.p. вводили смесь  $5 \times 10^{10}$  к.г./KG (или  $1 \times 10^9$  к.г.) каждого из AAV9.FI6 и AAV9.CR8033, а также смесь  $5 \times 10^{10}$  к.г./KG (или  $1 \times 10^9$  к.г.) каждого из AAV9.FI6 и AAV9.CR8033, которую обрабатывали с помощью IMAD. Через 7 суток мышей заражали с использованием 5 LD<sub>50</sub> PR8 или V/Lee/40 (фиг. 11А, 11D, 11G и 12А, 12D). Никаких различий в эффективности защиты против гриппа А или В не наблюдали, когда смесь векторов обрабатывали с помощью IMAD (темно-серые квадраты). Дополнительно, использование IMAD совместимо с тремя различными составами, и не наблюдали снижения эффективности, когда вектор, который приготавливали с каждым из трех составов, обрабатывали с помощью IMAD. Только мыши, которым вводили вектор, переживали заражение. В конце эксперимента (сутки 21) умерщвляли мышей и собирали текучее вещество бронхоальвеолярного лаважа (BALF) для того, чтобы оценивать количество генома вектора, присутствующего в момент некропсии. Не наблюдали различий в экспрессии антитела на поверхностях дыхательных путей, когда вектор доставляли в виде жидкости или в виде жидкости после обработки с помощью IMAD (фиг. 11В, 11Е, 11Н и 12В, 12Е). Кроме того, не наблюдали значимых различий в числе геномов AAV9 вектора в легких.

Затем этот подход переносили на нос макаки, модель, которая состоит в более близком родстве с носом человека, который является целевой тканью. В этой модели оценивали кинетику начала экспрессии трансгена в текучем веществе назального лаважа (NLF) и стабильность экспрессии, когда AAV9 вектор доставляли через IMAD по сравнению с традиционной прямой доставкой жидкости. Иммунные ответы против антитела человека FI6 или CR8033 искажают эксперимент и интерпретацию результатов. По существу, в этих исследованиях собственный антиген ( $\alpha$ -фетопротейин резуса, rhAFP) использовали в качестве репортерного трансгена. Экспрессию  $\alpha$ -фетопротейина резуса (rhAFP) здесь помечают присутствием знака плюс (+), поскольку точное количественное определение антитела на поверхностях слизистых ограничено точностью взятия образцов NLF (фиг. 13). В конце исследования также изучали биораспределение вектора. В целом, между двумя способами доставки не наблюдали значимых различий в кинетике и профиле экспрессии гена или биораспределении AAV9 вектора.

В заключение, AAV-опосредованная профилактика гриппа А и В является безопасной и эффективной, когда векторы доставляют через устройство IMAD, легкое в использовании, которое локализует трансдукцию местом инфекции гриппа, слизистой носа.

Пример 9. Дизайн начальной фазы 1 исследования.

Цель фазы 1 исследования состоит в том, чтобы оценивать предварительную безопасность и переносимость, чтобы понять фармакокинетику IP у здоровых добровольцев, и выбирать уровень дозы для дальнейшей разработки. Исследование является открытым исследованием с повышением дозы при уровнях доз, основанных на доклинических данных. В исследовании участвуют вплоть до пяти когорт, по четыре субъекта на когорту. Осуществляют скрининг субъектов в течение 4-12 недель перед лечением и наблюдают их в течение 6 месяцев.

Каждый доброволец получает одну дозу 0,8 мл IP IN через два последовательных внесения 0,2 мл/ноздрю в каждую ноздрию с использованием одобренного IMAD. Вплоть до двадцати восьми (24) добровольцев включают в пять когорт. Когорты 1-4 получают возрастающие уровни дозы IP, а конечная когорта (когорта 5) расширена до 8 добровольцев при оптимальном уровне дозы (которые определены с помощью параметров безопасности и фармакокинетики в когортах 1-4).

## Дизайн начальной фазы 1 исследования у здоровых взрослых добровольцев

Когорта	Н активных	Уровень дозы продукта AAV2/9 трансгена (к. г.)	Общий объем, подлежащий введению (мл)	Путь введения
1	4	$3,0 \times 10^{12}$	0,2 мл в каждую ноздрю; две серии применения, всего 0,8 мл	IN
2	4	$6,0 \times 10^{12}$		IN
3	4	$1,2 \times 10^{13}$		IN
4	4	$2,4 \times 10^{13}$		IN
5	8	Оптимальная доза		IN
			две серии применения, всего 0,8 мл	
Всего	24			

## А. Критерии включения/исключения для целевой популяции.

Здоровых взрослых в возрасте 18-45 лет любого пола с индексом массы тела 19-30 кг/м<sup>2</sup> и массой тела 50-100 кг вводят в исследование для того, чтобы оценивать безопасность, иммунологические и фармакокинетические параметры GTP101.

**Критерии включения**

Мужчины или женщины в возрасте 18-45 лет включительно.

Способны дать письменное информированное согласие на участие.

Здоровы, как определяют по анамнезу, физикальному обследованию, показателям жизнедеятельности и клиническим лабораторным исследованиям безопасности при базовом уровне.

Без табачной зависимости (людьми с табачной зависимостью являются люди, которые выкуривают больше 4 сигарет или других табачных продуктов в неделю) и согласны не использовать табачные продукты во время участия.

Женщины должны отвечать одному из следующих критериев:

по меньшей мере один год после менопаузы;

хирургически стерильны;

будут использовать оральные, имплантируемые, трансдермальные или инъекционные контрацептивы в течение 30 суток перед IP введением и в течение 60 суток после вакцинации;

желают воздержаться от половых сношений или использовать другую надежную форму контрацепции, одобренную исследователем (например, внутриматочное устройство (IUD), женский презерватив, диафрагма со спермицидом, шейный колпачок, использование презерватива половым партнером или стерильный половой партнер) от момента скрининга до суток 28 исследования.

Женщины с репродуктивным потенциалом должны иметь отрицательный тест мочи на беременность в пределах 24 ч перед введением IP.

Понимание требований исследования, выраженная доступность в течение необходимого периода исследования.

**Критерии исключения**

Значимый анамнез сезонной сенной лихорадки или сезонного аллергического ринита или круглогодичный аллергический ринит или хроническое состояние носа или синусов.

Анамнез астмы, требующей лечения в течение вплоть до 1 года перед введением IP.

Субъекты с аномальной структурой носа, включая смещение перегородки и полипы в носу, хронический синусит, астму или COPD.

Текущее использование интраназальных стероидов.

Присутствие значимого неконтролируемого медицинского или психиатрического заболевания (острого или хронического), по оценке исследователя. Это включает, но не ограничиваясь, назначение нового медицинского или хирургического лечения, или значительное изменение дозы для неконтролируемых симптомов, или лекарственную токсичность в пределах 3 месяцев скрининга и повторное подтверждение в сутки 0 перед заражением.

Положительная серология на ВИЧ-1 или ВИЧ-2, или HBsAg или антител к HCV.

Злокачественная опухоль или лечение злокачественной опухоли в пределах 3 лет, за исключением базально-клеточной карциномы или плоскоклеточной карциномы, которые допустимы.

Присутствие иммуносупрессии или какого-либо медицинского состояния, которое может быть свя-

зано с ослабленной иммунологической реактивностью, включая в качестве неограничивающих примеров сахарный диабет.

Получение в настоящее время (или получение в анамнезе), во время периода предшествующих 3 месяцев, каких-либо медикаментов или другого лечения, которые могут нежелательно влиять на иммунную систему, такие как аллергические инъекции, иммуноглобулин, интерферон, иммуномодуляторы, цитотоксические лекарственные средства или другие лекарственные средства, для которых известна частая связь со значительной токсичностью основных органов, или системные кортикостероиды (оральные или инъекционные). Топические кортикостероиды допустимы.

Лекарственная или химическая зависимость в анамнезе в год перед исследованием.

Прием какого-либо исследуемого продукта или незарегистрированного лекарственного средства в пределах 30 суток перед введением IP или участие в настоящее время в каком-либо исследовании лекарственного средства или намерение участвовать в таком исследовании в пределах последующего периода исследования.

Получение крови или продуктов крови в течение 6 месяцев перед введением IP или планируемое введение во время периода исследования.

Острое заболевание в пределах 72 ч перед введением IP, определяемое как присутствие умеренного или тяжелого заболевания с лихорадкой или без нее (как определяет исследователь по анамнезу и физикальному обследованию) или присутствие лихорадки  $\geq 38^\circ\text{C}$  перорально.

Беременные и/или лактирующие женщины.

Сывороточные антитела к AAV2/9  $>1:80$ .

Какое-либо состояние, которое, по мнению исследователя, может препятствовать основным целям исследования и оценкам.

В. Определение уровня дозы.

Начальные уровни доз выбирали на основании доклинических данных об эффекте и уточняли на основании не клинических оценок безопасности, при наивысшей дозе, ограниченной свойствами агрегирования AAV. Дозы находятся в диапазоне от  $3,0 \times 10^{12}$  до  $2,4 \times 10^{13}$  к.г./доза, которые вводят в виде  $4 \times 0,2$  мл/ноздю через IMAD. Эти дозы по существу ниже, чем те, что давали обезьянам, мышам и хорькам, если корректировать по общей массе тела. Не наблюдали существенную токсичность в каких-либо неклинических исследованиях, которые проводили у этих биологических видов, при какой-либо дозе с использованием IP или версий AAV2/9, схожих по структуре IP, запланированными для клинического исследования.

С. Введение дозы и длительность.

Каждая группа дозы получает IP в 0,4 мл на каждую ноздрю через IMAD. Субъектам дозируют друг за другом. Интервалы лечения в одной и той же группе дозы определяют посредством не клинических исследований, но для целей воспроизведения составляют 1 неделю. Когда все субъекты в одной когорте прошли сутки 14 исследования, рассматривают предварительные данные о безопасности. Если не идентифицируют проблемы с безопасностью, начинают повышение дозы до следующей дозы. После завершения когорты 4 и предварительной демонстрации безопасности для наивысшей дозы, пятую и конечную когорту включают в исследование для расширения до 8 субъектов в целом (т.е. 4 дополнительные субъекта) при оптимальной дозе, которая является максимально переносимой дозой или наивысшей дозой, которую можно вводить.

Продукт, введенный пациентам, представляет собой смесь двух AAV2/9 векторов, которые комбинировали во время заполнения/завершения. Введение IP происходит в двух последовательных дозах 0,2 мл в каждую ноздрю (т.е. всего 0,8 мл IP). IP вводят с использованием коммерчески одобренного устройства производства Teleflex Medical (Teleflex.com). Устройство называется LMA MAD NASAL™ (атомизирующее устройство для слизистой внутри носа). Подробности о том, как лучше всего использовать устройство для того, чтобы доставлять IP на слизистую носа, представлены в Procedure Guide этой компании. В целом, субъекта помещают в лежащее положение и кончик устройства помещают в отверстие каждого носового хода (один за раз), после чего IP доставляют посредством проталкивания текучего вещества через атомизатор через шприц.

Максимальную переносимую дозу (MTD) определяют как дозу ниже дозы, при которой субъекты демонстрируют ограничивающую дозу токсичность (DLT), определяемую как какое-либо связанное с лечением событие степени 3 у двух субъектов или одно связанное с лечением событие 4 степени.

Заявка на данное изобретение содержит последовательности и список последовательностей, которые, таким образом, включены посредством ссылки. Также посредством ссылки в настоящее описание включена предварительная патентная заявка США № 62/323,348, поданная 15 апреля 2016 г., и предварительная заявка США № 62/161,192, поданная 13 мая 2015 г. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в этом документе, включены, таким образом, по ссылке во всей их полноте, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка конкретно и индивидуально включена по ссылке. Несмотря на то, что приведенное выше изобретение описано в некоторых деталях в целях иллюстрации и примера для прозрачности понимания, специалисты в данной области в свете по-

ложений данного изобретения без труда поймут, что в нем можно выполнять определенные изменения и модификации, не отступая от сущности или объема приложенной формулы изобретения.

Следующая информация представлена для последовательностей, содержащих произвольный текст под числовым идентификатором <223>.

Список последовательностей, произвольный текст

SEQ ID №	Произвольный текст в <223>
1	<220> <223> Плазмида, несущая F16сс HC с легкой цепью зародышевой линии <220> <221> область повтора <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> область повтора <222> (198)..(579) <223> промотор IE CMV <220> <221> промотор <222> (582)..(862) <220> <221> сигнал TATA <222> (836)..(839) <220> <221> Интрон <222> (956)..(1928) <223> интрон бета-актина курицы <220>

<221> разнородные признаки
<222> (1940)..(1987)
<223> с-мус 5'UTR
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (1988)..(1992)
<223> Козак
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (1993)..(2052)
<223> лидер
<220>
<221> CDS
<222> (2053)..(2439)
<223> переменная тяжелая FI6
<220>
<221> CDS
<222> (2440)..(2760)
<223> FI6 CH1
<220>
<221> CDS
<222> (2761)..(3426)
<223> FI6 CH2-3
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (3427)..(3438)
<223> сайт расщепления фурина
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (3439)..(3510)
<223> F2A
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (3511)..(3570)
<223> лидер
<220>
<221> CDS
<222> (3511)..(3570)
<223> лидер
<220>
<221> CDS
<222> (3571)..(3909)

	<p>&lt;223&gt; зародышевая линия kappa          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; CDS          &lt;222&gt; (3910)..(4230)          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; область повтора          &lt;222&gt; (4308)..(4432)          &lt;223&gt; полиА глубина кролика          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; область повтора          &lt;222&gt; (4521)..(4650)          &lt;223&gt; 3' ITR          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; разнородные признаки          &lt;222&gt; (4827)..(5265)          &lt;223&gt; Fl ori на комплементарной цепи          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; разнородные признаки          &lt;222&gt; (5294)..(5936)          &lt;223&gt; участок начала репликации          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; разнородные признаки          &lt;222&gt; (6611)..(7426)          &lt;223&gt; CDS для устойчивости к Кап, расположенная на комплементарной цепи</p>
8	<p>&lt;223&gt; Цис-плазмида, содержащая тяжелую цепь CR8033 и легкую цепь из каппа зародышевой линии          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; разнородные признаки          &lt;222&gt; (264)..(287)          &lt;223&gt; конец промотора CMV          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; промотор          &lt;222&gt; (285)..(565)          &lt;223&gt; промотор CB          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; разнородные признаки          &lt;222&gt; (288)..(318)          &lt;223&gt; начало промотора          &lt;220&gt;          &lt;221&gt; сигнал TATA          &lt;222&gt; (539)..(542)</p>

<220>
<221> Интрон
<222> (659)..(1631)
<223> интрон бета-актина курицы
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (1517)..(1533)
<223> конец интрона
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (1643)..(1690)
<223> с-трус 5' UTR
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (1691)..(1698)
<223> Козак
<220>
<221> CDS
<222> (1753)..(2133)
<223> переменная тяжела CR8033cc
<220>
<221> CDS
<222> (2134)..(2454)
<223> CH1
<220>
<221> CDS
<222> (2455)..(3120)
<223> CH2-3
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (3121)..(3132)
<223> сайт расщепления фурина
<220>
<221> разнородные признаки
<222> (3133)..(3204)
<223> линкер F2A
<220>
<221> CDS
<222> (3265)..(3603)
<223> легкая каппа зародышевой линии
<220>
<221> CDS

	<222> (3604)..(3924) <223> константная легкая <220> <221> сигнал полиА <222> (4000)..(4126) <220> <221> область повтора <222> (4215)..(4344) <223> 3' ITR (на комплементарной) <220> <221> разнородные признаки <222> (4521)..(4959) <223> Fl ori на комплементарной цепи <220> <221> разнородные признаки <222> (4988)..(5630) <223> участок начала репликации pUC <220> <221> разнородные признаки <222> (7363)..(7548) <223> промотор Lac <220> <221> область повтора <222> (7603)..(7732) <223> 5' ITR <220> <221> разнородные признаки <222> (7806)..(7835) <223> начало промотора
14	<223> содержит лидер-вся тяжелая цепь-линкер F2A фурина-лидер-вся легкая цепь
15	<223> 1F16 1 лидер-вся тяжелая цепь-линкер F2A фурина-лидер-вся легкая цепь
16	<223> F16 26
17	<223> F16 28
18	<223> кДНК F16 30
19	<223> кДНК F16 35
21	<223> кДНК F16
22	<223> кДНК F16 42
23	<223> F16 B42
24	<223> мутировавший IL-2
25	<223> мутировавший IL-2

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для пассивной иммунизации против гриппозной инфекции, где композиция содержит:

(A) первый не реплицирующийся рекомбинантный аденоассоциированный вирус с капсидом AAV9 (гAAV9) и векторным геномом, который содержит:

(a) инвертированный концевой повтор (ITR) AAV,

(b) энхансер,

(c) промотор бета-актина курицы,

(d) интрон,

(e) 5'-UTR,

(f) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерный пептид, функционально связанный с вариательной областью тяжелой цепи F16v3 (g), который вместе с (h) образует тяжелую цепь иммуноглобулина,

(g) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариательную область тяжелой цепи F16v3, которая содержит нуклеотиды 2053-2439 SEQ ID NO: 1,

(h) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домен Ch1 человека и Fc-цепь IgG1 че-

ловека (CH2-3),

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерный пептид, функционально связанный с легкой цепью иммуноглобулина (j),

(j) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь иммуноглобулина,

(k) сайт распознавания фурина и линкер F2A, расположенный между последовательностями, кодирующими последовательности тяжелой цепи, и последовательностями, кодирующими последовательности легкой цепи,

(l) сигнал полиаденилирования и

(m) инвертированный концевой повтор AAV;

(B) второй не реплицирующийся гAAV9, где второй гAAV9 имеет векторный геном, который содержит:

(a) AAV ITR,

(b) энхансер,

(c) промотор бета-актина курицы,

(d) интрон,

(e) 5'-UTR,

(f) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерный пептид, функционально связанный с тяжелой цепью CR8033, (g) и (h),

(g) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи CR8033, которая содержит нуклеотиды 1753-2133 SEQ ID NO: 8,

(h) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую домен CH1 человека и Fc-цепь IgG1 человека (CH2-3),

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерный пептид, функционально связанный с легкой цепью иммуноглобулина (j),

(j) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь иммуноглобулина,

(k) сайт распознавания фурина и линкер F2A, расположенный между последовательностями, кодирующими тяжелую цепь, и последовательностями, кодирующими легкую цепь,

(l) сигнал полиаденилирования и

(m) AAV ITR,

и водную жидкую суспензионную основу.

2. Композиция по п.1, где векторный геном в (A) выбран из SEQ ID NO: 1, 14, 15 или 16.

3. Композиция по п.1, где векторный геном в (B) содержит SEQ ID NO: 8.

4. Композиция по п.1, где полная концентрация гAAV9 в (A) и (B) составляет от около  $1 \times 10^{11}$  до около  $6 \times 10^{13}$  копий генома (к.г.)/мл, где к.г. определяют с помощью капельной цифровой ПЦР (ddPCR).

5. Композиция по п.1, где соотношение гAAV9 (A) и гAAV9 (B) составляет примерно 1:1.

6. Композиция по п.1, где легкая цепь (A) и/или (B) является гетерологичной легкой цепью.

7. Композиция по п.1, где легкая цепь (A) и легкая цепь (B) имеют общий источник.

8. Композиция по п.1, где переменная область легкой цепи представляет собой последовательность антитела эмбрионального типа без определенной специфичности.

9. Композиция по п.8, где легкая цепь представляет собой каппа или каппа цепь зародышевой линии человека IGKV4-1\*101.

10. Композиция по п.1, где 5'-UTR (A) или 5'-UTR (B) независимо выбраны из с-мус 5'-UTR человека.

11. Композиция по п.1, где лидерные пептиды (A) являются гетерологичными в отношении иммуноглобулина и где лидерные пептиды отличаются друг от друга.

12. Композиция по п.1, где лидерные пептиды (B) являются гетерологичными в отношении иммуноглобулина и где лидерные пептиды отличаются друг от друга.

13. Композиция по п.11 или 12, где лидерный пептид представляет собой лидерный пептид IL-2.

14. Способ индукции пассивной иммунизации против гриппа у пациента, включающий введение композиции по любому из пп.1-13.

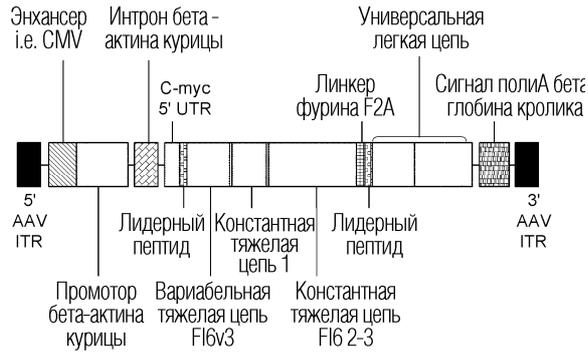
15. Способ по п.14, где композицию вводят в состав для интраназального, внутримышечного или внутривенного введения.

16. Способ по п.14, где пациенту вводят дозу в количестве от примерно  $1 \times 10^{10}$  до примерно  $3 \times 10^{13}$  к.г.

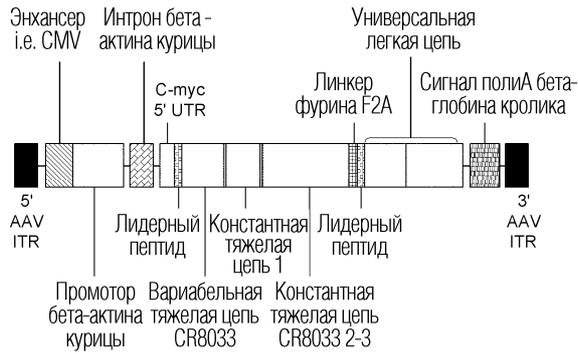
17. Способ по п.14, где пациент получает два последовательных введения примерно 0,4 или примерно 0,2 мл/ноздрю.

18. Набор для пассивной иммунизации против гриппозной инфекции, содержащий контейнер с композицией по любому из пп.1-13 и инструкцию по применению.

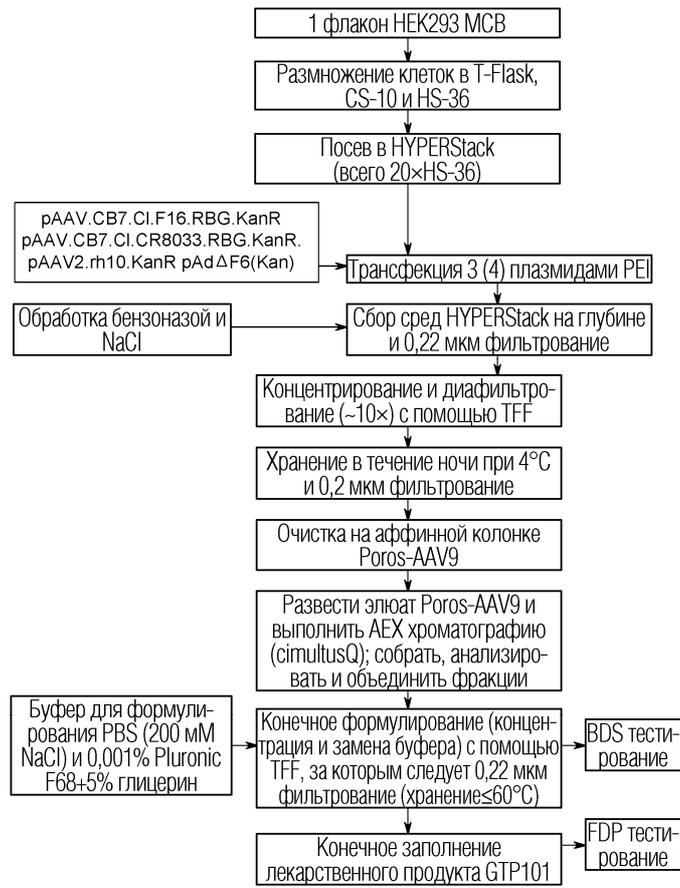
19. Набор по п.18, также содержащий разбавитель.



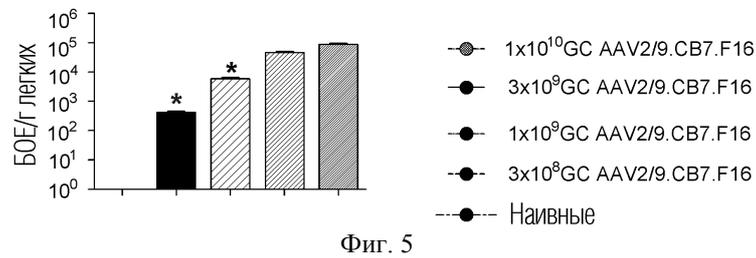
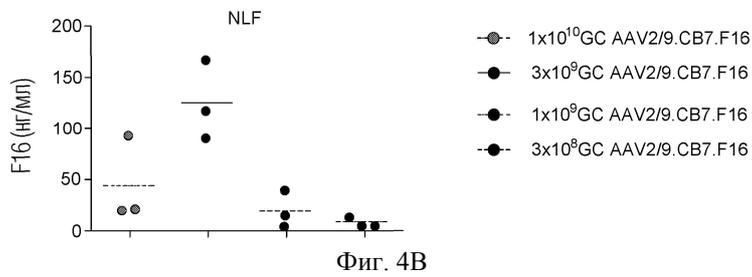
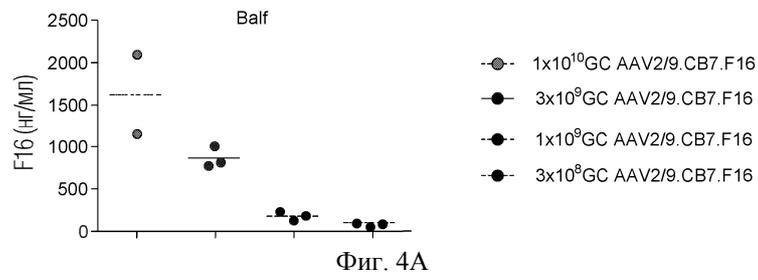
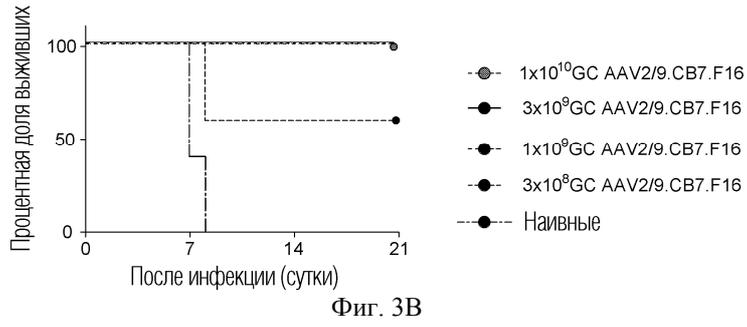
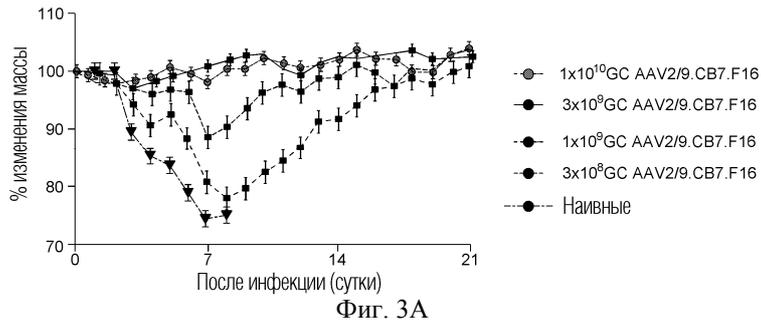
Фиг. 1А

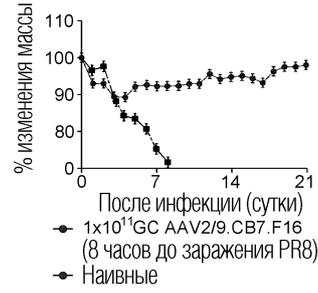


Фиг. 1В



Фиг. 2

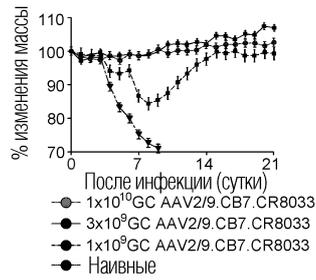




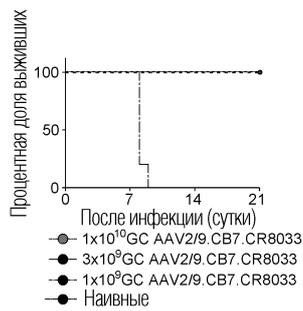
Фиг. 6А



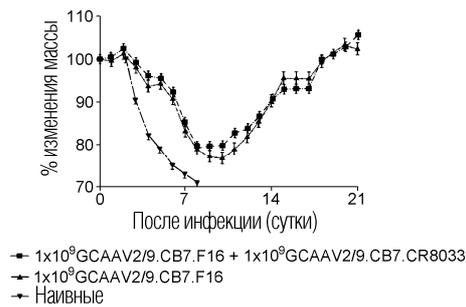
Фиг. 6В



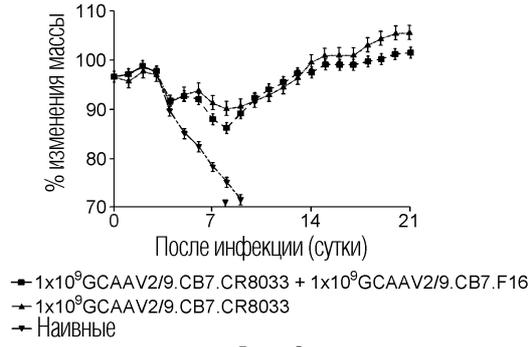
Фиг. 7А



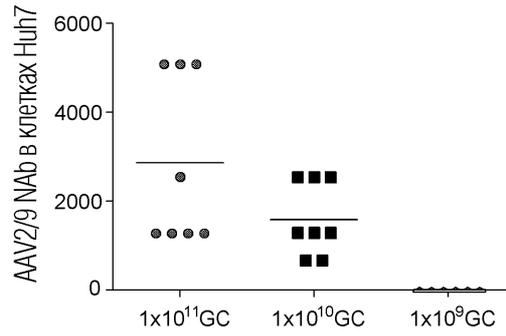
Фиг. 7В



Фиг. 8



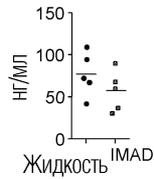
Фиг. 9



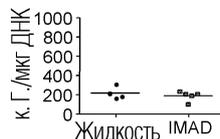
Фиг. 10



Фиг. 11А



Фиг. 11В

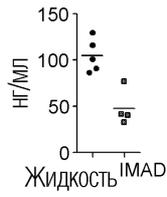


Фиг. 11С

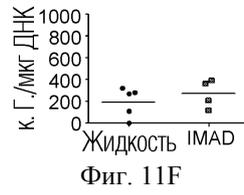


Фиг. 11D

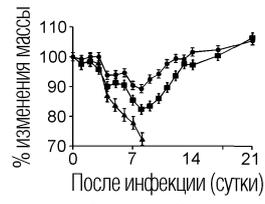
041088



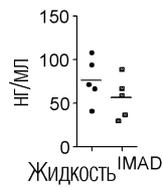
Фиг. 11Е



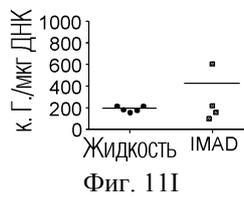
Фиг. 11F



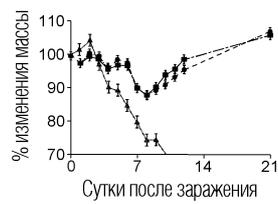
Фиг. 11G



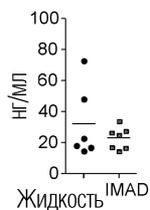
Фиг. 11Н



Фиг. 11И

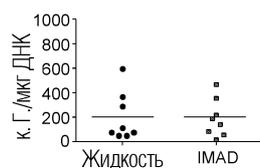


Фиг. 12А

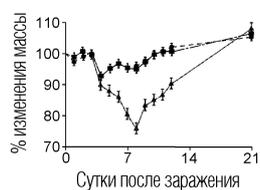


Фиг. 12В

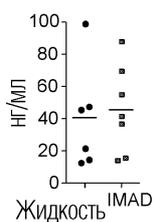
041088



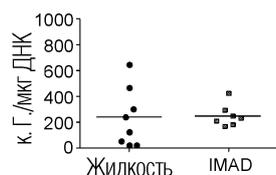
Фиг. 12С



Фиг. 12D



Фиг. 12E



Фиг. 12F

Начальный объем (мл)	Объем после IMAD (мл)
0.500	0.467
0.500	0.480

Фиг. 12G