

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042308

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.02

(21) Номер заявки
201892524

(22) Дата подачи заявки
2017.05.05

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(54) ДНК-МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, НАЦЕЛЕННЫЕ НА IL-6

(31) 62/332,377

(32) 2016.05.05

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/031193

(87) WO 2017/192933 2017.11.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ; ДЗЕ УИСТАР
ИНСТИТУТ ОФ ЭНЭТОМИ ЭНД
БАЙОЛОДЖИ (US)

(56) US-A1-20150284448
US-A1-20080075726

(72) Изобретатель:
Уэйнер Дэвид, Эллиотт Сара (US)

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

(57) В настоящем изобретении раскрыта композиция, включающая в себя рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует синтетическое антитело к IL-6 и/или к CD126. В настоящем изобретении также раскрыт способ предотвращения и/или лечения у субъекта заболевания с использованием указанной композиции и способ ее создания.

042308

B1

042308

B1

Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/332377, поданной 5 мая 2016 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, для создания *in vivo* одного или более синтетических антител, включая антитела к IL-6 и антитела к CD126 и их функциональные фрагменты, а также к способам предотвращения и/или лечения заболевания у субъекта посредством введения указанной композиции.

Уровень техники

Провоспалительный цитокин IL-6 играет существенную роль в природном воспалении и сепсисе. Повышенные уровни IL-6 клинически связаны с плохими прогнозами рака, поскольку многочисленные исследования демонстрируют связь между сигнализацией IL-6 и развитием опухоли. В настоящее время терапевтические антитела, нацеленные на IL-6 и его рецептор CD126, одобрены для лечения многоочаговой болезни Кастлемана и ревматоидного артрита. К сожалению, производство и доставка очищенных антител к IL-6 и к CD126 являются дорогостоящими. Кроме того, эти лекарственные средства в виде антител необходимо вводить повторно с интервалом от одного раза в неделю до одного раза в месяц, что представляет проблемы в свете лечения хронических состояний, например таких как рак и аутоиммунное заболевание.

Таким образом, в данной области существует потребность в улучшенных композициях и способах для нацеленного воздействия на IL-6 и CD126 для лечения рака и аутоиммунного заболевания.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей одну или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих одно или более синтетических антител, причем одна или более молекул нуклеиновых кислот содержат по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из а) нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело к IL-6; b) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент синтетического антитела к IL-6; c) нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело к CD126; и d) нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент антитела к CD126.

В одном варианте реализации композиция содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическое антитело к IL-6, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к CD126.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела к IL-6.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела к CD126.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи человеческого IgG1κ.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела к IL-6; константную область тяжелой цепи человеческого IgG1κ; домен расщепления; переменную область легкой цепи антитела к IL-6; и константную область легкой цепи IgG1κ.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела к CD126; константную область тяжелой цепи человеческого IgG1κ; домен расщепления; переменную область легкой цепи антитела к CD126; и константную область легкой цепи IgG1κ.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность.

В одном варианте реализации композиция содержит экспрессионный вектор.

В различных вариантах реализации в изобретении предложена композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен способ предотвращения или лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту композиции, описанной в настоящем документе. В одном варианте реализации заболевание представляет собой рак. В одном варианте реализации заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В одном варианте реализации заболевание представляет собой сепсис. В одном варианте реализации заболевание представляет собой вирусную инфекцию. В одном варианте реализации заболевание представляет собой многоочаговую болезнь Кастлемана. В одном варианте реализации заболевание связано с высокой температурой тела. В одном варианте реализации заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (GVH). В

одном варианте реализации заболевание представляет собой синдром клеточного лизиса.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображено схематическое представление ДНК-конструкции, кодирующей антитело к IL-6 и антитело к CD126.

На фиг. 2, которая включает фиг. 2А-С, показаны результаты экспериментов, демонстрирующие конструкции DMAb, экспрессируемые в клетках 293Т. Клетки HEK 293Т трансфицировали плазмидной ДНК, несущей конструкции антитела к IL-6 (IL-6 от 1 до 4) или антитела к CD126 (CD126 от 1 до 2). Пустая плазида служила в качестве отрицательного контроля. (Фиг. 2А и фиг. 2В) Экспрессию человеческого IgG1к определяли с помощью количественного ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) (N=3 повтора трансфекции, $\pm$ COC [стандартная ошибка среднего]). (Фиг. 2С) Иллюстративный анализ вестерн-блот, демонстрирующий расщепление и экспрессию пептида с тяжелой и легкой цепью в супернатанте.

На фиг. 3, которая включает фиг. 3А и В, показаны результаты экспериментов, демонстрирующие, что после внутримышечной электропорации DMAb экспрессируются в мышечной сыворотке *in vivo*. Мышам линии BALB/c вводили посредством в/м инъекции 100 мкг плазмидной ДНК с последующим проведением электропорации. Через семь дней с помощью ELISA определяли уровни человеческого антитела IgG1к в сыворотке. (Фиг. 3А) Антитела DMAb к IL-6 были экспрессированы на уровнях от 1,5 мкг/мл до 7,0 мкг/мл (средний показатель) с дня 0 исходного уровня до дня перед кровопусканием. (Фиг. 3В) Антитела DMAb к CD126 были экспрессированы на уровнях от 1,6 мкг/мл до 4,1 мкг/мл (средний показатель) с дня 0 исходного уровня до дня перед кровопусканием. (N=5, средний показатель $\pm$ COC.)

На фиг. 4 показаны результаты экспериментов, демонстрирующие, что DMAb в сыворотке мышей, которым была проведена электропорация в мышцу, связывается со своим антигеном-мишенью *in vitro*. Мышам линии BALB/c вводили посредством инъекции 100 мкг плазмидной ДНК с последующим проведением внутримышечной электропорации. Через одну неделю с помощью ELISA определяли связывание человеческого антитела IgG с рекомбинантным человеческим IL-6 (слева) и человеческим CD126 (справа) в сыворотке. (N=5, средний показатель $\pm$ COC.)

На фиг. 5 показаны результаты экспериментов, демонстрирующие, что DMAb в сыворотке блокирует опосредованную IL-6 клеточную сигнализацию *in vitro*. Были получены клетки HEK-293, стабильно трансфицированные человеческим CD126 и STAT3-индуцибельной секретированной щелочной фосфатазой (SEAP).

Разведенная сыворотка (1: 40) от необработанных мышей индуцировала базовый уровень экспрессии SEAP, обусловленной мышинным IL-6, который был нормализован до 100% активности SEAP в клеточных супернатантах (серый столбец). Разводили сыворотку (1: 40), полученную на день 7 от мышей, которым проводили электропорацию DMAb, и проводили анализ клеточных супернатантов на активность SEAP, выраженную в виде процентной доли от необработанного контроля (черный столбец). Неспецифический цитокин TNFa действует как контроль активации специфического цитокина (белый столбец). (N=4, средний показатель $\pm$ COC.)

На фиг. 6 показаны результаты экспериментов, демонстрирующие, что DMAb в сыворотке блокирует опосредованную IL-6 клеточную сигнализацию *in vitro*. Были получены клетки HEK-293, стабильно трансфицированные человеческим CD126 и STAT3-индуцибельной секретированной щелочной фосфатазой (SEAP). Разведенная сыворотка (1:40-1:40960) от необработанных мышей индуцировала базовый уровень экспрессии SEAP, обусловленной мышинным IL-6, который был нормализован до 100% активности SEAP в клеточных супернатантах (черная линия). Разводили сыворотку (1:40-1:40960), полученную на день 7 от мышей, которым проводили электропорацию DMAb, и проводили анализ клеточных супернатантов на активность SEAP, как указано (синяя линия). Неспецифический цитокин TNFa действует как контроль активации специфического цитокина (серая линия). (N=4, средний показатель $\pm$ COC.)

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, ее фрагмент, ее вариант или их комбинацию. Композицию можно вводить нуждающемуся в этом субъекту для облегчения *in vivo* экспрессии и образования синтетического антитела.

В частности, полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи, экспрессируемые с рекомбинантных последовательностей нуклеиновых кислот, могут быть собраны в синтетическое антитело. Полипептид с тяжелой цепью и полипептид с легкой цепью могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, способного связывать заданную мишень (например, IL-6 и CD126), являющегося более иммуногенным по сравнению с антителом, не прошедшим описанную в данном документе сборку, и способного вызывать или индуцировать иммунный ответ против заданной мишени.

Кроме того, эти синтетические антитела более быстро генерируются в организме субъекта, чем антитела, которые вырабатываются в ответ на индуцированный антигеном иммунный ответ. Синтетиче-

ские антитела способны эффективно связывать и нейтрализовать ряд мишеней. Синтетические антитела также способны эффективно защищать от и/или стимулировать выживаемость при заболевании. Соответственно, в отношении искусственно созданных моноклональных антител (МА) в форме синтетических ДНК-плазмид, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, ее фрагмент, ее вариант или их комбинацию. Композицию можно вводить нуждающемуся в этом субъекту для облегчения *in vivo* экспрессии и образования синтетического антитела. В одном варианте реализации в настоящем документе описана нуклеотидная последовательность. Например, в одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, или ее вариант или ее фрагмент. В другом варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, или ее вариант или ее фрагмент. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из описанной в настоящем документе последовательности ДНК. Например, в одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из последовательности ДНК с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, или ее вариант или ее фрагмент. В другом варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из последовательности ДНК, кодирующей полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, или ее вариант или ее фрагмент.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность кодирует фрагмент аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность представляет собой фрагмент нуклеотидной последовательности, который имеет по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11.

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области техники. В случае противоречия, приоритет имеет настоящий документ, включая определения. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при проверке настоящего изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены посредством ссылки. Описанные в данном документе материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не подразумевают ограничения.

В контексте данного документа подразумевается, что термины "содержит(ат)", "включает(ют)", "имеющий", "имеет", "может" и их варианты являются открытыми переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможности наличия дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают отсылки к множественному числу, если иное четко не следует из контекста. В настоящем изобретении также предусмотрены другие варианты реализации, "содержащие", "состоящие из" и "состоящие преимущественно из" представленных в данном документе вариантов реализации или элементов, приведенных явным образом или нет.

"Антитело" может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их фрагменты или производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела и их фрагменты. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки млекопитающего, поликлональное антитело, прошедшее аффинную очистку антитело или их смеси, которые проявляют достаточную специфичность связывания с необходимым эпитопом или полученной из него последовательностью.

В контексте данного документа "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела, содержащей антигенсвязывающий участок или вариабельную область. Эта часть не включает константные домены тяжелой цепи (т.е. CH₂, CH₃ или CH₄ в зависимости от изотипа антитела) Fc-области интактно-

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

"Антиген" относится к белкам, которые способны генерировать иммунный ответ в организме-хозяине. Антиген может распознаваться и связываться антителом. Антиген может иметь происхождение, связанное с организмом или внешней средой.

В контексте данного документа термины "кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота" означают нуклеиновую кислоту (молекулу РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую приведенное в данном документе антитело. Кодированная последовательность может также содержать последовательность ДНК, которая кодирует последовательность РНК. Кодированная последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминирования, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту. Кодированная последовательность может дополнительно содержать последовательности, которые кодируют сигнальные пептиды.

В контексте данного документа термин "комплементарная" может означать нуклеиновую кислоту, характеризующуюся Уотсон-Криковским (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстиновским спариванием оснований между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот.

В контексте данного документа термин "постоянный ток" используется для определения тока, проходящего или воздействующего на ткань или клетки, определяющие указанную ткань, в течение длительности электрического импульса, подаваемого на ту же самую ткань. Электрический импульс подается из описанных в данном документе устройств для электропорации. Ток остается постоянным в указанной ткани в течение действия электрического импульса, так как предложенное в данном документе устройство для электропорации имеет цепь обратной связи, предпочтительно характеризующуюся мгновенной обратной связью. Цепь обратной связи может измерять сопротивление ткани (или клеток) во время длительности импульса и давать команду устройству для электропорации для изменения вырабатываемой электрической энергии (например, повышения напряжения) так, чтобы ток в одной ткани оставался постоянным в течение электрического импульса (порядка микросекунд) и от импульса к импульсу. В некоторых вариантах реализации цепь обратной связи содержит контроллер.

В контексте данного документа термины "обратная связь по току" или "обратная связь" могут использоваться взаимозаменяемо и могут означать активный ответ предложенных устройств для электропорации, который включает измерение тока в ткани между электродами и соответствующее изменение вырабатываемой устройством ЭП энергии, чтобы поддерживать ток на постоянном уровне. Этот постоянный уровень задается пользователем до инициации последовательности импульсов или электрической обработки. Обратная связь может осуществляться электропорационным компонентом, например, контроллером, устройства для электропорации, так как электрический контур в нем может непрерывно отслеживать ток в ткани между электродами и сравнивать этот отслеживаемый ток (или ток в ткани) с заданным током и непрерывно проводить корректировку вырабатываемой энергии для поддержания отслеживаемого тока на заданном уровне. Контур обратной связи может характеризоваться мгновенным действием, так как он является аналоговым замкнутым контуром обратной связи.

В контексте данного документа термин "децентрализованный ток" может означать профиль электрического тока, подаваемого из различных матриц с игольчатыми электродами описанных в данном документе устройств для электропорации, при этом профили минимизируют или, предпочтительно, устраняют появление связанного с электропорацией теплового стресса в любой области электропорированной ткани.

В контексте данного документа взаимозаменяемые термины "электропорация", "электропермеабиллизация" или "электрокинетическое усиление" ("ЭП") могут относиться к применению трансмембранных электрических импульсов для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране; их наличие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, мРНК, лекарства, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

В контексте данного документа термин "эндогенное антитело" может относиться к антителу, генерируемому у субъекта, которому вводят эффективную дозу антигена для индукции гуморального иммунного ответа.

В контексте данного документа термин "механизм обратной связи" может относиться к процессу, осуществляемому программным обеспечением или аппаратным обеспечением (или техническим обеспечением), который заключается в получении и сравнении импеданса необходимой ткани (до, во время и/или после подачи импульса энергии) с заданным значением, предпочтительно током, и коррекции подаваемого импульса энергии для достижения заданного значения. Механизм обратной связи может осуществляться аналоговым замкнутым контуром.

"Фрагмент" может обозначать полипептидный фрагмент антитела, который является функциональным, т.е. может связываться с необходимой мишенью и имеет такое же предполагаемое действие, что и полноразмерное антитело. Фрагмент антитела может быть на 100% идентичным полноразмерному антителу, за исключением отсутствия по меньшей мере одной аминокислоты в N- и/или C-конце, в каждом случае с сигнальными пептидами и/или метионином в позиции 1 или без. Фрагменты могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретного полноразмерного антитела, за исключением добавления любого гетерологичного сигнального пептида. Фрагмент может содержать фрагмент полипептида, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичен антителу, и дополнительно содержать N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не был включен при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно содержать N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. N-концевой метионин и/или сигнальный пептид могут быть связаны с фрагментом антитела.

Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, может быть на 100% идентичным полноразмерной последовательности, за исключением отсутствия по меньшей мере одного нуклеотида в 5' и/или 3' конце, в каждом случае с последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды и/или метионин в позиции 1, или без. Фрагменты могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов длины конкретной полноразмерной кодирующей последовательности, за исключением добавления любого гетерологичного сигнального пептида. Фрагмент может содержать фрагмент, который кодирует полипептид, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичен антителу, и дополнительно, необязательно, содержать последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не был включен при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно содержать последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Кодирующая последовательность, кодирующая N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может быть связана с фрагментом кодирующей последовательности.

В контексте данного документа термин "генетическая конструкция" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, такой как антитело. Термин "генетическая конструкция" может также относиться к молекуле ДНК, из которой транскрибирована РНК. Кодирующая последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. В контексте данного документа термин "форма с возможностью экспрессии" относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок так, что в случае присутствия в клетке индивида будет происходить экспрессия кодирующей последовательности.

Употребляемые в данном документа термины "идентичная" или "идентичность" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов могут означать, что последовательности имеют заданный процент остатков, являющихся одинаковыми на протяжении заданной области. Процент можно рассчитывать путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей на протяжении заданной области, определения числа позиций, в которых в обеих последовательностях находится идентичный остаток, для получения числа совпадающих позиций, деления числа совпадающих позиций на общее число позиций в заданной области и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В случае, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание приводит к получению одного или более ступенчатых концов и заданная область сравнения включает только одну последовательность, остатки этой одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель при расчете. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) могут считаться эквивалентными. Идентичность можно оценивать вручную, или используя компьютерный алгоритм выравнивания последовательностей, такой как BLAST или BLAST 2.0.

В контексте данного документа термин "импеданс" может использоваться при обсуждении механизма обратной связи и может быть преобразован в значение силы тока по закону Ома, делая возможным сравнение с текущим значением силы тока.

В контексте данного документа термин "иммунный ответ" может означать активацию иммунной системы организма-хозяина, например, млекопитающего, в ответ на внесение одной или более нуклеи-

новых кислот и/или пептидов. Иммунный ответ может иметь форму клеточного или гуморального ответа или их обоих.

В контексте данного документа термины "нуклеиновая кислота" или "олигонуклеотид", или "поли-нуклеотид" могут означать по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных вместе. Описание одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь описанной одной цепи. Много вариантов нуклеиновой кислоты можно использовать в тех же целях, что и заданную нуклеиновую кислоту. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает по существу идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные последовательности. Одна цепь обеспечивает зонд, который может гибридизироваться с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизируется в жестких условиях гибридизации.

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

В контексте данного документа выражение "функционально связанный" может означать, что экспрессия гена находится под управлением промотора, с которым он пространственно соединен. Промотор может располагаться 5' (выше) или 3' (ниже) гена, находящегося под его управлением. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же самым, что и расстояние между этим промотором и геном, которым он управляет, в гене, из которого получен промотор. Как известно в данной области техники это расстояние можно варьировать без потери функциональности промотора.

В контексте данного документа термины "пептид", "белок" или "полипептид" могут означать связанную последовательность аминокислот и могут быть природными, синтетическими или представлять собой модификацию или комбинацию природных и синтетических.

В контексте данного документа термин "промотор" может означать синтетическую или полученную из природного источника молекулу, которая способна обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических транскрипционных регуляторных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии. Промотор также может содержать удаленные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от начала участка транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивным или дифференциальным образом по отношению к клетке, ткани или органу, в которых происходит экспрессия, или по отношению к стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологический стресс, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типовые примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

Термины "сигнальный пептид" и "лидерная последовательность" взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть связана с аминоконцом приведенного в данном документе белка. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, как правило, управляют локализацией белка. Используемые в данном документе сигнальные пептиды/лидерные последовательности предпочтительно облегчают секрецию белка из клетки, в которой он вырабатывается. После секреции из клетки сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остатка белка, часто называемого зрелым белком. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности связаны с N-концом белка.

В контексте данного документа "жесткие условия гибридизации" могут означать условия, в которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизироваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в комплексной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Жесткие условия можно выбрать так, что они были на около 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH. T_m может представлять собой температуру (при определенных ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесном состоянии (так как последовательности-мишени присутствуют в избытке, при T_m , 50% зондов оказываются занятыми в равновесном состоянии). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли составляет менее чем около 1,0 М ионов натрия, например, около 0,01-1,0 М концентрация ионов натрия (или других солей) при pH 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере около

30°C для коротких зондов (например, около 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для длинных зондов (например, более чем около 50 нуклеотидов). Жесткие условия также можно обеспечить путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал может по меньшей мере в 2-10 раз превышать фоновую гибридизацию. Примеры жестких условий гибридизации включает следующие: 50% формамид, 5x SSC и 1% ДСН, инкубация при 42°C, или 5x SSC, 1% ДСН, инкубация при 65°C с промывкой в 0,2x SSC и 0,1% ДСН при 65°C.

В контексте данного документа взаимозаменяемо используемые термины "субъект" и "пациент" относятся к любому позвоночному, включая, но не ограничиваясь этим, млекопитающее (например, корову, свинью, верблюда, ламу, лошадь, козу, кролика, овцу, хомяков, морскую свинку, кошку, собаку, крысу и мышь, отличного от человека примата (например, обезьяну, такую как яванский или резус-макак, шимпанзе и т.д.) и человека). В некоторых вариантах реализации субъект может представлять собой человека или не человека. Субъект или пациент может проходить другие формы лечения.

В контексте данного документа выражение "по существу комплементарная" может означать, что первая последовательность по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична комплементарной цепи второй последовательности на протяжении 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизуются в жестких условиях гибридизации.

В контексте данного документа выражение "по существу идентичные" может означать, что первая и вторая последовательность идентичны по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% на протяжении области из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов или аминокислот, или, в случае нуклеиновых кислот, что первая последовательность является по существу комплементарной с комплементарной цепью второй последовательности.

В контексте данного документа термин "синтетическое антитело" относится к антителу, которое кодируется рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе, и вырабатывается в организме субъекта.

В контексте данного документа термин "лечение" может означать защиту субъекта от заболевания посредством предотвращения, супрессии, подавления или полного устранения заболевания. Предотвращение заболевания включает введение субъекту вакцины согласно настоящему изобретению до начала заболевания. Супрессия заболевания включает введение субъекту вакцины согласно настоящему изобретению после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Подавление заболевания включает введение субъекту вакцины согласно настоящему изобретению после клинического проявления заболевания.

Термин "вариант", используемый в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, может означать (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную цепь указанной нуклеотидной последовательности или ее часть; (iii) нуклеиновую кислоту, которая является по существу идентичной указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементарной цепи; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементарной цепью или последовательностью, по существу идентичной ей.

Термин "вариант" в отношении пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности вследствие вставки, делеции или консервативной замены аминокислот, но сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая является по существу идентичной указанному белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Консервативные замены аминокислот, т.е. замещение аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), известны в данной области техники как включающие, как правило, незначительные изменения. Эти незначительные изменения можно частично определить на основании индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области техники. Kyte с соавт., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на оценке ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности можно взаимно заменять с сохранением функции белка. В одном аспекте проводят замену аминокислот, имеющих индекс гидропатичности ± 2 . Гидрофильность аминокислот также можно использовать для определения замен, которые бы привели к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным показателем, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101, в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности,

может привести к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например, иммуногенность, как известно в данной области техники. Замены можно проводить с аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах ± 2 относительно друг друга. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретный тип боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением понятно, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, проявляемого в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по существу идентичной на протяжении всей длины последовательности всего гена или ее части. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной на протяжении всей длины последовательности гена или ее части. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной на протяжении всей длины аминокислотной последовательности или ее части. Аминокислотная последовательность может быть на 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной на протяжении всей длины аминокислотной последовательности или ее части.

В контексте данного документа термин "вектор" может означать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой плазмиду, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Вектор может представлять собой ДНК- или РНК-вектор. Вектор может представлять собой как самореплицирующийся внехромосомный вектор, так и вектор, который интегрируется в геном организма-хозяина.

В случае перечисления в данном документе числовых диапазонов явным образом и с той же степенью точности подразумевается и каждое промежуточное число. Например, в случае диапазона 6-9, кроме чисел 6 и 9 подразумеваются числа 7 и 8, а в случае диапазона 6,0-7,0, явным образом подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Композиция

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Изобретение также включает новые последовательности для применения в получении антител в клетках млекопитающих или для доставки в ДНК- или РНК-векторы, включая бактериальные, дрожжевые, а также вирусные векторы. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой последовательность ДНК, последовательность РНК или их комбинацию и/или производное. При введении нуждающемуся в этом субъекту композиция может приводить к генерации синтетического антитела в организме субъекта. Синтетическое антитело может связывать молекулу-мишень (т.е. IL-6 и CD126), присутствующую у субъекта. Такое связывание может нейтрализовать мишень, блокировать распознавание мишени другой молекулой, например белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на мишень.

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

В одном варианте реализации первая нуклеотидная последовательность, кодирующая первое синтетическое антитело, содержит первый домен, кодирующий область тяжелой цепи, и второй домен, кодирующий область легкой цепи первого синтетического антитела. В одном варианте реализации вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая второе синтетическое антитело, содержит первый домен, кодирующий область тяжелой цепи, и второй домен, кодирующий область легкой цепи второго синтетического антитела.

В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к IL-6. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к IL-6, содержит кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области VH и VL антитела к IL-6. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к IL-6, содержит кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие области CH и CL человеческого IgG1k.

В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к CD126. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к CD126, содержит кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области VH и VL антитела к CD126. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело к CD126, содержит кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие области CH и CL человеческого IgG1k.

следовательность иммуноглобулина, например, лидер IgE. В некоторых вариантах реализации фрагменты не содержат лидерную последовательность.

В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическое антитело к CD126, причем нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11, ее фрагменты или ее гомологичные последовательности.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая синтетическое антитело к CD126, содержит нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая синтетическое антитело к CD126, имеет по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 9.

Некоторые варианты реализации относятся к фрагментам с SEQ ID NO: 9. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 9.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая синтетическое антитело к CD126, содержит нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая синтетическое антитело к CD126, имеет по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты, приведенной в SEQ ID NO: 11.

Некоторые варианты реализации относятся к фрагментам с SEQ ID NO: 11. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 11.

Композиция настоящего изобретения может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания, расстройства или состояния, связанного с активностью IL-6 и/или CD126. В некоторых вариантах реализации композиция может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от воспаления. В некоторых вариантах реализации композиция может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от аутоиммунного заболевания или расстройства. В некоторых вариантах реализации композиция может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от рака.

Синтетическое антитело может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания у субъекта, которому вводят композицию. Синтетическое антитело посредством связывания с мишенью может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания у субъекта, которому вводят композицию. Синтетическое антитело может способствовать выживаемости при заболевании у субъекта, которому вводят композицию.

Синтетическое антитело может обеспечивать по меньшей мере около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% выживаемости при заболевании у субъекта, которому вводят композицию. В других вариантах реализации синтетическое антитело может обеспечивать по меньшей мере около 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80% выживаемости при заболевании у субъекта, которому вводят композицию.

Композиция может приводить к генерации синтетического антитела в организме субъекта в течение по меньшей мере около 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 13 ч, 14 ч, 15 ч, 20 ч, 25 ч, 30 ч, 35 ч, 40 ч, 45 ч, 50 ч или 60 ч после введения композиции субъекту. Композиция может приводить к генерации синтетического антитела в организме субъекта в течение по меньшей мере около 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или 10 суток после введения композиции субъекту. Композиция может приводить к генерации синтетического антитела в организме субъекта в течение от около 1 ч до около 6 суток, от около 1 ч до около 5 суток, от около 1 ч до около 4 суток, от около 1 ч до около 3 суток, от около 1 ч до около 2 суток, от около 1 ч до около 1 суток, от около 1 ч до около 72 ч, от около 1 ч до около 60 ч, от около 1 ч до около 48 ч, от около 1 ч до около 36 ч, от около 1 ч до около 24 ч, от около 1 ч до около 12 ч или от около 1 ч до около 6 ч после введения композиции субъекту.

При введении нуждающемуся в этом субъекту композиция может приводить к генерации синтетического антитела в организме субъекта быстрее, чем происходит генерация эндогенного антитела у субъекта, которому вводят антиген, чтобы индуцировать гуморальный иммунный ответ. Композиция может приводить к генерации синтетического антитела по меньшей мере на около 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или 10 суток раньше генерации эндогенного антитела у субъекта, которому вводят антиген, чтобы индуцировать гуморальный иммунный ответ.

Композиция согласно настоящему изобретению может иметь характеристики, необходимые для эффективных композиций, такие как безопасность в том смысле, что композиция не приводит к болезни или смерти; защита от болезни; обеспечение легкости введения, небольшое количество побочных явлений, биологическая стабильность и низкая стоимость, проходящаяся на дозу.

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты

Как описано выше, композиция может содержать рекомбинантную последовательность нуклеино-

вой кислоты.

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело более подробно описано ниже.

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты. Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере одну гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты или одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот.

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты. Такая оптимизация может повышать или изменять иммуногенность антитела. Оптимизация также может улучшать транскрипцию и/или трансляцию. Оптимизация может включать в себя одно или более из следующего: лидерную последовательность с низким содержанием GC для повышения транскрипции; стабильность мРНК и оптимизацию кодонов; добавление последовательности Козака (например, GCC ACC) для повышения трансляции; добавление лидерной последовательности иммуноглобулина (Ig), кодирующей сигнальный пептид; и удаление по мере возможности цис-действующих мотивов последовательностей (т.е. внутренних ТАТА-боксов).

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может содержать одну или более конструкций рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более компонентов, которые более подробно описаны ниже.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид тяжелой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует участок расщепления протеазой или пептидазой. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более лидерных последовательностей, причем лидерная последовательность кодирует сигнальный пептид. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более промоторов, один или более интронов, одну или более областей терминации транскрипции, один или более иницирующих кодонов, один или более терминирующих или стоп-кодонов и/или один или более сигналов полиаденилирования. Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты также может содержать одну или более линкерных или метящих последовательностей. Метящая последовательность может кодировать гемагглютининовую (ГА) метку.

Полипептид тяжелой цепи

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

В некоторых вариантах реализации полипептид тяжелой цепи может содержать область VH и область CH1. В других вариантах реализации полипептид тяжелой цепи может содержать область VH, область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

Полипептид тяжелой цепи может содержать набор определяющих комплементарность областей ("CDR"). Набор CDR может содержать три гипервариабельные области из области VH. Начиная с N-конца полипептида тяжелой цепи, эти CDR обозначаются "CDR1", "CDR2" и "CDR3" соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида тяжелой цепи могут вносить свой вклад в связывание или распознавание антигена.

Полипептид легкой цепи

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Полипептид легкой цепи может содержать вариабельную область легкой цепи (VL) и/или константную область легкой цепи (CL).

Полипептид легкой цепи может содержать набор определяющих комплементарность областей ("CDR"). Набор CDR может содержать три гипервариабельные области из области VL. Начиная с N-конца полипептида легкой цепи, эти CDR обозначаются "CDR1", "CDR2" и "CDR3" соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида легкой цепи могут вносить свой вклад в связывание или распознавание антигена.

Участок расщепления протеазой

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать

гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую участок расщепления протеазой. Участок расщепления протеазой может распознаваться протеазой или пептидазой. Протеаза может представлять собой эндопептидазу или эндопротеазу, например, но не ограничиваясь этим, фурин, эластазу, HtrA, кальпаин, трипсин, химотрипсин, трипсин и пепсин. Протеаза может представлять собой фурин. В других вариантах реализации протеаза может представлять собой сериновую протеазу, треониновую протеазу, цистеиновую протеазу, аспартатную протеазу, металлопротеазу, протеазу глутаминовой кислоты или любую протеазу, которая расщепляет внутреннюю пептидную связь (т.е. не расщепляет N-концевую или C-концевую пептидную связь).

Участок расщепления протеазой может содержать одну или более аминокислотных последовательностей, которые стимулируют расщепление или повышают его эффективность. Одна или более аминокислотных последовательностей могут стимулировать или повышать эффективность образования или генерации дискретных полипептидов. Одна или более аминокислотных последовательностей могут содержать 2A пептидную последовательность.

Линкерная последовательность

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более линкерных последовательностей. Линкерная последовательность может пространственно разделять или связывать один или более описанных в данном документе компонентов. В других вариантах реализации линкерная последовательность может кодировать аминокислотную последовательность, которая пространственно разделяет или связывает два или более полипептидов. Промотор Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более промоторов. Один или более промоторов могут представлять собой любой промотор, способный управлять генной экспрессией и регулировать генную экспрессию. Такой промотор представляет собой действующий элемент последовательности, необходимый для транскрипции с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Выбор промотора, применяемого для управления генной экспрессией, зависит от конкретного применения. Промотор может располагаться приблизительно на таком же расстоянии от точки начала транскрипции в конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, что и от точки начала транскрипции в своем природном окружении. При этом это расстояние можно варьировать без потери функциональности промотора.

Промотор может быть функционально связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи. Промотор может представлять собой промотор, эффективный для экспрессии в эукариотических клетках. Промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью, может представлять собой промотор ЦМВ, промотор вируса обезьян 40 (SV40), такой как ранний промотор SV40 и поздний промотор SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор длинных концевых повторов (ДКП) бычьего вируса иммунодефицита (БВИ), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ВЛП), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как немедленно-ранний промотор ЦМВ, промотор вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) или промотор вируса саркомы Рауса (BCR). Промотор также может представлять собой промотор из человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатинин, человеческий полиэдрин или человеческий металлотионеин.

Промотор может представлять собой конститутивный промотор или индуцибельный промотор, который инициирует транскрипцию, только когда клетка-хозяин подвергается воздействию некоторого внешнего стимула. В случае многоклеточного организма промотор также может быть специфическим в отношении конкретной ткани или органа, или стадии развития. Промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как промотор, специфический в отношении мышц или кожи, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US 20040175727, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Промотор может быть связан с энхансером. Энхансер может располагаться выше кодирующей последовательности. Энхансер может представлять собой энхансер человеческого актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатинина или вирусный энхансер, например, из ЦМВ, FMDV, РСВ или ВЭБ. Энхансеры полинуклеотидной функции описаны в патентах США № 5593972, 5962428 и WO 94/016737, содержание которых в полном объеме включено посредством ссылки.

Инtron

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более интронов. Каждый интрон может содержать функциональные донорные и акцепторные участки сплайсинга. Интрон может содержать энхансер сплайсинга. Интрон может содержать один или более сигналов, необходимых для эффективного сплайсинга.

Область терминции транскрипции

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более областей терминции транскрипции. Область терминции транскрипции может располагаться ниже кодирующей последовательности, чтобы обеспечивать эффективную терминцию. Область терми-

нации транскрипции может быть получена из того же гена, что и вышеописанный промотор, или может быть получена из одного или более других генов.

Иницирующий кодон

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более иницирующих кодонов. Иницирующий кодон может располагаться выше кодирующей последовательности. Иницирующий кодон может находиться в рамке с кодирующей последовательностью. Иницирующий кодон может быть связан с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной инициации трансляции, например, но не ограничиваясь этим, участком связывания рибосомы.

Терминирующий кодон

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более терминирующих или стоп-кодонов. Терминирующий кодон может располагаться ниже кодирующей последовательности. Терминирующий кодон может находиться в рамке с кодирующей последовательностью. Терминирующий кодон может быть связан с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной терминации трансляции.

Сигнал полиаденилирования

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более сигналов полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может содержать один или более сигналов, необходимых для эффективного полиаденилирования транскрипта. Сигнал полиаденилирования может располагаться ниже кодирующей последовательности. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования ДКП, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигнал полиаденилирования человеческого β -глобина. Сигнал полиаденилирования SV40 может представлять собой сигнал полиаденилирования из плазмиды pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

Лидерная последовательность

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более лидерных последовательностей. Лидерная последовательность может кодировать сигнальный пептид. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина (Ig), например, но не ограничиваясь этим, сигнальный пептид IgG и сигнальный пептид IgE.

Компоновка конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Как описано выше, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может содержать одну или более конструкций рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, при этом каждая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более компонентов. Один или более компонентов подробно описаны выше. Один или более компонентов, когда они включены в конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, могут располагаться в любом порядке по отношению друг к другу. В некоторых вариантах реализации один или более компонентов могут располагаться в конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты так, как описано ниже.

Компоновка 1.

В одной компоновке первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, а вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи.

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

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

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

Соответственно один пример компоновки 1 может включать первый вектор (и, таким образом, пер-

вую конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH и CH1, и второй вектор (и, таким образом, вторую конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL.

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

Компоновка 2.

Во второй компоновке конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид тяжелой цепи, может располагаться выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В альтернативном варианте гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид легкой цепи, может располагаться выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи.

Конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты можно помещать в вектор, как более подробно описано ниже.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок расщепления протеазой и/или линкерную последовательность. При включении в конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая участок расщепления протеазой, может располагаться между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Соответственно, участок расщепления протеазой позволяет разделять полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи на разные полипептиды после экспрессии. В других вариантах реализации при включении в конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты линкерной последовательности она может располагаться между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать промотор, интрон, область терминирования транскрипции, иницирующий кодон, терминирующий кодон и/или сигнал полиаденилирования. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более промоторов. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать два промотора так, что один промотор может быть связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, а второй промотор может быть связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один промотор, связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

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

Соответственно один пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором линкерная последовательность расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Второй пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая участок расщепления протеазой, расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид

тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Третий пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором линкерная последовательность расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Четвертый пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая участок расщепления протеазой, расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Экспрессия из конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать, в числе одного или более компонентов, гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и/или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Соответственно конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи.

В случае применения описанной выше компоновки 1 первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи, а вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида легкой цепи. В случае применения описанной выше компоновки 2 конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи.

После экспрессии, например, но не ограничиваясь этим, в клетке, организме или млекопитающем, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут формировать синтетическое антитело. В частности, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, способного связывать антиген. В других вариантах реализации полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, являющегося более иммуногенным по сравнению с антителом, не прошедшим описанную в данном документе сборку. В других вариантах реализации полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, способного вызывать или индуцировать иммунный ответ против антигена.

Векторы

Векторы включают, но не ограничиваются этим, плазмиды, векторы экспрессии, рекомбинантные вирусы, любую форму рекомбинантного вектора "голой ДНК" и т.п. "Вектор" содержит нуклеиновую кислоту, которая может инфицировать, трансфицировать, временно или постоянно трансдуцировать клетку. Следует понимать, что вектор может представлять собой "голую" нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту в комплексе с белком или липидом. Вектор необязательно содержит вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты, и/или белки, и/или мембраны (например, клеточную мембрану, вирусную липидную оболочку и т.д.). Векторы включают, но не ограничиваются этим, репликоны (например, репликоны РНК, бактериофаги), к которым могут быть прикреплены и становиться реплицируемыми фрагменты ДНК. Таким образом, векторы включают, но не ограничиваются этим, РНК, автономную самореплицирующуюся циркулярную или линейную ДНК или РНК (например, плазмиды, вирусы и т.п., см., например, патент США. № 5217879), и включают как экспрессионные, так и не экспрессионные плазмиды. Когда рекомбинантный микроорганизм или клеточная культура описывается как хозяин "вектора экспрессии", это означает, что они включают как внехромосомную циркулярную, так и линейную ДНК, и ДНК, которые были включены в хромосому(ы) хозяина. Когда вектор поддерживается в клетке-хозяине, вектор может либо стабильно реплицироваться клетками во время митоза как автономная структура, либо может быть включен в геном хозяина. Описанную выше конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты можно помещать в один или более векторов. Один или более векторов могут содержать точку начала репликации. Один или более векторов могут представлять собой плазмиду, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Один или более векторов могут представлять собой как самореплицирующийся внехромосомный вектор, так и вектор, который интегрируется в геном организма-хозяина.

Один или более векторов могут представлять собой гетерологичную экспрессионную конструкцию, которая в общем случае является плазмидой, которую используют для внесения конкретного гена в клет-

ку-мишень. После того, как экспрессионный вектор попадает в клетку, полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, которые кодируются конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, начинают вырабатываться рибосомальными комплексами клеточного аппарата транскрипции и трансляции. Один или более векторов могут экспрессировать большие количества стабильной матричной РНК и, следовательно, белков.

Экспрессионный вектор

Один или более векторов могут представлять собой кольцевую плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. Кольцевая плазида и линейная нуклеиновая кислота способны управлять экспрессией конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующей клетке субъекта. Один или более векторов, содержащих конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, могут быть химерными, что означает, что по меньшей мере один из их компонентов является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из других его компонентов.

Плазида

Один или более векторов могут представлять собой плазмиду. Плазмиду можно применять для трансфекции клеток конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Плазмиду можно применять для внесения конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты в организм субъекта. Плазида также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для генной экспрессии в клетке, в которую внесена плазида.

Плазида также может содержать точку начала репликации млекопитающего для внехромосомной поддержки плазмиды и выработки множества копий плазмиды в клетке. Плазида может представлять собой pVAX, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), которые могут содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр и область, кодирующую ядерный антиген EBNA-1, которая может обеспечивать многокопийную эписомальную репликацию без интеграции. Скелет плазмиды может представлять собой pAV0242. Плазида может представлять собой дефективную по репликации аденовирусную плазмиду типа 5 (Ad5).

Плазида может представлять собой pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для выработки белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Плазида также может представлять собой pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для выработки белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазида также может принадлежать полной бакуловирусной системе экспрессии MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для выработки белка в клетках насекомых. Плазида также может представлять собой pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которые можно использовать для выработки белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO).

РНК-векторы

В одном варианте реализации нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК. В одном варианте реализации молекула РНК транскрибирована из описанной в настоящем документе последовательности ДНК. Например, в некоторых вариантах реализации молекула РНК кодируется одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, или ее вариантом, или ее фрагментом. В другом варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из последовательности ДНК, кодирующей полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, или ее вариант или ее фрагмент. Соответственно, в одном варианте реализации в изобретении предложена молекула РНК, кодирующая одно или более антител или других молекул, описанных в настоящем документе. РНК может иметь дополнительную цепь. Соответственно, в некоторых вариантах реализации молекула РНК может быть транслирована клетками без необходимости каких-либо промежуточных этапов репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, подходящая для использования в изобретении, может иметь 5'-кэп (например, 7-метилгуанозин). Этот кэп может усиливать трансляцию РНК *in vivo*. 5'-нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь группу трифосфата на 5'-конце. В кэпированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином через мостик 5'-к-5'. Молекула РНК может иметь поли-А хвост на 3'-конце. Около своего 3'-конца она может также включать последовательность, отвечающую за распознавание поли-А полимеразы (например, AAUAAA). Молекула РНК, используемая в изобретении, обычно является одноцепочечной.

Кольцевой и линейный вектор

Один или более векторов могут представлять собой одну или более кольцевых плазмид, которые могут трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономно-реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации). Вектор может представлять собой pVAX, pcDNA3.0 или pGvax, или любой другой экспрессионный вектор, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты.

Также в данном документе предложена линейная нуклеиновая кислота или линейная экспрессионная кассета ("ЛЭК"), которую возможно эффективно доставлять субъекту путем электропорации и которая способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. ЛЭК может представлять со-

бой любую линейную ДНК, в которой отсутствует какой-либо фосфатный остов. ДНК может кодировать одно или более антител. ЛЭК может содержать промотор, интрон, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования. ЛЭК может не содержать каких-либо генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатный остов. ЛЭК может не содержать другие последовательности нуклеиновых кислот, не связанные с экспрессией необходимого антитела. ЛЭК можно эффективно доставлять субъекту путем электропорации, и она способна экспрессировать одно или более необходимых антител.

ЛЭК может быть получена из любой плазмиды, которую возможно линеаризовать. Ее можно также синтезировать без использования роста бактерий и не из линеаризованных последовательностей. Плазмида может быть способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Плазмида может представлять собой рNP (Пуэрто-Рико/34) или рМ2 (Новая Каледония/99). Плазмида может представлять собой WLV009, рVAX, рсDNA3.0 или рgrox, или любой другой экспрессионный вектор, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты.

ЛЭК может представлять собой рсМ2. ЛЭК может представлять собой рсrNP. рсrNP и рсrMR могут быть получены из рNP (Пуэрто-Рико/34) и рМ2 (Новая Каледония/99) соответственно.

Вирусные векторы

В одном варианте реализации предложены вирусные векторы, способные доставлять нуклеиновую кислоту настоящего изобретения в клетку. Экспрессионный вектор можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области и описаны, например, у Sambrook et al. (2001), и у Ausubel et al. (1997), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит участок начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селектируемых маркеров. (См., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193.) Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом переноса генов в клетки млекопитающих, например клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвируса, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, патент США №№ 5350674 и 5585362.

Способ получения вектора

В данном документе предложен способ получения одного или более векторов, в которые была помещена рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты. После конечного этапа субклонирования вектор можно использовать для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном ферментационном чане с помощью известных в данной области техники способов.

В других вариантах реализации после конечного этапа субклонирования вектор можно использовать с одним или более устройствами для электропорации (ЭП). Устройства для ЭП более подробно описаны ниже.

Один или более векторов можно готовить или получать, используя комбинацию известных устройств и методик, но предпочтительно их получают с помощью методики получения плазмид, описанной в лицензированной, одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявке США № 60/939792, поданной 23 мая 2007 г. В некоторых примерах описанные в данном документе ДНК-плазмиды можно готовить в концентрациях, превышающих или равных 10 мг/мл. Методики получения также включают применение различных устройств и протоколов, которые являются общеизвестными для специалистов в данной области техники, в дополнение описанным в заявке на патент США, серийный № 60/939792, включая описанные в лицензированном патенте США № 7238522, изданном 3 июля 2007 г. Вышеуказанные заявка и патент, серийный № 60/939792 и патент США № 7238522 соответственно в полном объеме включены в данный документ.

Антитело

Как описано выше, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело может связываться или вступать в реакцию с антигеном, который более подробно описан ниже.

Антитело может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания у субъекта, которому вводят композицию по изобретению. Антитело посредством связывания с антигеном может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания у субъекта, которому вводят композицию. Антитело может способствовать выживаемости при заболевании у субъекта, которому вводят композицию. В одном варианте реализации антитело может обеспечить повышенную выживаемость субъекта с заболеванием по сравнению с ожидаемой выживаемостью у имеющего заболевание субъекта, которому не вводили антитело. В различных вариантах реализации антитело может обеспечивать повышение выживаемости у субъекта с заболеванием, которому вводили композицию, по меньшей мере на около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%

больше по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии введения композиции. В одном варианте реализации антитело может обеспечить повышенную защиту от заболевания у субъекта по сравнению с ожидаемой защитой у субъекта, которому не вводили антитело. В различных вариантах реализации антитело может обеспечивать защиту от заболевания у субъекта, которому вводили композицию, по меньшей мере на около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% больше по сравнению с ожидаемой защитой при отсутствии введения композиции.

Антитело может содержать набор определяющих комплементарность областей ("CDR") тяжелой цепи и легкой цепи, перемежающих соответственно набор каркасных областей ("FR") тяжелой цепи и легкой цепи, которые обеспечивают поддержку CDR и определяют пространственную взаимосвязь CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельные области из V-области тяжелой или легкой цепи. Начиная с N-конца тяжелой или легкой цепи, эти CDR обозначаются "CDR1", "CDR2" и "CDR3" соответственно. Следовательно, антигенсвязывающий участок может включать шесть CDR, составляющих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

Протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, два из которых (фрагменты F(ab)) содержат ковалентный гетеродимер, который содержит интактный антигенсвязывающий участок. Фермент пепсин способен расщеплять молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, включая фрагмент F(ab')₂, который содержит оба антигенсвязывающих участка. Соответственно антитело может представлять собой Fab или F(ab')₂. Fab может содержать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи Fab может содержать область VH и область CH1. Полипептид легкой цепи Fab может содержать область VL и область CL.

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

Антитело может представлять собой поликлональное или моноклональное антитело. Антитело может представлять собой химерное антитело, одноцепочечное антитело, антитело с созревшей аффинностью, человеческое антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Гуманизированное антитело может представлять собой антитело от отличного от человека вида, которое связывает необходимый антиген, имеющее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) от отличного от человека вида и каркасные области из молекулы человеческого иммуноглобулина.

Антитело может представлять собой биспецифическое антитело, более подробно описанное ниже. Антитело может представлять собой бифункциональное антитело, также более подробно описанное ниже.

Как описано выше, антитело может генерироваться у субъекта после введения субъекту композиции. Антитело может характеризоваться определенным временем полужизни в организме субъекта. В некоторых вариантах реализации антитело можно модифицировать, чтобы продлить или укоротить его время полужизни в организме субъекта. Такие модификации более подробно описаны ниже.

Антитело может быть дефукозилированным, как более подробно описано ниже.

Антитело можно модифицировать, чтобы снизить или предотвратить антителозависимое усиление (АЗУ) заболевания, связанного с антигеном, как более подробно описано ниже.

Биспецифическое антитело

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать биспецифическое антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Биспецифическое антитело может связываться или вступать в реакцию с двумя антигенами, например, двумя антигенами, более подробно описанными ниже.

Биспецифическое антитело может состоять из фрагментов двух описанных в данном документе антител, что, таким образом, позволяет биспецифическому антителу связываться или вступать в реакцию с двумя необходимыми молекулами-мишенями, которые могут включать антиген, который более подробно описан ниже, лиганд, включая лиганд для рецептора, рецептор, включая лиганд-связывающий участок на рецепторе, комплекс лиганд-рецептор и маркер, включая раковый маркер.

Бифункциональное антитело

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать бифункциональное антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Бифункциональное антитело может связываться или вступать в реакцию с описанным ниже антигеном. Бифункциональное антитело также можно модифицировать, чтобы придать антителу дополнительную функциональность помимо распознавания и связывания антигена. Такая модификация может включать, но не ограничивается этим, сопряжение с фактором Н или его фрагментом. Фактор Н представляет собой растворимый регулятор активации комплемента и, таким образом, может вносить свой вклад в иммунный ответ посредством комплемент-опосредованного лизиса (КОЛ).

Продление времени полужизни антитела

Как описано выше, антитело можно модифицировать, чтобы продлить или укоротить время полужизни антитела в организме субъекта. Модификация может продлевать или укорачивать время полужизни антитела в сыворотке субъекта.

Модификация может присутствовать в константной области антитела. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в константной области антитела, которые продлевают время полужизни антитела по сравнению со временем полужизни антитела, не содержащего одну или более аминокислотных замен. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в домене СН2 антитела, которые продлевают время полужизни антитела по сравнению со временем полужизни антитела, не содержащего одну или более аминокислотных замен.

В некоторых вариантах реализации одна или более аминокислотных замен в константной области могут включать замещение остатка метионина в константной области остатком тирозина, остатка серина в константной области остатком треонина, остатка треонина в константной области остатком глутамата или любую их комбинацию, продлевая, таким образом, время полужизни антитела.

В других вариантах реализации одна или более аминокислотных замен в константной области могут включать замещение остатка метионина в домене СН2 остатком тирозина, остатка серина в домене СН2 остатком треонина, остатка треонина в домене СН2 остатком глутамата или любую их комбинацию, продлевая, таким образом, время полужизни антитела.

Дефукозилирование

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, которое не является фукозилированным (т.е. дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело), его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Фукозилирование включает добавление к молекуле сахара фукозы, например, присоединение фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области. В свою очередь, это отсутствие фукозилирования может улучшать связывание FcγRIIIa и антителозависимую клеточную цитотоксическую (АЗКЦ) активность антитела по сравнению с фукозилированным антителом. Следовательно, в некоторых вариантах реализации нефукозилированное антитело может проявлять повышенную активность АЗКЦ по сравнению с фукозилированным антителом.

Антитело можно модифицировать так, чтобы предотвратить или ингибировать фукозилирование антитела. В некоторых вариантах реализации такое модифицированное антитело может проявлять повышенную активность АЗКЦ по сравнению с немодифицированным антителом. Модификация может присутствовать в тяжелой цепи, легкой цепи или их комбинации. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в тяжелой цепи, одну или более аминокислотных замен в легкой цепи или их комбинацию.

Сниженный ответ АЗУ

Антитело можно модифицировать, чтобы снизить или предотвратить антителозависимое усиление (АЗУ) заболевания, связанного с антигеном, но при этом нейтрализовать антиген.

В некоторых вариантах реализации антитело можно модифицировать так, чтобы оно содержало одну или более аминокислотных замен, которые снижают или предотвращают связывание антитела с FcγRIa. Одна или более аминокислотных замен могут присутствовать в константной области антитела. Одна или более аминокислотных замен могут включать замещение остатка лейцина остатком аланина в константной области антитела, т.е. также называемое в данном документе LA, мутацией LA или заменой LA. Одна или более аминокислотных замен могут включать замещение каждого из двух остатков лейцина остатком аланина в константной области антитела, которое также называется в данном документе LALA, мутацией LALA или заменой LALA. Присутствие замен LALA может предотвращать или блокировать связывание антитела с FcγRIa и, таким образом, модифицированное антитело не усиливает заболевание или не вызывает АЗУ заболевания, связанного с антигеном, но при этом нейтрализует антиген. Мишень Синтетическое антитело направлено на мишень или ее фрагмент или вариант. Мишень может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, аминокислотную последовательность или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, κДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

В одном варианте реализации мишень представляет собой IL-6. В одном варианте реализации мишень представляет собой CD126. IL-6 и его рецептор CD126 стимулируют воспалительные и аутоиммунные процессы при многих заболеваниях, включая, но не ограничиваясь этим, диабет, атеросклероз, депрессию, болезнь Альцгеймера, системную красную волчанку, множественную миелому, рак, болезнь Бехчета и ревматоидный артрит.

Вспомогательные вещества и другие компоненты композиции

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой функциональные молекулы, такие как молекулы базовых растворов, носителей или разбавителей. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой облегчающий трансфекцию агент, который может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИМКМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфорилилипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липосомы,

ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию агенты.

Облегчающий трансфекцию агент представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Облегчающий трансфекцию агент представляет собой поли-L-глутамат, а поли-L-глутамат может присутствовать в композиции в концентрации менее 6 мг/мл. Облегчающий трансфекцию агент, который также может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИМКМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфорилипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, и гиалуроновую кислоту, также можно использовать для введения в сочетании с композицией. Композиция также может содержать облегчающий трансфекцию агент, такой как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосом (смотрите, например, WO 9324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию агенты. Облегчающий трансфекцию агент представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрация трансфекционного агента в вакцине составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Композиция может дополнительно содержать генетический вспомогательный агент, как описано в заявке на патент США № 021,579, поданной 1 апреля 1994 г., содержание которой в полном объеме включено путем ссылки.

Композиция может содержать ДНК в количестве от около 1 нг до 100 мкг; от около 1 мкг до около 10 мкг; или предпочтительно от около 0,1 мкг до около 10 мкг; или более предпочтительно от около 1 мкг до около 2 мкг. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит от около 5 нг до около 1000 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция может содержать от около 10 нг до около 800 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция может содержать от около 0,1 до около 500 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция может содержать от около 1 до около 350 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации композиция может содержать от около 25 до около 250 мкг, от около 100 до около 200 мкг, от около 1 нг до 100 мкг; от около 1 мкг до около 10 мкг; от около 0,1 мкг до около 10 мкг; от около 1 мкг до около 2 мкг, от около 5 нг до около 1000 мкг, от около 10 нг до около 800 мкг, от около 0,1 до около 500 мкг, от около 1 до около 350 мкг, от около 25 до около 250 мкг, от около 100 до около 200 мкг ДНК.

Композиция может быть приготовлена в соответствии с применяемым режимом введения. Инъекционная фармацевтическая композиция может быть стерильной, апиrogenной и не содержать частиц. Можно использовать изотонический состав или раствор. Добавки для придания изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Композиция может содержать сосудосуживающий агент. Изотонические растворы могут включать фосфатно-солевой буфер. Композиция может дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизаторы могут обеспечивать стабильность состава при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение длительных периодов времени, включая LGS или поликатионы или полианионы.

Способ получения синтетического антитела

Настоящее изобретение также относится к способу генерации синтетического антитела. Этот способ может включать введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, применяя способ доставки, более подробно описанный ниже. Соответственно синтетическое антитело генерируется в организме субъекта или *in vivo* после введения субъекту композиции.

Этот способ также может включать внесение композиции в одну или более клеток и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или вырабатываться в одной или более клетках. Этот способ также может включать внесение композиции в одну или более тканей, например, но без ограничений, кожу и мышцы, и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или вырабатываться в одной или более тканях.

Способ определения или скрининга антитела Настоящее изобретение дополнительно относится к способу определения или скрининга описанного выше антитела, которое вступает в реакцию или связывается с описанным выше антигеном. В способе определения или скрининга антитела можно использовать антиген с применением методик, известных специалистам в данной области техники, для определения или скрининга антитела. Такие методики включают, но не ограничиваются этим, выбор антитела из библиотеки (например, фагового дисплея) и иммунизацию животного с последующим выделением и/или очисткой антитела.

Способ доставки композиции

Настоящее изобретение также относится к способу доставки композиции нуждающемуся в этом субъекту. Способ доставки может включать введение композиции субъекту. Введение может включать, но не ограничивается этим, инъекцию нуклеиновой кислоты (например, ДНК и/или РНК или их модифицированных вариантов) с проведением или без проведения электропорации *in vivo*, опосредованную липосомами доставку и облегчаемую наночастицами доставку.

Млекопитающее, получающее доставку композиции, может представлять собой человека, примата, отличного от человека примата, корову, крупный рогатый скот, овцу, козу, антилопу, бизона, буйвола, бизона, быков, оленя, ежей, слонов, ламу, альпака, мышей, крыс и кур.

Композицию можно вводить разными путями, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, ингаляционный, буккальный, интраплевральный, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, интратекальный и внутрисуставной или их комбинацию. В случае ветеринарного применения композицию можно вводить в подходящем приемлемом составе в соответствии с общепринятой ветеринарной практикой. Ветеринар может без труда определить режим дозирования и путь введения, которые наиболее подходят для конкретного животного. Композицию можно вводить с помощью традиционных шприцов, безыгольных устройств для инъекций, "пушек для бомбардировки микрочастицами" или других физических способов, таких как электропорация ("ЭП"), "гидродинамический способ" или ультразвук.

Электропорация

Введение композиции посредством электропорации можно осуществлять, используя устройства для электропорации, которые могут быть выполнены с возможностью подачи в необходимые ткани млекопитающего импульса энергии, эффективного для стимуляции образования обратимых пор в клеточных мембранах, и предпочтительно импульс энергии представляет собой постоянный ток, аналогичный предварительно заданному пользователем входному току. Устройство для электропорации может содержать электропорационный компонент и комплект электродов или комплект рукояток. Электропорационный компонент может содержать и включать один или более различных элементов устройств для электропорации, включая: контроллер, генератор формы тока, тестер импеданса, устройство регистрации формы сигнала, элемент ввода, элемент отчета о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и переключатель питания. Электропорацию можно осуществлять, используя устройство для *in vivo* электропорации, например, систему CELLECTRA EP (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA) или электропоратор Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA), чтобы облегчить трансфекцию клеток плазмидой.

Электропорационный компонент может функционировать как один элемент устройств для электропорации, а другие элементы являются отдельными элементами (или компонентами), связанными с электропорационным компонентом. Электропорационный компонент может функционировать как более чем один элемент устройств для электропорации, который может быть связан с другими элементами устройств для электропорации, отдельными от электропорационного компонента. Элементы и устройства для электропорации, являющиеся частями одного электромеханического или механического устройства, могут не ограничиваться, так как эти элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы, связанные друг с другом. Электропорационный компонент может подавать импульс энергии, который обеспечивает постоянный ток в необходимой ткани, и содержит механизм обратной связи. Комплект электродов может включать матрицу из электродов, содержащую некоторое количество пространственно упорядоченных электродов, при этом комплект электродов получает импульс энергии от электропорационного компонента и доставляет его в необходимую ткань через электроды. По меньшей мере один из некоторого количества электродов является нейтральным во время подачи импульса энергии и измеряет импеданс в необходимой ткани и передает значение импеданса на электропорационный компонент. Механизм обратной связи может получать измеренное значение импеданса и может корректировать импульс энергии, подаваемый электропорационным компонентом, для поддержания постоянного тока.

Некоторое количество электродов могут подавать импульс энергии на децентрализованную схему. Некоторое количество электродов могут подавать импульс энергии на децентрализованную схему посредством управления электродами согласно программируемой последовательности, а программируемая последовательность вводится пользователем в электропорационный компонент. Программируемая последовательность может включать некоторое количество импульсов, подаваемых в последовательности, причем каждый импульс из некоторого количества импульсов подается по меньшей мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс, а следующий импульс из некоторого количества импульсов подается другим из по меньшей мере двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс.

Механизм обратной связи может осуществляться аппаратным или программным обеспечением. Механизм обратной связи может осуществляться аналоговым замкнутым контуром. Обратная связь происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но предпочтительно представляет собой обратную связь в режиме реального времени или мгновенную (т.е. по существу мгновенную по определению доступными методами определения времени ответа). Нейтральный электрод может измерять значение импеданса в необходимой ткани и передавать значение импеданса на механизм обратной связи, а механизм обратной связи в ответ на значение импеданса корректирует импульс энергии для поддержания значения постоянного тока, аналогичного предварительно заданному току. Механизм обратной связи может поддерживать постоянный ток непрерывно и мгновенно во время подачи импульса энергии.

Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчить доставку композиции согласно настоящему изобретению, включают описанные в патенте США № 7245963 авторства Draghia-Akli, с соавт., публикации патента США 2005/0052630, поданной Smith, с соавт., содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. Другие устройства для электропорации и способы электропорации, которые можно использовать для облегчения доставки композиции, включают предложенные в одновременно находящейся на рассмотрении заявке одних заявителей на патент США, серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 г., которая заявляет приоритет согласно 35 USC 119 (e) предварительных заявок США № 60/852,149, поданной 17 октября 2006 г., и 60/978,982, поданной 10 октября 2007 г., которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В патенте США № 7245963 авторства Draghia-Akli, с соавт. описаны модульные системы электродов и их применение для облегчения внесения биомолекул в клетки выбранной ткани в организме или растении. Модульные системы электродов могут содержать некоторое количество игольчатых электродов; гиподермическую иглу; электрический соединитель, который обеспечивает проводящее соединение программируемого импульсного контроллера постоянного тока с некоторым количеством игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может брать некоторое количество игольчатых электродов, которые находятся на опорной конструкции и плотно вставлять их в выбранную ткань в организме или растении. Затем происходит доставка биомолекул в выбранную ткань через гиподермическую иглу. Происходит активация программируемого импульсного контроллера постоянного тока и применение электрического импульса постоянного тока к некоторому количеству игольчатых электродов. Применяемый электрический импульс постоянного тока облегчает внесение биомолекулы в клетку между некоторым количеством электродов. Полное содержание патента США № 7245963 включено в данный документ посредством ссылки.

В публикации патента США 2005/0052630, поданной Smith, с соавт., описано устройство для электропорации, которое можно использовать, чтобы эффективным образом облегчать внесение биомолекул в клетки выбранной ткани в организме или растении. Устройство для электропорации содержит электрокинетическое устройство ("ЭКУ устройство"), чья работа определяется программным или встроенным программным обеспечением. ЭКУ устройство создает ряд программируемых профилей импульсов постоянного тока между электродами в матрице под управлением пользователем и на основании введенных параметров импульсов и позволяет хранить и получать данные по форме тока. Устройство для электропорации также содержит сменный электродный диск, содержащий матрицу из игольчатых электродов, центральный инъекционный канал для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Полное содержание публикации патента США 2005/0052630 включено в данный документ посредством ссылки.

Электродные матрицы и способы, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/0052630, можно адаптировать для глубокого проникновения не только в ткани, такие как мышцы, но также в другие ткани или органы. Вследствие конфигурации электродной матрицы инъекционная игла (для доставки биомолекулы по выбору) также полностью вставляется в целевой орган, а инъекция проводится перпендикулярно целевой ткани в области, которая заранее намечена электродами. Электроды, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/005263, предпочтительно имеют длину 20 мм и калибр 21.

Кроме того, подразумевается, что в некоторых вариантах реализации, которые включают устройства для электропорации и их применение, используются устройства для электропорации, описанные в следующих патентах: патент США 5273525, выданный 28 декабря 1993 г., патенты США 6110161, выданный 29 августа 2000 г., 6261281, выданный 17 июля 2001 г., и 6958060, выданный 25 октября 2005 г., и патент США 6939862, выданный 6 сентября 2005 г. Кроме того, в данном документе предусмотрено применение материалов из патентов, относящихся к предмету обсуждения, таких как патент США 6697669, выданный 24 февраля 2004 г., который относится к доставке ДНК с помощью различных устройств, и патент США 7328064, выданный 5 февраля 2008, относящийся к способу инъекции ДНК. Вышеуказанные патенты в полном объеме включены посредством ссылки.

Способ лечения

Также в данном документе предложен способ лечения, защиты от и/или предотвращения заболевания у нуждающегося в этом субъекта путем генерации синтетического антитела в организме субъекта. Способ может включать введение композиции субъекту. Введение композиции субъекту можно осуществлять, используя описанный выше способ доставки.

В некоторых вариантах реализации в изобретении предложен способ лечения, защиты от и/или предотвращения заболевания, связанного с IL-6 и/или CD126. Например, в одном варианте реализации способ обеспечивает лечение, защиту от и/или предотвращение аутоиммунного расстройства. В одном варианте реализации способ обеспечивает лечение, защиту от и/или предотвращение рака. Примеры заболеваний или расстройств, которые можно лечить или предотвращать путем введения композиции по изобретению, включают, без ограничений, диабет, атеросклероз, депрессию, болезнь Альцгеймера, системную красную волчанку, множественную миелому, рак, болезнь Бехчета, ревматоидный артрит, сепсис, бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию, многоочаговую болезнь Кастле-

мана, любое заболевание, связанное с высокой температурой тела, реакцию "трансплантат против хозяина" (GVH), синдром клеточного лизиса и т.п.

После генерации синтетического антитела в организме субъекта синтетическое антитело может связываться или вступать в реакцию с антигеном. Такое связывание может нейтрализовать антиген, блокировать распознавание антигена другой молекулой, например, белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на антиген, осуществляя, таким образом, лечение, защиту от и/или предотвращение заболевания, связанного с антигеном, у субъекта.

Доза композиции может составлять от 1 мкг до 100 мг активного компонента/кг массы тела/ время и может составлять от 20 мкг до 100 мг компонента/кг массы тела/время. Композицию можно вводить каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 сутки. Число доз композиции для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Настоящее изобретение имеет множество аспектов, проиллюстрированных следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах. Следует понимать, что эти примеры, хотя в них и указаны предпочтительные варианты реализации изобретения, приведены исключительно в иллюстративных целях. Из приведенного выше обсуждения и этих примеров специалист в данной области техники может установить важные характеристики этого изобретения и, не выходя за рамки его сущности и объема, может осуществлять различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его под различные потребности и условия. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе станут очевидны для специалистов в данной области техники из вышеприведенного описания. Также подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1.

Представленные в данном документе исследования демонстрируют генерацию функциональных "ДНК-моноклональных антител" (DMAb) к IL-6 и к CD126 посредством внутримышечной электропорации плазмидной ДНК.

Эти исследования демонстрируют, что функциональные ДНК-моноклональные антитела (DMAb), нацеленные на IL-6 и CD126, экспрессируются *in vivo*. В константном домене человеческого IgG1 были сконструированы кодон-оптимизированные последовательности ДНК варибельной области из четырех моноклональных антител к IL-6 и двух моноклональных антител к CD126. Плазмидную ДНК, кодирующую каждое антитело, доставляли внутримышечно с применением электропорации голым и иммунокомпетентным мышам. Для усиления экспрессии *in vivo* были оптимизированы множественные аспекты доставки DMAb, включая последовательность антитела, расположение тяжелой и легкой цепей плазмиды, а также состав.

Антитела DMAb к IL-6 и к CD126 экспрессировались в сыворотке мышей BALB/c на уровнях в диапазоне от 1,5 мкг/мл до 7,1 мкг/мл. Кроме того, наблюдали за долгосрочной экспрессией DMAb у голых мышей. DMAb сохраняло в сыворотке функциональное связывание с очищенными IL-6 и CD126. DMAb в сыворотке также блокировало нисходящую клеточную сигнализацию IL-6 *in vitro*. Проводятся исследования для изучения роли DMAb к IL-6 и к CD126 в контроле сепсиса, ограничении воспаления при острой вирусной инфекции и замедлении прогрессирования опухоли. Эти исследования не только обеспечивают новый способ дальнейшего определения роли сигнализации IL-6 *in vivo* при патологических состояниях иммунной системы, но также определяют DMAb как альтернативу терапевтическим средствам в виде белковых антител.

Это исследование поддерживает DMAb как альтернативу существующим биологическим препаратам и обеспечивает новый способ дальнейшего определения роли сигнализации IL-6 *in vivo* при патологических состояниях иммунной системы.

Далее будут описаны материалы и способы.

Последовательности и клонирование ДНК антител.

Проводили оптимизацию кодонов аминокислотных последовательностей варибельной области VH и VL антител к IL6 (клазакизумаб [Alder Biopharmaceuticals], олокизумаб [R-Pharm], силтуксимаб [Сильвант®, Janssen Biotech], сирукумаб [Centocor/GSK]) и антител к CD126 (сарилумаб [Regeneron Pharmaceuticals], тоцилизумаб [Актерма®, Genentech]). Были синтезированы последовательности ДНК с кодон-оптимизированным константным человеческим IgG1к и клонированы в модифицированную плазмиду экспрессии млекопитающих pVax-1 (Invitrogen). Сайт расщепления фурином/пептидом 2А был включен для разделения пептидов тяжелых и легких цепей (фиг. 1).

Трансфекции.

Клетки 293Т в количестве 1×10^6 трансфицировали с использованием 0,5 мкг плазмидной ДНК с помощью реагента для трансфекции GeneJammer (Agilent Technologies). Клеточные супернатанты и полные клеточные лизаты собирали через 48 ч после трансфекции.

Электропорация DMAb.

Мышам линии BALB/c вводили 100 мкг состава с плазмидной ДНК внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра с последующим проведением электропорации с помощью устройства CELLECTRA® 3P (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA), как было описано ранее (Flingai et al., 2015, Sci Rep, 5:12616; Muthumani et al., 2013, Hum Vaccin Immunother, 9(10): 2253-63).

ELISA и вестерн-блот.

Человеческий IgG1к захватывали с использованием антител к Fc-фрагментам человека и обнаруживали с помощью вторичного антитела к легкой цепи каппа, конъюгированного с HRP, с проведением количественной оценки в сравнении с контрольным IgG1к человека (Bethyl). Связывание с рекомбинантным человеческим IL-6 и CD126 (Sino Biological) обнаруживали с помощью вторичного антитела к IgG человека, конъюгированного с HRP (Sigma). Были разработаны вестерн-блоты с конъюгированным антителом к IgG человека с детекцией при 800 нм (Licor).

Анализ сигнализации STAT3.

Клетки HEK-Blue™ 293 стабильно трансфицированные CD126 человека и STAT3-индуцированной секретированной щелочной фосфатазой, заказывали в компании InVivoGen. Мышиную сыворотку разводили в среде для культивирования в соотношении 1:40 и добавляли к клеткам, обработанным 1 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-6. Через 24 ч проводили анализ SEAP в супернатанте посредством калориметрического анализа QuantiBlue™ (InVivoGen). Значения абсорбции были нормализованы на экспрессию SEAP в клетках, к которым добавляли сыворотку от необработанных мышей (без DMAb). В качестве контроля служил TNF-альфа в концентрации 10 мкг/мл.

Ниже описаны результаты экспериментов.

Внутримышечная электропорация плазмидной ДНК, содержащей последовательности антител к IL-6 и антител к CD126, генерирует *in vivo* моноклональные антитела из мышечной ткани.

Кодон-оптимизированные последовательности ДНК варибельной области из моноклональных антител к IL-6 и антител к CD126 синтезировали в константном домене человеческого IgG1. Мышам линии BALB/c вводили плазмидную ДНК, кодирующую антитело (фиг. 1). Проводили оптимизацию кодонов аминокислотных последовательностей ДНК варибельной области VH и VL моноклональных антител. Кодон-оптимизированную ДНК синтезировали с последовательностями ДНК константных областей CH и CL человеческого антитела IgG1к. Сконструированную последовательность ДНК клонировали в модифицированный экспрессионный вектор pVax-1. Плазмидную конструкцию вводили внутримышечно путем инъекции с последующим проведением электропорации с помощью устройства CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals). Измеряли показатели экспрессии и определяли функции человеческого IgG1к, полученного *in vivo*.

Конструкции DMAb экспрессируются и секретируются из трансфицированных клеток 293T.

Проводили эксперименты для оценки экспрессии и секреции антител к IL-6 и антител к CD126, кодируемых конструкцией DMAb. Клетки HEK 293T трансфицировали плазмидной ДНК, несущей конструкции антитела к IL-6 или антитела к CD126. Пустая плазида служила в качестве отрицательного контроля.

Экспрессию человеческого IgG1к определяли с помощью количественного анализа ELISA, а также проводили вестерн-блот для выявления расщепления и экспрессии пептида с тяжелой и легкой цепью в супернатанте (фиг. 2A-2C). Как показано на фиг. 2A и 2B, в супернатанте HEK 293T и лизате HEK 293T присутствовали антитела к IL-6 и антитело к CD126, что демонстрирует способность конструкций DMAb индуцировать экспрессию и секрецию антитела к IL-6 и антитела к CD126.

Устойчивые уровни ДНК-моноклональных антител к IL-6 и к CD126 в сыворотке у мышей после электропорации ДНК.

Проводили эксперименты для оценки того, индуцирует ли DMAb экспрессию антител к IL-6 и антител к CD126 *in vivo*. Мышам линии BALB/c вводили посредством в/м инъекции 100 мкг плазмидной ДНК с последующим проведением электропорации. Через семь дней с помощью ELISA определяли уровни человеческого антитела IgG1к в сыворотке. Как показано на фиг. 3A и 3B, после электропорации в мышцу ДНК, в мышинной сыворотке продуцируются высокие уровни антител к IL-6 и антител к CD126.

ДНК-моноклональные антитела в сыворотке связывают антигены-мишени IL-6 и CD126.

Проводили эксперименты для исследования функциональности экспрессированных антител к IL-6 и антител к CD126. Мышам линии BALB/c вводили посредством инъекции 100 мкг плазмидной ДНК с последующим проведением внутримышечной электропорации. Через одну неделю с помощью ELISA определяли связывание человеческого антитела IgG с рекомбинантным человеческим IL-6 и человеческим CD126 в сыворотке. Как показано на фиг. 4, экспрессированные антитела связываются с антигенами-мишенями IL-6 и CD126.

ДНК-моноклональные антитела в сыворотке блокируют опосредованную IL-6 клеточную сигнализацию *in vitro*.

Проводили эксперименты для исследования того, могут ли экспрессированные антитела ингибировать опосредованную IL-6 сигнализацию. Были получены клетки HEK-293, стабильно трансфицирован-

ные человеческим CD126 и STAT3-индуцибельной секретированной щелочной фосфатазой (SEAP). Разведенная сыворотка (1:40) от необработанных мышей индуцировала базовый уровень экспрессии SEAP, обусловленной мышинным IL-6, который был нормализован до 100% активности SEAP в клеточных супернатантах. Разводили сыворотку (1:40), полученную на день 7 от мышей, которым проводили электропорацию DMAb, и проводили анализ клеточных супернатантов на активность SEAP, выраженную в виде процентной доли от необработанного контроля. Клетки HEK-293 секретируют SEAP в ответ на сигнализацию IL-6. Как показано на фиг. 5, сыворотка от мышей, которым вводили конструкции DMAb, кодирующую антитело к IL-6, блокирует активность SEAP, демонстрируя, что кодированные антитела могут блокировать опосредованную IL-6 сигнализацию.

Представленные в настоящем документе эксперименты демонстрируют, что после внутримышечной электропорации конструкции плазмидной ДНК, экспрессирующей кодон-оптимизированные последовательности варибельной области антитела, в мышинной сыворотке *in vivo* экспрессируются ДНК-моноклональные антитела (DMAb) к IL-6 и к CD126 в высоких концентрациях. Антитела, полученные из мышечных клеток *in vivo*, являются функциональными, связывающими и сигнализирующими *in vitro*. DMAb обеспечивают безопасную, экономически выгодную, практическую альтернативу препаратам из очищенных белковых моноклональных антител, нацеленных на IL-6 и CD126. Проводится изучение роли IL-6 в контроле сепсиса, ограничении воспаления при острой вирусной инфекции и замедлении прогрессирования опухоли.

DMAb имеют несколько преимуществ по сравнению очищенным белковым mAb и вирусными векторами. По сравнению с белковым mAb, DMAb является относительно недорогим в производстве; термически стабильным; легко распространяемым; модифицируемым; а также индуцирует постоянную экспрессию без необходимости частого повторного введения. По сравнению с вирусными векторами, DMAb является безопасным и не интегрируемым; неиммуногенным; его можно доставлять повторно; для него нет уже существующих серологических характеристик; вызывает быструю экспрессию вскоре после введения. Мощная и стойкая экспрессия DMAb обеспечивает существенные преимущества для лечения хронических состояний с потенциальной необходимостью повторного введения препаратов, таких как рак и аутоиммунное заболевание. Недорогое производство и распространение ДНК-вектора обеспечивает повышенную доступность, особенно в развивающихся странах, в которых существует затяжная нужда.

Понятно, что вышеприведенное подробное описание и сопроводительные примеры являются всего лишь иллюстративными, и их не следует воспринимать как ограничение объема изобретения, который определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Для специалистов в данной области техники очевидно существование различных изменений и модификаций описанных вариантов реализации. Такие изменения и модификации, включая, без ограничения, относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным соединениям, синтезу, композициям, составам или способам применения изобретения, можно осуществлять, не отступая от его сущности и объема.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая одну или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих одно или более синтетических антител,

причем одно или более синтетических антител блокирует по меньшей мере одну опосредованную IL-6 клеточную сигнализацию и причем одна или более молекул нуклеиновых кислот содержат по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело к IL-6; и

б) нуклеотидной последовательности, кодирующей функциональный фрагмент синтетического антитела к IL-6;

где нуклеотидная последовательность, кодирующая синтетическое антитело против IL-6, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и функционального фрагмента SEQ ID NO: 1; и/или

где синтетическое антитело против IL-6 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и функционального фрагмента SEQ ID NO: 2.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическое антитело к IL-6, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и функционального фрагмента SEQ ID NO: 2.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая синтетическое антитело к IL-6, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и функционального фрагмента SEQ ID NO: 1.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления протеазой или домен расщепления пептидазой.

5. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую варибельную область тяжелой цепи антитела к IL-6 и варибельную область легкой цепи анти-

тела к IL-6.

6. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи человеческого IgG1κ и константную область легкой цепи человеческого IgG1κ.

7. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела к IL-6; константную область тяжелой цепи человеческого IgG1κ; домен расщепления; переменную область легкой цепи антитела к IL-6; и константную область легкой цепи IgG1κ.

8. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность содержит лидерную последовательность.

9. Экспрессионный вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому одному из пп.1-8.

10. Композиция для лечения заболевания, где композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты по любому одному из пп.1-9 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, где заболевание представляет собой заболевание, нарушение или патологическое состояние, связанное с активностью IL-6.

11. Композиция по п.10, где фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из функциональной молекулы, носителя, разбавителя, облегчающего трансфекцию агента, поверхностно-активного агента и/или любой их комбинации.

12. Способ лечения заболевания у субъекта, который включает введение субъекту молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9 или композиции по любому из пп.10, 11, где заболевание представляет собой заболевание, нарушение или патологическое состояние, связанное с активностью IL-6.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой рак.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

15. Способ по п.12, отличающийся тем, что патологическое состояние представляет собой сепсис.

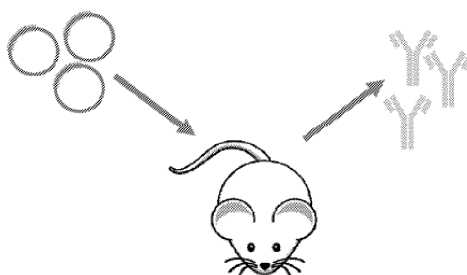
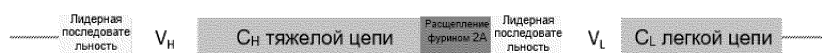
16. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

17. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой многоочаговую болезнь Кастлемана.

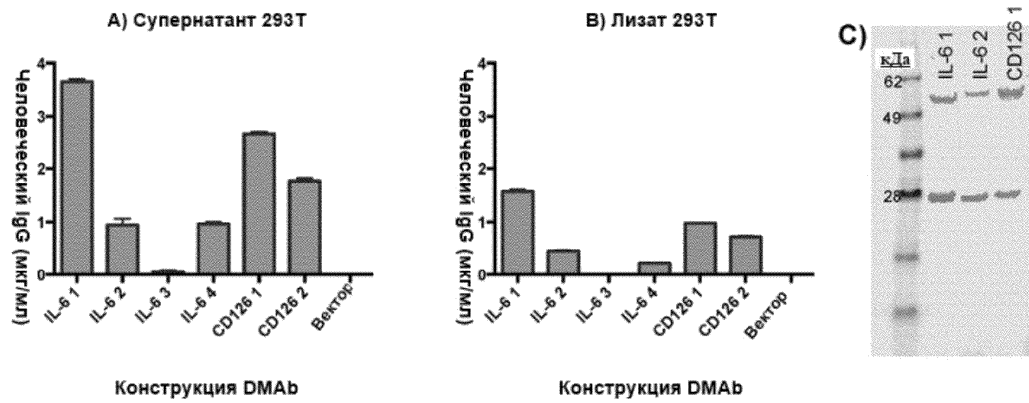
18. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой заболевание, связанное с высокой температурой тела.

19. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой реакцию "трансплантат против хозяина" (GVH).

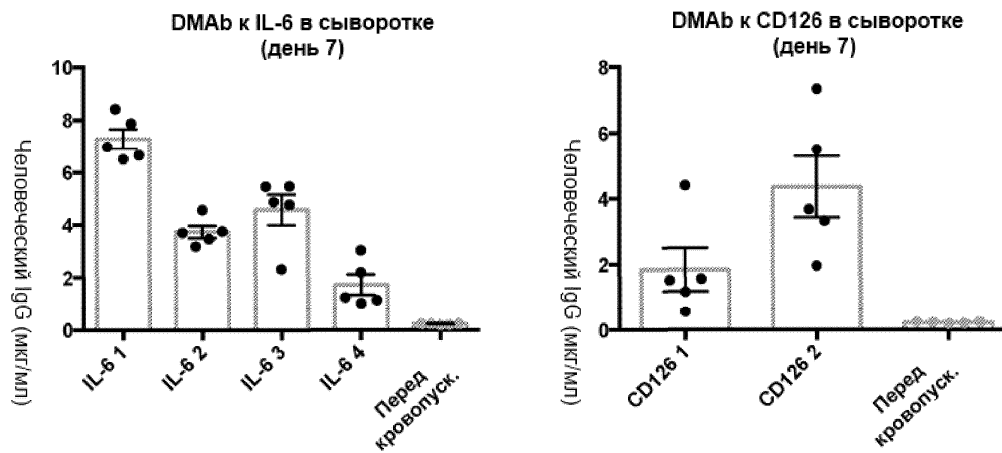
20. Способ по п.12, отличающийся тем, что заболевание представляет собой синдром клеточного лизиса.



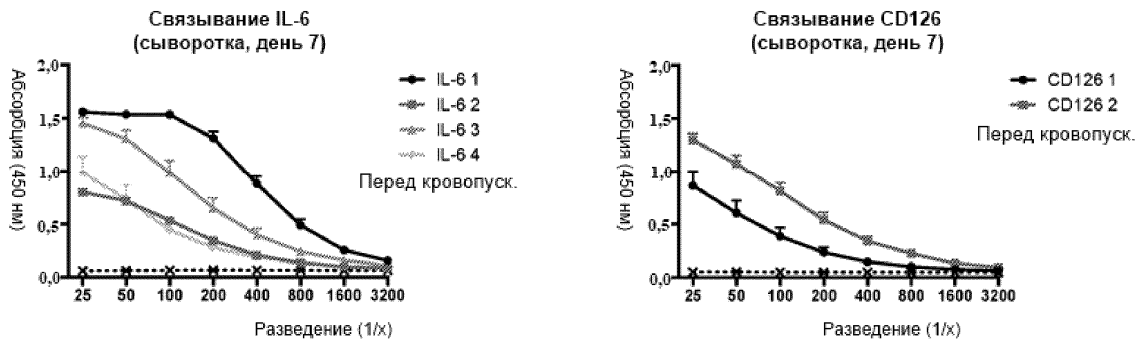
Фиг. 1



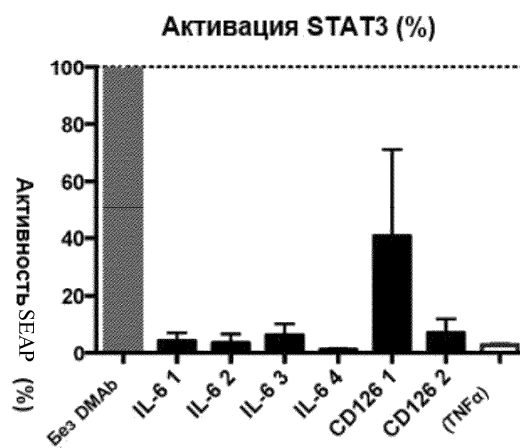
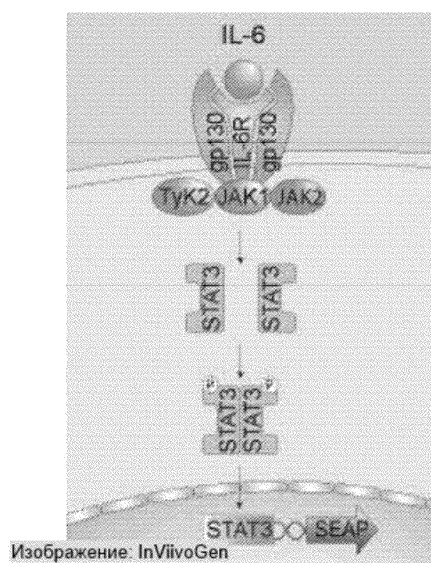
Фиг. 2



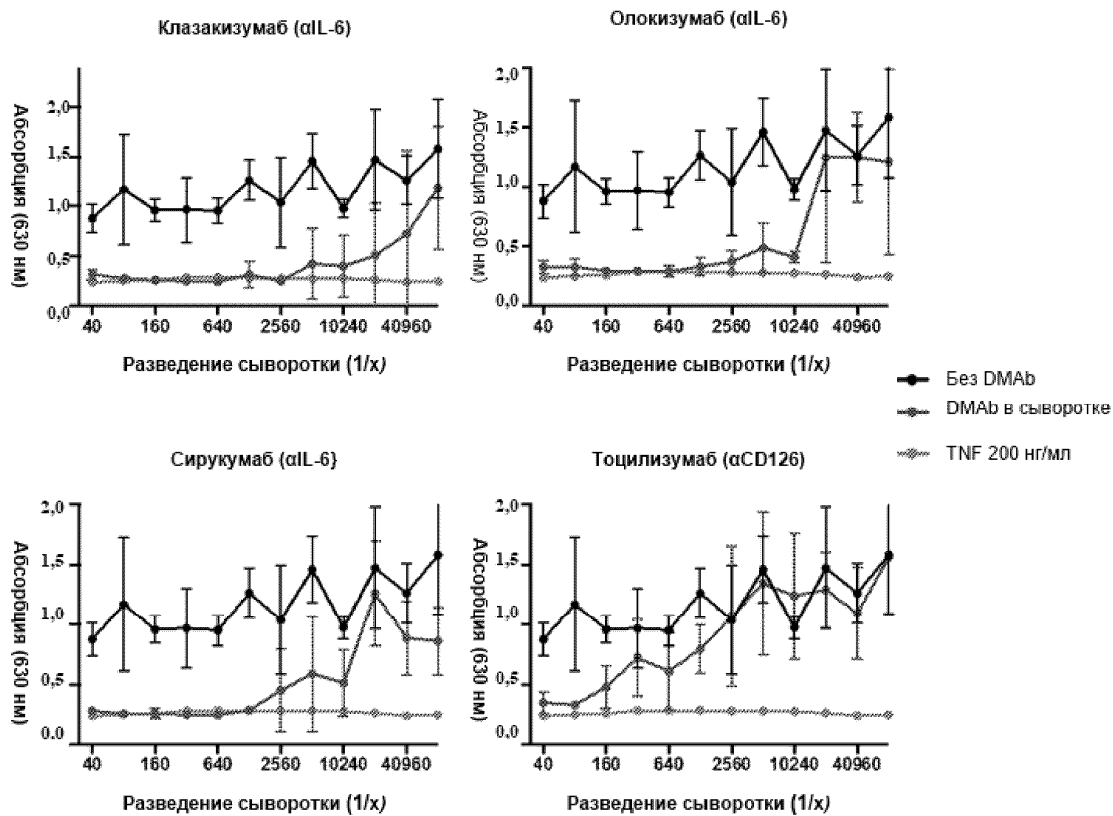
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2