

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042816**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.28

(21) Номер заявки
201591131

(22) Дата подачи заявки
2013.12.13

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) ДНК-КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛА И СПОСОБ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/737,094; 61/881,376; 61/896,646

(32) 2012.12.13; 2013.09.23; 2013.10.28

(33) US

(43) 2015.12.30

(86) PCT/US2013/075137

(87) WO 2014/093894 2014.06.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ; ИНОВИО
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Уэйнер Дэвид Б., Мутхумани
Карупиах, Сардесай Нирандзан,
Флинггай Селеке (US)**

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

(56) US-A1-20120282264
US-A1-20120269723
US-A1-20120232133

KIM et al. Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein complexes. Protein Sci. 2004, Vol. 13(6), p.1698-1703. Abstract; pg 1700, Fig 1; and pg 1701, Fig 3

ELLISON et al..The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C.gamma.1 gene. Nucleic Acids Res. 1982, Vol. 10(13), p. 4071-4079. Abstract NCHU Administrator, Microsoft PowerPoint - week 3 Antibody structure Ag-Ab interactions, NCHU, Power Point, 2007 [online]. [Retrieved on 2014.02.12]. Retrieved from the Internet: <URL:

<http://www.as.nchu.edu.tw/lab/5c/course/antibody/week%203%20Antibody%20structure%20Ag-Ab%20interactions.pdf>> pg 1-44, pg 6, Antibody structure by modern techniques

FANG et al. An antibody delivery system for regulated expression of therapeutic levels of monoclonal antibodies in vivo. Mol Ther. 2007, Vol. 15(6), p. 1153-9. Entire documentation, especially Abstract.

(57) В настоящем изобретении раскрыты композиции, содержащие оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитела и их функциональные фрагменты, для экспрессии синтетических антител in vivo и способы выработки синтетических антител у субъекта. В настоящем раскрытии также предложены способы предотвращения и/или лечения заболевания у субъекта с использованием указанных композиций и способов.

B1

042816

**042816
B1**

Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/737094, поданной 13 декабря 2012 года, предварительной заявке на патент США № 61/881376, поданной 23 сентября 2013 года, и предварительной заявке на патент США № 61/896646, поданной 28 октября 2013 года, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Декларация правительственного интереса

Настоящее изобретение было выполнено при правительственной поддержке по гранту с номерами контрактов NNSN272200800063С и 5-P30-AI-045008-13, присужденному Национальными институтами здравоохранения. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Область техники

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, для выработки синтетического антитела или его фрагментов *in vivo* и способу предотвращения и/или лечения заболевания у субъекта путем введения указанной композиции.

Уровень техники

Молекула иммуноглобулина содержит две цепи каждого типа: легкую (L) и тяжелую (H) цепь, которые ковалентно связаны дисульфидными связями (показаны в виде S-S) между остатками цистеина. Варибельные домены тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) участвуют в образовании сайта связывания молекулы антитела. Константная область тяжелой цепи состоит из трех константных доменов (CH1, CH2 и CH3) и (гибкой) шарнирной области. Легкая цепь также содержит константный домен (CL). Варибельные области тяжелой и легкой цепей содержат четыре каркасные области (FR; FR1, FR2, FR3 и FR4) и три области, определяющие комплементарность (CDR; CDR1, CDR2 и CDR3).

Соответственно, они представляют собой очень сложные генетические системы, которые очень трудно поддаются сборке *in vivo*.

Моноклональные антитела для направленного воздействия (mAb) представляют собой одно из важнейших медицинских терапевтических достижений за последние 25 лет. Этот тип иммунотерапии в настоящее время широко применяется против множества аутоиммунных заболеваний для лечения рака, а также инфекционных заболеваний. В случае злокачественных новообразований многие виды применяемой в настоящее время терапии иммуноглобулинами (Ig) комбинируют с режимами цитотоксической химиотерапии, направленными против злокачественных опухолей. Этот комбинированный подход значительно улучшил общую выживаемость. Для многих препаратов mAb имеется лицензия для использования против специфических видов рака, включая ритуксан (Ритуксимаб), химерное mAb, направленное против CD20, для лечения неходжкинских лимфом и Ипилимумаб (Ервой), человеческое mAb, которое блокирует CTLA-4 и которое применяли для лечения меланомы и других злокачественных новообразований. В дополнение к этому, Бевацизумаб (Авастин) представляет собой другое известное гуманизированное mAb, которое направлено на подавление VEGF и неоваскуляризации злокачественной опухоли, и использовалось для лечения колоректального рака. Возможно, наиболее известным mAb для лечения злокачественного новообразования является Трастузумаб (Герцептин), препарат гуманизированного антитела, направленного на подавление Her2/neu, который, как было продемонстрировано, обладает значительной эффективностью против рака молочной железы в субпопуляции пациентов. Кроме того, множество mAb применяются для лечения аутоиммунных и специфических заболеваний крови.

В дополнение к противоопухолевой терапии пассивный перенос поликлональных Ig опосредует защитный эффект против целого ряда инфекционных заболеваний, включая дифтерию, гепатит А и В, гидрофобию, столбняк, ветряную оспу и респираторно-синцитиальный вирус (RSV). Фактически несколько препаратов поликлональных Ig обеспечивают временную защиту против специфических возбудителей инфекции у индивидуумов, путешествующих в области распространения эндемических заболеваний, в случаях, когда имеется нехватка времени для выработки защитных Ig через активную вакцинацию. Кроме того, у детей с иммунодефицитом Паливизумаб (Синагис), mAb, которое направлено подавляет инфекцию RSV, обладает доказанной клинической эффективностью против RSV.

Клиническое значение терапии mAb производит глубокое впечатление. Однако остаются проблемы, которые ограничивают использование и распространение этого терапевтического подхода. Некоторые из них включают высокие затраты на производство этих сложных биологических препаратов, которые могут ограничивать их использование для лечения более обширной популяции, особенно в развивающихся странах, в которых они могут иметь большое значение. Кроме того, частая потребность в повторных введениях mAb для достижения и поддержания эффективности может послужить препятствием в отношении логистики и соблюдения большим режимом лечения. В дополнение к этому, долгосрочная стабильность этих препаратов антител часто является непродолжительной и ниже оптимальной. Таким образом, в настоящем уровне техники остается необходимость в получении синтетического антитела, доставка которого в организм субъекта была бы безопасной и недорогой. Кроме того, обсуждалась идентификация синтетических антител и способы экспрессии; однако производство белка все еще является проблематичным и дорогостоящим.

Иммунотерапия и иммуномодуляция представляют собой методы лечения, которые обеспечивают лечение заболевания путем оказания воздействия или модуляции, или стимуляции иммунной системы

субъекта для борьбы с патогеном или уничтожения пораженных клеток. Вакцины представляют собой один из классов лекарственных веществ, которые могут стимулировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ для профилактики и в некоторых случаях терапии заболевания. Например, вакцина от гриппа может способствовать формированию иммунологической памяти, обеспечивающей вторичный иммунный ответ на вирус гриппа у субъекта и способствовать предотвращению будущих инфекций. Однако существующая проблема заключается в патогенах, таких как, например, тропический вирус, как чикунгунья или денге, или эбола, которые запускают быстрый патогенез, при котором антитело, обладающее высокой нейтрализующей активностью, оказывало бы положительное действие. В таких ситуациях, если у субъекта отсутствует установившаяся и эффективная иммунологическая память, обеспечивающая вторичный иммунный ответ, тогда задержка в гуморальном ответе субъекта может привести к гибели. Более того, немедленная выработка нейтрализующего антитела помогает предотвратить инфицирование трудно поддающимся лечению вирусом, таким как ВИЧ, до полного инфицирования и распространения в организме хозяина. Существует потребность в вакцине, которая могла бы обеспечить немедленную выработку вторичного иммунного ответа, или более предпочтительно ответа с вовлечением нейтрализующих антител; который затем можно совмещать с вакциной, которая при необходимости будет стимулировать выработку иммунного ответа хозяина на комбинированную терапию.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способу выработки синтетического антитела у субъекта. Способ может включать введение субъекту композиции, содержащей последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты можно экспрессировать у субъекта для выработки синтетического антитела.

Антитело может включать полипептид тяжелой цепи или его фрагмент и полипептид легкой цепи или его фрагмент. Полипептид тяжелой цепи или его фрагмент может кодироваться первой последовательностью нуклеиновой кислоты и полипептид легкой цепи или его фрагмент может кодироваться второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать первую последовательность нуклеиновой кислоты и вторую последовательность нуклеиновой кислоты. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать промотор для экспрессии у субъекта первой последовательности нуклеиновой кислоты и второй последовательности нуклеиновой кислоты в виде одного транскрипта. Промотор может представлять собой промотор цитомегаловируса (ЦМВ).

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления протеазой. Третья последовательность нуклеиновой кислоты может быть локализована между первой последовательностью нуклеиновой кислоты и второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Протеаза субъекта может распознавать и расщеплять сайт расщепления протеазой.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты можно экспрессировать в организме субъекта для получения полипептидной последовательности антитела. Полипептидная последовательность антитела может содержать полипептид тяжелой цепи или его фрагмент, сайт расщепления протеазой и полипептид легкой цепи или его фрагмент. Протеаза, продуцируемая у субъекта, может распознавать и расщеплять сайт расщепления протеазой полипептидной последовательности антитела, вследствие этого обеспечивая образование отщепленного полипептида тяжелой цепи и отщепленного полипептида легкой цепи. Синтетическое антитело может образоваться из отщепленного полипептида тяжелой цепи и отщепленного полипептида легкой цепи.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать первый промотор для экспрессии первой последовательности нуклеиновой кислоты в виде первого транскрипта и второй промотор для экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в виде второго транскрипта. При трансляции первого транскрипта может образоваться первый полипептид и при трансляции второго транскрипта может образоваться второй полипептид. Синтетическое антитело может образоваться из первого и второго полипептида. Первый промотор и второй промотор могут быть одинаковыми. Промотор может представлять собой промотор цитомегаловируса (ЦМВ).

Полипептид тяжелой цепи может содержать переменную область тяжелой цепи и константную область 1 тяжелой цепи. Полипептид тяжелой цепи может содержать переменную область тяжелой цепи, константную область 1 тяжелой цепи, шарнирную область, константную область 2 тяжелой цепи и константную область 3 тяжелой цепи. Полипептид легкой цепи может содержать переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность Козак. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать сигнальный пептид иммуноглобулина (Ig). Сигнальный пептид Ig может содержать сигнальный пептид IgE или IgG.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 5, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59 и 61. Последовательность рекомбинантной нук-

леиновой кислоты может содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 40, 42, 44, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62 и 63.

Настоящее изобретение также относится к способу выработки синтетического антитела у субъекта. Способ может включать введение субъекту композиции, содержащей первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи или его фрагмент, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи или его фрагмент. Первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты можно экспрессировать у субъекта для выработки первого полипептида и вторую рекомбинантную нуклеиновую кислоту можно экспрессировать у субъекта для выработки второго полипептида. Синтетическое антитело может образоваться из первого и второго полипептидов.

Первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать первый промотор для экспрессии первого полипептида у субъекта. Вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать второй промотор для экспрессии второго полипептида у субъекта. Первый промотор и второй промотор могут быть одинаковыми. Промотор может представлять собой промотор цитомегаловируса (ЦМВ).

Полипептид тяжелой цепи может содержать вариабельную область тяжелой цепи и константную область 1 тяжелой цепи. Полипептид легкой цепи может содержать вариабельную область легкой цепи, константную область 1 легкой цепи, шарнирную область, константную область 2 легкой цепи и константную область 3 легкой цепи. Полипептид легкой цепи может содержать вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи.

Первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты и вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать последовательность Козак. Первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты и вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать сигнальный пептид иммуноглобулина (Ig). Сигнальный пептид Ig может содержать сигнальный пептид IgE или IgG.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу предотвращения или лечения заболевания у субъекта. Способ может включать выработку синтетического антитела у субъекта по одному из вышеприведенных способов. Синтетическое антитело может быть специфическим по отношению к чужеродному антигену. Чужеродный антиген может быть получен из вируса. Вирус может представлять собой вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус чикунгунья (ЧИКВ) или вирус денге.

Вирус может представлять собой ВИЧ. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 5, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55 и 57. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 3, 4, 6, 7, 50, 52, 55, 56, 62 и 63.

Вирус может представлять собой ЧИКВ. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 и 61. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 58 и 60.

Вирус может представлять собой вирус денге. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 44.

Синтетическое антитело может быть специфическим по отношению к аутоантигену. Аутоантиген может представлять собой Her2. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и 43. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 40 и 42.

Один аспект настоящего изобретения, описанного в настоящем документе, включает нуклеотидные продукты, описанные в настоящем документе, которые в некоторых случаях состоят из одной нуклеотидной конструкции и в некоторых случаях состоят из двух отдельных нуклеотидных конструкций.

Один аспект настоящего изобретения относится к способам лечения от инфекции, вызванной патогеном, включающим введение нуклеотидной последовательности, кодирующей синтетическое антитело, специфическое по отношению к патогену, и в некоторых случаях также введение антигена патогена для выработки иммунного ответа у субъекта.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь IgG, как описано в примере 1.

На фиг. 2 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь IgG, как описано в примере 1.

На фиг. 3 проиллюстрирован график зависимости ОП при 450 нм от времени (часы) (разведение су-

пернатанта тканевой культуры 1:100).

На фиг. 4 проиллюстрировано изображение геля после Вестерн-блота.

На фиг. 5 проиллюстрировано создание и подтверждение экспрессирующего вектора рHIV-1 Env-Fab. (А и В) Карту кольцевой плазмиды рHIV-1 Env Fab для конструкции, экспрессирующей Fab, специфичный к gp120, составляли с использованием генов тяжелой (H) и легкой (L) переменных цепей Ig VRC01. Для повышения уровня экспрессии при конструировании Fab-плазмид в их состав было включено несколько модификаций. Гены Fab-фрагментов VL и VH, как проиллюстрировано, клонировали раздельно между сайтами рестрикции BamHI и XhoI вектора pVax1. (С) Экспрессия рHIV-1 Env Fab *in vitro*. На графике представлена временная кинетика экспрессии рHIV-1 Env Fab после трансфекции клеток 293Т. Указанные значения, свидетельствующие об экспрессии, представляют собой ОП при 450 нм \pm SD для лунок в трех поверхностях. В качестве контроля клетки 293Т также были трансфицированы остовом pVax1.

На фиг. 6 проиллюстрировано измерение временной зависимости образования Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ, с помощью рHIV-1 Env Fab. (А) Динамика образования Fab, специфичного к ВИЧ-1. После введения рHIV-1 Env Fab в сыворотках крови с конечным разведением 1:100 измеряли уровень образования специфического Fab на протяжении 10 дней с помощью ИФА и представляли в виде ОП при 450 нм. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки мышей, которым вводили pVax1. (В) Сравнительное измерение уровней образования антител к gp120 после иммунизации с помощью рекомбинантного gp120 (rgp120). Как описано в примере 2, мышам иммунизировали с применением однократной инъекции rgp120 с последующим измерением уровня образования антител к gp120 до 10 суток и представляли в виде значений ОП при 450 нм. В данном исследовании в качестве отрицательного контроля использовали инъекцию ФСБ. (С) Подтверждение связывания Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, посредством иммуноблот-анализа. Как указано в примере, SDS-PAGE проводили с применением либо 5, либо 10 мкг gp120 и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с последующей инкубацией блотов с сыворотками, полученными от мышей, которым вводили рHIV-1 Env Fab. Иммуноблот свидетельствовал о том, что экспериментальные сыворотки распознали связавшийся rgp120, подтверждая специфичность образовавшегося Fab. (D) Количественная оценка динамики образования Fab IgG1 человека, измеренного как IgG1 в сыворотках крови мышей после введения рHIV-1 Env-Fab. Уровень IgG1 измеряли с помощью стандартного набора для ИФА через указанные интервалы времени и выражали в виде Fab (мкг/мл) \pm SD. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки мышей, которым вводили pVax1. Образцы сыворотки анализировали через интервалы времени, указанные по оси x. Стрелка, проиллюстрированная на графиках (А), (В) и (D), указывает на момент введения плазмидной ДНК.

На фиг. 7 проиллюстрирован анализ связывания Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, с гликопротеином оболочки ВИЧ клады А с помощью FACS. (А) Сканограммы FACS, свидетельствующие о связывании Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 с гликопротеином оболочки ВИЧ клады А. ДНК, экспрессирующую либо консенсусную (pCon-Env-A), либо "оптимизированную" (pOpt-Env-A) последовательность белка оболочки ВИЧ-1 клады А, трансфицировали в клетки 293Т. Через два дня после трансфекции клетки окрашивали либо с помощью очищенного естественного VRC01 Ig, образовавшегося в сыворотках вследствие трансфекции рHTV-1 Env Fab (забор крови осуществляли через 48 часов после введения плазмиды), либо контрольного Ig, образовавшегося вследствие введения rIgG-E1M2. Сыворотки и антитело VRC01 разводили 1:4 или 1:100, соответственно, в 50 мкл ФСБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем клетки окрашивали с помощью соответствующих вторичных Ig, конъюгированных с фикоэритрином (ФЭ), подвергали гейтингу для FACS-анализа как синглеты и живые клетки. Процент связывания для положительно окрашенных клеток приведен на каждой из сканограмм. (В) Графическое представление данных по связыванию, полученных с помощью FACS. Количество окрашенных клеток (т.е. свидетельствующее об уровнях экспрессии) в каждой из исследованных групп Ig/сыворотка делили на значения фонового окрашивания и представляли в виде процента специфичности связывания по оси y в зависимости от разных исследованных препаратов белка оболочки ВИЧ клады А.

На фиг. 8 проиллюстрирована динамика нейтрализации ВИЧ-1 сыворотками крови мышей, которым вводили рHTV-1 Env-Fab. Сыворотки крови, использованные для анализа нейтрализации, получали через интервалы времени, указанные на графиках. Анализ нейтрализации проводили на клетках TZM-BL с применением панели псевдотипированных ВИЧ-1: Ba126 (Панель А; клада В, Tier 1), Q23Env17 (Панель В; клада А, Tier 1), SF162S (Панель С; клада В, Tier 1) и ZM53M (Панель D; клада С, Tier 2). Клетки инфицировали при MOI 0,01, как определено в примере 2, и инкубировали в присутствии сывороток (конечное разведение 1:50), содержащих Fab, образовавшийся вследствие введения рHIV-1 Env Fab. Проиллюстрированы значения процента нейтрализации, расчет которых был описан в примере 2. Кроме того, на каждом из графиков представлены горизонтальные линии, обозначающие аппроксимируемые интервалы времени, через которые экспериментальные сыворотки крови опосредовали 50% нейтрализацию вирусом.

На фиг. 9 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, который описан в примерах 2-7.

На фиг. 10 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, который описан в примерах 2-7.

На фиг. 11 проиллюстрирована иммунофлуоресценция клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей белок оболочки ВИЧ. Клетки окрашивали с помощью препаратов изр Vax1 (левая панель) или pHIV-Env-Fab (правая панель).

На фиг. 12 проиллюстрирован график зависимости концентрации в сыворотке крови (нг/мл) от типа антигена.

На фиг. 13 проиллюстрирована схема конструкции, кодирующей синтетическое антитело IgG1 человека.

На фиг. 14 проиллюстрирована схема собранного антитела (при экспрессии), которое кодируется конструкцией из фиг. 13.

На фиг. 15 проиллюстрирована аминокислотная последовательность IgG VRC01.

На фиг. 16 проиллюстрированы (А) схема конструкции, кодирующей Ig PG9, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1; (В) схема вектора, содержащего конструкцию (А); и (С) изображение окрашенного геля.

На фиг. 17 проиллюстрированы (А) схема конструкции, кодирующей Ig 4E10, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1; (В) схема вектора, содержащего конструкцию (А); и (С) изображение окрашенного геля.

На фиг. 18 проиллюстрирована аминокислотная последовательность Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, до расщепления фурином.

На фиг. 19 проиллюстрирована аминокислотная последовательность Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, до расщепления фурином.

На фиг. 20 проиллюстрированы (А) схема конструкции, кодирующей тяжелую (VH-CH1) цепь Fab, специфичного к белку оболочки СИКВ; и (В) схема конструкции, кодирующей тяжелую (VL-CL) цепь Fab, специфичного к белку оболочки СИКВ.

На фиг. 21 проиллюстрирована схема экспрессирующего вектора, содержащего конструкцию, кодирующую тяжелую (VH-CH1) или легкую (VL-CL) цепь Fab, специфичного к белку оболочки СИКВ.

На фиг. 22 проиллюстрирован график зависимости ОП при 450 нм от времени (ч).

На фиг. 23 проиллюстрировано изображение иммуноблота.

На фиг. 24 проиллюстрирована схема введения ДНК и получения.

На фиг. 25 проиллюстрирован график зависимости ОП при 450 нм от времени в сутках.

На фиг. 26 проиллюстрирован график зависимости выживаемости в процентах от времени в сутках после инфицирования.

На фиг. 27 проиллюстрирован график зависимости концентрации ФНО- α в пг/мл от группы мышей.

На фиг. 28 проиллюстрирован график зависимости концентрации ИЛ-6 в пг/мл от группы мышей.

На фиг. 29 показана схема, иллюстрирующая конструкцию, кодирующую VH-CH1, и под контролем промотора.

На фиг. 30 показана схема, иллюстрирующая конструкцию, кодирующую VL-CL, и под контролем промотора.

На фиг. 31 показана схема, иллюстрирующая конструкцию, кодирующую VH-CH1 или VL-CL Fab, специфичного к Нег-2, клонированного в экспрессирующий вектор.

На фиг. 32 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая VH-CH1 Fab, специфичного к Нег-2.

На фиг. 33 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 32 (т.е. аминокислотная последовательность VH-CH1 Fab, специфичного к Нег-2).

На фиг. 34 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая VL-CL Fab, специфичного к Нег-2.

На фиг. 35 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 34 (т.е. аминокислотная последовательность VL-CL Fab, специфичного к Нег-2).

На фиг. 36 проиллюстрирован график зависимости концентрации IgG (мкг/мл) от типа трансфицированной клетки.

На фиг. 37 показана схема, иллюстрирующая конструкцию, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), константную область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирную область, константную область 2 (CH2) тяжелой цепи, константную область 3 (CH3) тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG), и кодирующую переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL) IgG. Тяжелая и легкая цепи IgG разделены сайтом расщепления протеазой и перед каждой из них находится сигнальный пептид (кодируемый лидерной последовательностью).

На фиг. 38 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IgG человека, специфичный к вирусу денге (DENV).

На фиг. 39 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательно-

стью нуклеиновой кислоты из фиг. 39 (т.е. аминокислотная последовательность IgG человека, специфичного к DENV). В этой аминокислотной последовательности еще не произошло расщепление протеазой для разделения тяжелой и легкой цепей на два отдельных полипептида.

На фиг. 40 проиллюстрирован график зависимости ОП при 450 нм от группы мышей.

На фиг. 41 проиллюстрирован график зависимости концентрации (нг/мл) человеческого IgG от времени в сутках после инъекции.

На фиг. 42 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 1 (т.е. SEQ ID NO: 6). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG, описанной ниже в примере 1.

На фиг. 43 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 2 (т.е. SEQ ID NO: 7). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи IgG, описанной ниже в примере 1.

На фиг. 44 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 9 (т.е. SEQ ID NO: 3). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, который описан в примерах 2-7.

На фиг. 45 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 10 (т.е. Набор данных 22 элементов NO:4). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, который описан в примерах 2-7.

На фиг. 46 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая одноцепочечный Fab (scFab) PG9 ВИЧ-1, описанный ниже в примере 11.

На фиг. 47 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 46 (т.е. Набор данных 22 элементов NO: 50). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность scFab PG9 ВИЧ-1, описанного ниже в примере 11.

На фиг. 48 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая одноцепочечный Fab (scFab) 4E10 ВИЧ-1, описанный ниже в примере 13.

На фиг. 49 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 48 (т.е. Набор данных 22 элементов NO: 52). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность scFab 4E10 ВИЧ-1, описанного ниже в примере 13.

На фиг. 50 показана схема, иллюстрирующая конструкцию, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи (VH), константную область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирную область, константную область 2 (CH2) тяжелой цепи, константную область 3 (CH3) тяжелой цепи иммуноглобулина G (IgG). Перед последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь IgG, находится лидерная последовательность.

На фиг. 51 показана схема, иллюстрирующая конструкцию, кодирующую вариабельную область (VL) легкой цепи и константную область (CL) легкой цепи IgG. Перед последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь IgG, находится лидерная последовательность.

На фиг. 52 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь IgG1 VRC01 ВИЧ-1, описанную ниже в примере 9.

На фиг. 53 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 52 (т.е. Набор данных 22 элементов NO: 54). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG1 VRC01 ВИЧ-1, описанной ниже в примере 9.

На фиг. 54 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь IgG VRC01 ВИЧ-1, описанную ниже в примере 9.

На фиг. 55 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 54 (т.е. Набор данных 22 элементов NO: 56). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи IgG VRC01 ВИЧ-1, описанной ниже в примере 9.

На фиг. 56 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки СНИKV, который описан ниже в примере 14.

На фиг. 57 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 56 (т.е. Набор данных 22 элементов NO: 58). Эта аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки СНИKV, который описан ниже в примере 14.

На фиг. 58 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки СНИKV, который описан ниже в примере 14.

На фиг. 59 проиллюстрирована аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты из фиг. 58 (т.е. Набор данных 22 элементов NO: 60). Эта аминокислотная по-

следовательность представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки СНКV, который описан ниже в примере 14.

На фиг. 60 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Ig, специфичный к белку оболочки 4E10 ВИЧ-1, описанный ниже в примере 12.

На фиг. 61 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Ig PG9, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, описанный ниже в примере 10.

На фиг. 62 проиллюстрирована последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IgG VRC01 (SEQ ID NO: 64).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Композицию можно вводить субъекту, который в этом нуждается, для облегчения экспрессии и образования *in vivo* синтетического антитела.

В частности, в результате экспрессии последовательностей рекомбинантной нуклеиновой кислоты может происходить сборка полипептидов тяжелой и легкой цепей с образованием синтетического антитела. Полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, так что в результате сборки образуется синтетическое антитело, способное связываться с антигеном, которое будет более иммуногенным по сравнению с антителом, не подвергающимся сборке, как описано в настоящем документе, и способное вызывать или индуцировать иммунный ответ против антигена.

В дополнение к этому, эти синтетические антитела в организме субъекта образуются быстрее, чем антитела, вырабатываемые в ответ на антиген, индуцирующий иммунный ответ. Синтетические антитела способны эффективно связываться и нейтрализовать ряд антигенов. Синтетические антитела также способны обеспечивать эффективную защиту от заболевания и/или способствовать выживаемости больного субъекта.

1. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В случае противоречий настоящий документ, включая определения, будем иметь преимущественную силу. Ниже описаны предпочтительные способы и материалы, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в данном документе, могут быть применены при практическом воплощении или тестировании настоящего изобретения. Все публикации, заявки на патент, патенты или другие ссылки, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Материалы, способы и примеры, описанные в настоящем документе, служат только для иллюстративных целей и не ограничивают объем правовой охраны настоящего изобретения.

Подразумевается, что термины "состоит(ят)," "включает(ют)," "имеющий," "имеет," "может," "содержит(ат)," и их варианты, используемые в настоящем документе, являются неограничивающими переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможности дополнительных действий или структур. Неопределенные артикли, обозначающие единственное число, включают формы множественного числа, если контекст явно не подразумевает иного. Настоящее изобретение предполагает также другие варианты реализации изобретения, "содержащие," "состоящие из" и "в основном состоящие из," вариантов реализации изобретения или элементов, представленных в данном документе, независимо от того, есть прямое указание на них или нет. "Антитело" может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или фрагменты, или их производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, и их производные. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки крови млекопитающего, поликлональное антитело, аффинноочищенное антитело или их смеси, проявляющие достаточную специфичность связывания с целевым эпитопом или или производной от него последовательностью.

Выражение "фрагмент антитела", что используется взаимозаменяемо в настоящем документе, относится к участку интактного антитела, содержащему антигенсвязывающий сайт или переменную область. Этот участок не включает константные домены тяжелой цепи (т.е. CH₂, CH₃ или CH₄, в зависимости от изотипа антитела) Fc-области интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают без ограничений Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fab'-SH-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, диатела, одноцепочечные Fv (scFv) молекулы, одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи, и одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменной области тяжелой цепи.

"Антиген" относится к белкам, которые обладают способностью вызывать иммунный ответ у хозяина. Антиген может узнаваться и связываться антителом. Антиген может иметь внутреннее или внешнее происхождение по отношению к организму. "Кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота", используемая в настоящем документе, может относиться к нуклеиновой кислоте

(молекуле РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, как описано ниже в настоящем документе. Кодирующая последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации трансляции, функционально связанные с регуляторными элементами, в том числе с промотором и сигналом полиаденилирования, способными контролировать экспрессию в клетках индивида или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту. Кодирующая последовательность может дополнительно включать последовательности, кодирующие сигнальные пептиды.

"Комплемент" или "комплементарный", как используется в данном документе, может означать сравнение оснований между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот по Уотсону-Крику (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстину.

"Постоянный ток" используется в настоящем документе для определения тока, который поступает или воздействует на ткань или клетки, входящие в состав указанной ткани, на протяжении подачи электрического импульса в эту же ткань. Электрический импульс поступает от устройств для электропорации, описанных в настоящем документе. Этот ток сохраняется с постоянной силой тока в амперах в указанной ткани на протяжении действия электрического импульса, поскольку устройство для электропорации, предложенное в настоящем документе, содержит элемент обратной связи, предпочтительно обеспечивающий мгновенную обратную связь. Элемент обратной связи может измерять сопротивление ткани (или клеток) во время прохождения импульса и изменять вывод электроэнергии устройством для электропорации (например, увеличение напряжение), так что ток в той же ткани сохраняется постоянным во время прохождения электрического импульса (порядок микросекунд) и от импульса к импульсу. В варианте реализации изобретения элемент обратной связи содержит контроллер.

"Обратная связь по току" или "обратная связь", используемые в настоящем документе, могут использоваться взаимозаменяемо и могут означать активный ответ предоставленных устройств для электропорации, который включает измерение тока в ткани между электродами и изменение вывода энергии, подаваемой ЕР-устройством, соответственно, для того, чтобы поддерживать ток на постоянном уровне. Этот постоянный уровень заранее задается пользователем до инициации последовательности импульсов или электропорации. Обратная связь может осуществляться компонентом для электропорации, например, контроллером устройства для электропорации, поскольку электрическая цепь в нем способна непрерывно контролировать ток в ткани между электродами и сравнивать контролируемый ток (или ток в пределах ткани) для задания тока и непрерывно осуществлять настройки вывода энергии для поддержания контролируемого тока на заданных уровнях. Петля обратной связи может быть мгновенной, поскольку она является аналогом замкнутой петли обратной связи.

Используемый в настоящем документе термин "децентрализованный ток" может означать паттерн электрических токов, поступаемых от разных матриц игольчатых электродов устройств для электропорации, описанных в настоящем документе, причем указанные паттерны минимизируют или предпочтительно предотвращают возникновение теплового стресса, связанного с электропорацией, в любой области ткани, которая подвергается электропорации.

Термины "электропорация", "электропермеабилитация" или "электрокинетическое усиление" ("ЕР"), используемые взаимозаменяемо в настоящем документе, могут обозначать использование трансмембранного электростатического импульса для индукции образования микроскопических путей (пор) в биомембране; их присутствие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, мРНК, лекарственные вещества, ионы и вода, перемещаться от одной стороны клеточной мембраны к другой.

Термин "эндогенное антитело", используемый в настоящем документе, может обозначать антитело, которое вырабатывается в организме субъекта, которому вводят эффективную дозу антигена для индукции гуморального иммунного ответа.

Термин "механизм обратной связи", используемый в настоящем документе, может обозначать процесс, осуществляемый либо программным обеспечением, либо аппаратным обеспечением (или встроенным программным обеспечением), причем в ходе данного процесса происходит прием и сравнение импеданса целевой ткани (до, во время и/или после подачи импульса энергии) с текущим значением, предпочтительно током, и регуляция импульса подаваемой энергии для достижения заданного значения. Обратная связь может осуществляться по аналогии с замкнутой петлей обратной связи.

"Фрагмент" может означать полипептидный фрагмент антитела, который обладает такими же функциями, т.е. может связываться с желаемой мишенью и предположительно обладает таким же действием, что и полноразмерное антитело. Фрагмент антитела может быть на 100% идентичным полноразмерному антителу за исключением по меньшей мере одной недостающей аминокислоты на N и/или C-конце, в каждом случае в присутствии или в отсутствие сигнальных пептидов и/или метионина в положении 1. Длина фрагментов может составлять 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более длины конкретного полноразмерного антитела, за исключением любого добавленного гетерологического сигнального пептида. Фрагмент может представлять собой фрагмент полипептида, ко-

торый на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичен антителу и дополнительно содержит N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывают 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 соединяться с фрагментом антитела.

Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, может быть на 100% идентичным полноразмерному антителу, за исключением по меньшей мере одного недостающего нуклеотида на 5'- и/или 3'-конце, в каждом случае в присутствии или в отсутствие последовательностей, кодирующих сигнальные пептиды и/или метионин в положении 1. Длина фрагментов может составлять 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более длины конкретной полноразмерной кодирующей последовательности, за исключением любого добавленного гетерологичного сигнального пептида. Фрагмент может представлять собой фрагмент, что кодирует полипептид, который на 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, или 99% или более идентичен антителу и дополнительно необязательно содержит последовательность, кодирующую N-концевой метионин или гетерологичный сигнальный пептид, который не учитывают при расчете процента идентичности. Фрагменты могут дополнительно содержать кодирующие последовательности для N-концевого метионина и/или сигнального пептида, такого как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, сигнальный пептид IgE или IgG. Последовательность, кодирующая N-концевой метионин и/или сигнальный пептид, может соединяться с фрагментом кодирующей последовательности.

Термин "генетическая конструкция", используемый в настоящем документе, обозначает молекулы ДНК или РНК, которые имеют нуклеотидную последовательность, что кодирует белок, такой как антитело. Кодирующая последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, обеспечивающий контроль экспрессии в клетках индивидуума, которому вводят нуклеиновую кислоту. Используемый в настоящем документе термин "экспрессируемая форма" обозначает генные конструкции, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с последовательностью, что кодирует белок, так что, находясь в клетке индивидуума, кодирующая последовательность будет экспрессирована.

Используемый в настоящем документе термин "идентичный" или "идентичность", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, может означать, что данные последовательности имеют определенный процент одинаковых остатков в определенной области. Этот процент можно рассчитать посредством оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательности в определенной области, определения количества положений, в которых встречаются идентичные остатки в обеих последовательностях для получения определенного количества совпавших положений, деления количества совпавших положений на общее количество в определенной области, и умножения результат на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В случаях, когда две последовательности имеют разную длину или в результате выравнивания получают один или более смещенных концов и определенная область охватывает только одну последовательность, остатки одной последовательности при расчете включают в знаменатель, а не числитель. При сопоставлении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил могут считаться эквивалентными. Сопоставление идентичности можно проводить вручную или путем применения компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Используемый в настоящем документе термин "импеданс" может быть использован при обсуждении механизма обратной связи и может быть преобразован в значение тока по закону Ома, следовательно, обеспечивая возможность сравнений с заранее заданным током.

Используемый в настоящем документе термин "иммунный ответ" может означать активацию иммунной системы хозяина, например, иммунной системы млекопитающего, в ответ на введение одного или более нуклеиновых кислот и/или пептидов. Иммунный ответ может возникать в форме клеточного или гуморального ответа, или обоих.

Используемый в настоящем документе термин "нуклеиновая кислота" или "олигонуклеотид", или "полинуклеотид" может означать по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанные друг с другом. Изображение одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Следовательно, нуклеиновая кислота также охватывает комплементарную цепь изображенной одной цепи. Многие варианты нуклеиновой кислоты могут быть использованы с той же целью, что и данная нуклеиновая кислота. Следовательно, нуклеиновая кислота также охватывает, по существу, идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные цепи. Одна цепь представляет собой зонд, который может гибридизоваться с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Следовательно, нуклеиновая кислота также охватывает зонд, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, или могут содержать участки как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибрид, причем 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 получить с помощью методов химического синтеза или рекомбинантной ДНК.

Используемый в настоящем документе термин "функционально связанный" может означать, что экспрессия гена происходит под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может располагаться 5' (выше) или 3' (ниже) гена, который находится под его контролем. Расстояние между промотором и геном может приблизительно быть таким же самым, что и расстояние между промотором и геном, который он контролирует, в гене, из которого был получен промотор. Как известно в данной области техники, это расстояние может изменяться без потери функции промотора.

Используемый в настоящем документе термин "пептид" или "полипептид" может означать цепную последовательность аминокислот, и он может быть природным, синтетическим или представлять собой модификацию или комбинацию природного и синтетического пептидов.

Используемый в настоящем документе термин "промотор" может означать синтетическую или природную молекулу, которая способна обеспечивать, усиливать или повышать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических последовательностей, обеспечивающих регуляцию транскрипции, для дополнительного повышения экспрессии и/или для изменения пространственного и/или временного контроля экспрессии. Промотор также может содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть локализованы на удалении нескольких тысяч пар оснований от стартового сайта транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включающих вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может обеспечивать конститутивную или дифференциальную регуляцию экспрессии генного компонента, что касается клетки, ткани или органа, в которых происходит экспрессия, или, что касается стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индукторы. Типичные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, промотор lac-оперона, tac-промотор, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

"Сигнальный пептид" или "лидерная последовательность" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают аминокислотную последовательность, которая может быть связана с аминным концом белка, описанного в настоящем документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности обычно управляют локализацией белка. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, использованные в настоящем документе, предпочтительно облегчают секрецию белка из клетки, в которой они образуются. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остальной части белка, часто называемого зрелым белком, при секреции из клетки. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности связаны на N-конце белка.

Используемый в настоящем документе термин "жесткие условия гибридизации" может означать условия, в которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) гибридизуется со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), как, например, в сложной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться при различных обстоятельствах. Можно выбрать жесткие условия с температурой на около 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе раствора, pH. T_m может представлять собой температуру (при определенной ионной силе раствора, pH и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуется с последовательностью-мишенью в состоянии равновесия (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке при T_m 50% зондов заняты в состоянии равновесия). Жесткие условия могут быть условиями, при которых концентрация соли составляет менее чем около 1,0 М ионов натрия, как, например, около 0,01-1,0 М ионов натрия (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3, и 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, около более 50 нуклеотидов). Жестких условий также можно достичь за счет добавления дестабилизирующих веществ, таких как формамид. В случае селективной или специфической гибридизации положительный сигнал может быть по меньшей мере в 2-10 раз выше фоновой гибридизации. Иллюстративные жесткие условия гибридизации включают следующее: 50% формамид, 5x SSC и 1% SDS, инкубация при 42°C или 5x SSC, 1% SDS инкубация при 65°C с отмывкой в 0,2x SSC и 0,1% SDS при 65°C.

Термин "субъект" или "пациент", используемый в настоящем документе взаимозаменяемо, относится к любому позвоночному животному, включая без ограничений млекопитающее (например, корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяки, морская свинка, кошка, собака, крыса и мышь, нечеловекообразный примат (например, обезьяна, как, например, яванский макак или макак-

резус, шимпанзе и т.д.) и человека). В некоторых вариантах реализации изобретения субъектом может быть человек или субъект, отличный от человека. Субъект или пациент может получать другие формы лечения.

Используемый в настоящем документе термин "по существу, комплементарный" 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 в области 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизуются в жестких условиях гибридизации.

Используемый в настоящем документе термин "по существу, идентичный" может означать, что первая и вторая 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% идентичны в области 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что касается нуклеиновых кислот, если первая последовательность является, по существу, комплементарной цепи второй последовательности.

Используемый в настоящем документе термин "синтетическое антитело" относится к антителу, которое кодируется последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, и вырабатывается в организме субъекта.

Используемый в настоящем документе термин "лечение" или "проведение лечения" может означать защиту субъекта от заболевания посредством предотвращения, сдерживания, подавления или полного устранения заболевания. Предотвращение заболевания включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту до начала заболевания. Сдерживание заболевания включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту после индукции заболевания, но до появления клинических признаков. Подавление заболевания включает введение вакцины по настоящему изобретению субъекту после появления клинических признаков заболевания.

Используемый в настоящем документе термин "вариант" в отношении нуклеиновой кислоты, может означать (i) участок или фрагмент эталонной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную цепь эталонной нуклеотидной последовательности или ее участок; (iii) нуклеиновую кислоту, которая является, по существу, идентичной эталонной нуклеиновой кислоте, или ее комплементарную цепь; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с эталонной нуклеиновой кислотой, ее комплементарную цепь или последовательности, которые, по существу, ей идентичны.

"Вариант" в отношении пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности по инсерции, делеции или консервативном замещении аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая является, по существу, идентичной аминокислотной последовательности эталонного белка, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. В данной области техники признано, что консервативное замещение аминокислоты, т.е. замена аминокислоты на другую аминокислоту с похожими свойствами (например, гидрофильность, степень и распределение заряженных областей), обычно включает в себя незначительное изменение. Эти незначительные изменения частично могут быть определены с учетом индекса гидрофобности аминокислот, как подразумевается в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Индекс гидрофобности аминокислоты основан на учете ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с похожими индексами гидрофобности, могут быть замещены, и при этом функция белка все еще будет сохраняться. В одном аспекте замещены аминокислоты, имеющие индексы гидрофобности ± 2 . Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замещений, которые могли бы приводить к образованию белков, сохраняющих биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в случае пептида позволяет рассчитать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезный показатель, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки. Замещение аминокислот, имеющих похожие значения гидрофильности, может привести к образованию пептидов, сохраняющих биологическую активность, например, иммуногенность, как подразумевается в данной области техники. Замещения могут осуществляться с использованием аминокислот, имеющих значения гидрофильности в пределах ± 2 по отношению друг к другу. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот, влияет конкретная боковая цепь этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением подразумевается, что аминокислотные замещения, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и особенно боковых цепей этих аминокислот, которое проявляется в виде гидрофобности, гидрофильности, заряда и других свойств.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по существу, идентична по всей длине полной последовательности гена или ее фрагменту. 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 по всей длине полной последовательности гена или ее фрагменту. Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по существу, идентична по всей длине полной последовательности гена или ее фрагменту. 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 по всей длине полной аминокислотной последовательности или ее фрагменту.

Используемый в настоящем документе термин "вектор" может означать последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой плазмиду, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или искусственную хромосому дрожжей. Вектор может представлять ДНК-или РНК-вектор. Вектор может представлять собой либо самореплицирующийся экстрахромосомный вектор, либо вектор, который интегрируется в геном клетки-хозяина.

Для приведения численных диапазонов в настоящем документе в явной форме с одинаковой степенью точности предполагается каждое промежуточное число, входящее в диапазон. Например, в случае диапазона 6-9 помимо 6 и 9 предполагаются числа 7 и 8, и в случае диапазона 6,0-7,0 в явной форме предполагается число 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

2. Композиция

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. При введении композиции субъекту, который в этом нуждается, в организме субъекта может вырабатываться синтетическое антитело. Синтетическое антитело может связываться с молекулой-мишенью (т.е. антигеном), присутствующей в организме субъекта. Такое связывание может нейтрализовать антиген, блокировать распознавание антигена другой молекулой, например, белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на антиген.

Синтетическое антитело может служить для лечения, предотвращения и/или защиты субъекта, которому вводят композицию, от заболевания. Синтетическое антитело, обеспечивающее связывание антигена, может служить для лечения, предотвращения и/или защиты субъекта, которому вводят композицию, от заболевания. Синтетическое антитело может способствовать выживаемости больного субъекта, которому вводят композицию. Синтетическое антитело может обеспечивать по меньшей мере на около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% выживаемость больного субъекта, которому вводят композицию. В других вариантах реализации изобретения 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% выживаемость больного субъекта, которому вводят композицию.

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

Введение композиции субъекту, который в этом нуждается, может приводить к более быстрой выработке синтетического антитела в организме субъекта, чем выработка эндогенного антитела в организме субъекта, которому вводят антиген для индукции гуморального иммунного ответа. Композиция может приводить к выработке синтетического антитела по меньшей мере в течение около 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток или 10 суток до выработки эндогенного антитела в организме субъекта, которому вводят антиген для индукции гуморального иммунного ответа.

Композиция по настоящему изобретению может обладать свойствами, требуемыми для эффективных композиций, такими как безопасность, так, чтобы композиция не приводила к болезни или смерти; защита от болезни; легкость введения, отсутствие побочных эффектов, биологическая стабильность и низкая стоимость на дозу.

3. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты

Как описано выше, композиция может содержать последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело описано ниже более подробно.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты. Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты

или одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может представлять собой оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты. Такая оптимизация может увеличивать или изменять иммуногенность антитела. Оптимизация также может улучшать транскрипцию и/или трансляцию. Оптимизация может включать одну или более из следующих: лидерную последовательность с низким содержанием GC для увеличения транскрипции; стабильность и оптимизацию кодонов; присоединение последовательности Козак (например, GCC ACC) для увеличения трансляции; присоединение лидерной последовательности иммуноглобулина (Ig), кодирующей сигнальный пептид; и удаление до возможной степени мотивов *cis*-действующей последовательности (т.е. внутренние ТАТА-боксы).

а) Конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать одну или более конструкций последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать один или более компонентов, которые описаны ниже более подробно.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид тяжелой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует сайт расщепления протеазой или пептидазой. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать одну или более лидерных последовательностей, причем каждая лидерная последовательность кодирует сигнальный пептид. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать 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. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать одну или более линкерных или тег-последовательностей. Тег-последовательность может кодировать тег гемоглобулина (HA).

(1) Полипептид тяжелой цепи.

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

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

Полипептид тяжелой цепи может включать ряд областей определяющих комплементарность ("CDR"). Ряд CDR может содержать три гипервариабельные области VH-области. Начиная с N-конца полипептида тяжелой цепи, эти CDR обозначены "CDR1", "CDR2" и "CDR3", соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида тяжелой цепи могут способствовать связыванию или распознаванию антигена.

(2) Полипептид легкой цепи.

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

Полипептид легкой цепи может включать ряд областей определяющих комплементарность ("CDR"). Ряд CDR может содержать три гипервариабельные области VL-области. Начиная с N-конца полипептида легкой цепи, эти CDR обозначены "CDR1", "CDR2" и "CDR3", соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида легкой цепи могут способствовать связыванию или распознаванию антигена.

(3) Сайт расщепления протеазой.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления протеазой. Сайт расщепления протеазой может распознаваться протеазой или пептидазой. Протеаза может представлять собой эндопептидазу или эндопротеазу, например, без ограничений фурин, эластаза, HtrA, кальпаин, трипсин, химотрипсин, трипсин и пепсин. Протеаза может представлять собой фурин. В других вариантах реализации изобретения протеаза может представлять собой сериновую протеазу, треониновую протеазу, цистеиновую протеазу, аспарагиновую протеазу, металлопротеазу, протеазу глутаминовой кислоты или любую протеазу, которая расщепляет внутреннюю пептидную связь (т.е. не расщепляет N-концевую или C-концевую пептидную связь).

Сайт расщепления протеазой может включать одну или более аминокислотных последовательностей, которые способствуют или увеличивают эффективность расщепления. Одна или более аминокислотных последовательностей могут способствовать или увеличивать эффективность образования или выработки отдельных полипептидов. Одна или более аминокислотных последовательностей могут включать последовательность 2А-пептида.

(4) Линкерная последовательность.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать одну или более линкерных последовательностей. Линкерная последовательность может пространственно разделять или соединять один или более компонентов, описанных в настоящем документе. В других вариантах реализации изобретения линкерная последовательность может кодировать аминокислотную последовательность, которая пространственно разделяет или соединяет два или более полипептидов.

(5) Промотор.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать один или более промоторов. Один или более промоторов могут представлять собой любой промотор, который способен запускать экспрессию генов и регулировать экспрессию генов. Такой промотор представляет собой элемент *cis*-действующей последовательности, необходимый для транскрипции с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Выбор применяемого промотора для управления экспрессией генов зависит от конкретного применения. Промотор может располагаться приблизительно на том же расстоянии от сайта инициации транскрипции в последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, что и от сайта инициации транскрипции в естественных условиях. Однако расстояние может изменяться без потери функции промотора.

Промотор может быть функционально связанным с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи. Промотор может представлять собой промотор с показанной эффективностью для экспрессии в эукариотических клетках. Промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью, может представлять собой промотор ЦМВ, промотор из вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 (SV40), как, например, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), как, например, промотор длинных концевых повторов (LTR) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота, промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ALV), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), предранний промотор ЦМВ, промотор вируса Эпштейна - Барра (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может представлять собой промотор из человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, креатин человеческих мышц, человеческий полиэдрин или человеческий металлотионеин.

Промотор также может представлять собой конститутивный промотор или индуцируемый промотор, который иницирует транскрипцию, только когда клетка-хозяина подвергается воздействию какого-нибудь конкретного внешнего стимула. В случае многоклеточного организма промотор также может обладать специфичностью по отношению к определенной ткани или органу, или на определенной стадии развития. Промотор также может представлять собой тканеспецифический промотор, как, например, промотор, обладающий специфичностью по отношению к мышечной ткани или коже, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US 20040175727, содержания которых включены в данный документ во всей их полноте.

Промотор может быть ассоциирован с энхансером. Энхансер может быть локализован выше кодирующей последовательности. Энхансер может представлять собой энхансер человеческого актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, креатина человеческих мышц или энхансер вирусов, как, например, полученный из ЦМВ, FMDV, RSV из EBV. Полинуклеотидные энхансеры описаны в патентах США № 5593972, 5962428 и W094/016737, содержания которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

(6) Интрон.

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

(7) Область терминации транскрипции.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать одну или более областей терминации транскрипции. Область терминации транскрипции может располагаться ниже кодирующей последовательности для обеспечения эффективной терминации. Область терминации транскрипции может быть получена из того же гена, что и описанный выше промотор, или может быть получена из одного или более разных генов.

(8) Иницирующий кодон.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать один или более иницирующих кодонов. Иницирующий кодон может быть локализован выше коди-

рующей последовательности. Иницирующий кодон может располагаться в рамке считывания с кодирующей последовательностью. Иницирующий кодон может быть ассоциирован с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной инициации трансляции, например, без ограничений сайт связывания с рибосомой.

(9) Терминирующий кодон.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать один или более терминирующих или стоп-кодонов. Терминирующий кодон может располагаться ниже кодирующей последовательности. Терминирующий кодон может располагаться в рамке считывания с кодирующей последовательностью.

Терминирующий кодон может быть ассоциирован с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной терминации трансляции.

(10) Сигнал полиаденилирования.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать один или более сигналов полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может включать 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 LTR, сигнал полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирования β -глобина человека. Сигнал полиаденилирования SV40 может представлять собой сигнал полиаденилирования из плазмиды pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

(11) Лидерная последовательность.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать одну или более лидерных последовательностей. Лидерная последовательность может кодировать сигнальный пептид. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина (Ig), например, без ограничений сигнальный пептид IgG или сигнальный пептид IgE. В некоторых примерах лидерная последовательность представляет собой лидерную последовательность IgE SEQ ID NO: 65: atggactgga ctggattct gtcctggct gscgscgca ctcgctgca tagc, которая кодирует белок набор данных 22 элементов NO: 66: Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Thr Arg Val His Ser.

b) Расположение конструкций последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Как описано выше, последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать одну или более конструкций последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, причем каждая конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать один или более компонентов. Один или более компонентов описаны подробно ниже. Один или более компонентов при включении в состав конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты могут быть расположены в любом порядке по отношению друг к другу. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более компонентов могут быть расположены в конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты, как описано ниже.

(1) Расположение 1.

При одном расположении первая конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и вторая конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи.

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

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

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

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

(2) Расположение 2.

При втором расположении конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид тяжелой цепи, может быть расположена выше (или 5') гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В альтернативном варианте гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид легкой цепи, может быть расположена выше (или 5') гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть помещена в вектор, как описано ниже более подробно.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления протеазой и/или линкерную последовательность. При включении в состав конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сайт расщепления протеазой, может быть расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В соответствии с этим, сайт расщепления протеазой обеспечивает разделение полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи на отдельные полипептиды при экспрессии. В других вариантах реализации изобретения, если в состав конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты включена линкерная последовательность, тогда линкерная последовательность может быть расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты также может включать промотор, интрон, область терминации транскрипции, иницирующий кодон, терминирующий кодон и/или сигнал полиаденилирования. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать один или более промоторов. Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать два промотора, так, что один промотор может быть ассоциирован с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и второй промотор может быть ассоциирован с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Еще в других вариантах реализации изобретения конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может включать один промотор, который ассоциирован с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может дополнительно включать две лидерные последовательности, причем первая лидерная последовательность расположена выше (или 5') гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и вторая лидерная последовательность расположена выше (или 5') гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В соответствии с этим, первый сигнальный пептид, кодируемый первой лидерной последовательностью, может быть связан с помощью пептидной связи с полипептидом тяжелой цепи, и второй сигнальный пептид, кодируемый второй лидерной последовательностью, может быть связан с помощью пептидной связи с полипептидом легкой цепи.

В соответствии с этим, один пример расположения 2 может включать вектор (и, следовательно, конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который включает VL и CL, причем линкерная последовательность расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Второй пример расположения 2 может включать вектор (и, следовательно, конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который включает VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который включает VL и CL, причем гетерологичная по-

следовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сайт расщепления протеазой, расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

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

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

с) Экспрессия генов в конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Как описано выше, конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты в числе одного или более компонентов может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи и/или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. В соответствии с этим, конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи.

При применении расположения 1, как описано выше, первая конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи, и вторая конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида легкой цепи. При применении расположения 2, как описано выше, конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи.

При экспрессии, например, но без ограничений, в клетке, организме или млекопитающем может происходить сборка полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи с образованием синтетического антитела. В частности, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, так что в результате сборки образуется синтетическое антитело, способное связываться с антигеном. В других вариантах реализации изобретения полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, так что в результате сборки образуется более иммуногенное синтетическое антитело по сравнению с антителом, не подвергающимся сборке, как описано в настоящем документе. Еще в других вариантах реализации изобретения полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом, так что в результате сборки образуется синтетическое антитело, способное вызывать или индуцировать иммунный ответ против антигена.

d) Вектор.

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

Один или более векторов могут представлять собой гетерологичную экспрессирующую конструкцию, которая, в целом, представляет собой плазмиду, которую применяют для введения специфического гена в клетку-мишень. Как только экспрессирующий вектор попадает внутрь клетки, с помощью рибосомальных комплексов клеточного транскрипционного и трансляционного аппарата происходит образование полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи, которые кодируются конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Один или более векторов могут экспрессировать большие количества стабильной матричной РНК и, таким образом, белков.

(1) Экспрессирующий вектор.

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

(2) Плазида.

Один или более векторов могут представлять собой плазмиду. Плазида может быть применена для

трансфекции клеток с помощью конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Плазмида может быть применена для введения конструкции последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетки субъекта. Плазмида также может содержать регуляторную последовательность, которая может быть подходящей для экспрессии генов в клетке, в которую вводят плазмиду.

Плазмида также может содержать точку начала репликации млекопитающих для экстрахромосомной поддержки плазмиды и для производства множества копий плазмиды в клетке. Плазмида может представлять собой pVAX1, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), которые могут содержать точку начала репликации вируса Эпштейна - Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, которые могут обеспечивать эписомальную репликацию с образованием множества копий в отсутствие интеграции. В качестве остова плазмиды может выступать pAV0242. Плазмида может представлять собой плазмиду дефективного по репликации аденовируса типа 5 (Ad5).

Плазмида может представлять собой pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), что может быть применена для производства белка в *Escherichia coli* (*E.coli*). Плазмида также может представлять собой pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), что может быть применена для производства белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазмида также может быть получена из полной экспрессирующей системы MAXBAC™ бакуловируса (Invitrogen, San Diego, Calif.), что может быть использована для производства белка в клетках насекомых. Плазмида также может представлять собой pcDNA1 или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif), что может быть использована для производства белка в клетках млекопитающего, как, например, клетках яичника китайского хомячка (CHO).

(3) Кольцевой и линейный вектор.

Один или более векторов могут представлять собой кольцевую плазмиду, которая может трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или экстрахромосомного присутствия (например, автономная реплицирующаяся плазмида с точкой начала репликации). Вектор может представлять собой pVAX, pcDNA3.0 или pGovaх, или другой экспрессирующий вектор, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Также в настоящем документе предложена линейная нуклеиновая кислота или линейная экспрессирующая кассета ("ЛЕС"), которую можно эффективно доставить в организм субъекта посредством электропорации, и которая способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. ЛЕС может представлять собой любую линейную ДНК, лишенную фосфатного остова. ЛЕС может не содержать никаких генов устойчивости к антибиотику и/или никакого фосфатного остова. ЛЕС может не содержать других последовательностей нуклеиновой кислоты, не относящихся к экспрессии желаемого гена.

ЛЕС может быть получена из любой плазмиды, способной линеаризоваться. Плазмида может обладать способностью экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Плазмида может представлять собой pNP (Puerto Rico/34) или pM2 (New Caledonia/99). Плазмида может представлять собой WLVO09, pVAX, pcDNA3.0 или pGovaх, или другой экспрессирующий вектор, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

ЛЕС может представлять собой pcrM2. ЛЕС может представлять собой pcrNP. pcrNP и pcrMR может быть получена из pNP (Puerto Rico/34) и pM2 (New Caledonia/99) соответственно.

(4) Способ получения вектора.

В настоящем документе предложен способ получения одного или более векторов, в который помещают конструкцию последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. После заключительного этапа субклонирования вектор может быть использован для инокуляции культуры клеток в ферментационном контейнере большого объема с использованием способов, известных в данной области техники.

В других вариантах реализации изобретения после заключительного этапа субклонирования вектор может быть применен с одним или более устройствами для электропорации (EP). EP-устройства описаны более подробно ниже.

Препарат одного или более векторов может быть составлен или изготовлен с использованием комбинации известных устройств и методов, но предпочтительно их изготавливают с использованием метода изготовления плазмид, который описан в предоставленной по лицензии находящейся в процессе одновременного рассмотрения предварительной заявке США с серийным № 60/939792, которая была подана 23 мая 2007 года. В некоторых примерах препараты ДНК-плазмид, описанных в настоящем документе, могут быть составлены в концентрациях, больших или равных 10 мг/мл. Методы изготовления также включают или охватывают различные устройства и протоколы, общеизвестные специалистам в данной области техники, помимо методов, описанных в заявке на патент США № 60/939792, включая методы, описанные в предоставленном по лицензии патенте США № 7238522, который выдан 3 июля 2007 года. Вышеупомянутые заявка и патент, соответственно, заявка на патент США с серийным № 60/939792 и патент США № 7238522, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

4. Антитело

Как описано выше, конструкция последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело может связываться или реагировать с антигеном, который описан более подробно ниже.

Антитело может содержать ряд определяющих комплементарность ("CDR") областей тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно встроенных между рядом каркасных областей ("FR") тяжелой цепи и легкой цепи, которые обеспечивают поддержку для CDR и определяют пространственное соотношение CDR по отношению друг к другу. Ряд CDR может содержать три гипервариабельные области V-области тяжелой цепи или легкой цепи. Начиная с N-конца тяжелой цепи или легкой цепи, эти области обозначены "CDR1", "CDR2" и "CDR3", соответственно. Антигенсвязывающий сайт, таким образом, может включать шесть CDR, содержащих ряд CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

Протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, причем каждый из двух (F(ab)-фрагментов) содержит ковалентно связанный гетеродимер, который включает интактный антигенсвязывающий сайт. Фермент пепсин может расщеплять молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, включая F(ab')₂-фрагмент, который содержит оба антигенсвязывающих сайта. В соответствии с этим, антитело может содержать Fab или F(ab')₂. Fab может включать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи Fab может включать VH-область и CH1-область. Полипептид легкой цепи может включать VL-область и CL-область.

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

Антитело может представлять собой поликлональное или моноклональное антитело. Антитело может представлять собой химерное антитело, одноцепочечное антитело, аффино-зрелое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Гуманизированное антитело может представлять собой антитело, полученное из вида, отличного от человека, которое связывается с желаемым антигеном, имеющее одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR) из вида, отличного от человека, и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека.

5. Антиген

Синтетическое антитело направлено на антиген или его фрагмент, или вариант. Антиген может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, аминокислотную последовательность или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, их вариант, их фрагмент или их комбинацию.

Антиген может быть получен из любого числа организмов, например, вируса, паразитирующего организма, бактерии, гриба или млекопитающего. Антиген может быть ассоциирован с аутоиммунным заболеванием, аллергией или астмой. В других вариантах реализации изобретения антиген может быть ассоциирован с раком, герпесом, гриппом, гепатитом В, гепатитом С, вирусом папилломы человека (ВПЧ) или вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген является чужеродным. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген представляет собой аутоантиген.

а) Чужеродные антигены.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген является чужеродным. Чужеродный антиген представляет собой внешнее вещество (т.е. образующееся вне организма субъекта), которое при попадании в организм способно стимулировать иммунный ответ.

(1) Вирусные антигены.

Чужеродный антиген может представлять собой вирусный антиген или его фрагмент, или его вариант. Вирусный антиген может быть получен из вируса, принадлежащего одному из следующих семейств: Adenoviridae, Arenaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Hepadnaviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Papovaviridae, Paramyxoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae, Reoviridae, Retroviridae, Rhabdoviridae или Togaviridae. Вирусный антиген может быть получен из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса чикунгунья (CHIKV), вируса лихорадки денге, вирусов папилломы, например, вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса полиомиелита, вирусов гепатита, например, вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D (HDV) и вируса гепатита Е (HEV), вируса оспы (вируса натуральной оспы и вирус псевдооспы), вируса коревой оспы, вируса гриппа, риновирусов, вирусов лошадиного энцефалита, вируса краснухи, вируса желтой лихорадки, вируса Норуолка, вируса гепатита А, вируса Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-I), вируса волосатоклеточного лейкоза (HTLV-II), вируса калифорнийского энцефалита, вируса Ханта (геморрагическая лихорадка), вируса бешенства, вируса лихорадки Эбола, вируса Марбурга, вируса кори, вируса свинки, респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса простого герпеса 1 (оральный герпес), вируса простого герпеса 2 (генитальный вирус), опоясывающего герпеса (ветряная оспа, также известная, как вет-

рянка), цитомегаловируса (ЦМВ), например, ЦМВ человека, вируса Эпштейна-Барра (EBV), флавивируса, вируса ящура, вируса Ласса, ареновируса или вируса, вызывающего рак.

(а) Антиген вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Вирусный антиген может быть получен из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). В некоторых вариантах реализации изобретения антиген ВИЧ может представлять собой белок оболочки подтипа А, белок оболочки подтипа В, белок оболочки подтипа С, белок оболочки подтипа D, белок Nef-Rev подтипа В, белок А, В, С или D подтипа Gag, белок MPol, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотные последовательности Env A, Env B, Env C, Env D, В Nef-Rev, Gag или любые их комбинации.

Синтетическое антитело, специфическое по отношению к ВИЧ, может включать Fab-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4. Синтетическое антитело может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7. Fab-фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 50. Fab может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 52.

Синтетическое антитело, специфическое по отношению к ВИЧ, может включать Ig, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. Ig может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 62. Ig может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 63. Ig может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 54, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 56.

(b) Вирус чикунгунья.

Вирусный антиген может быть получен из вируса чикунгунья. Вирус чикунгунья относится к роду альфавирусов семейства *Togaviridae*. Вирус чикунгунья передается людям вследствие укуса зараженных комаров, таких, что принадлежат к роду *Aedes*.

Синтетическое антитело, специфическое по отношению к CHIKV, может включать Fab-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 58, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 60.

(c) Вирус денге.

Вирусный антиген может быть получен из вируса денге. Антиген вируса денге может представлять собой один из трех белков или полипептидов (С, ргМ и Е), из которых образуется вирусная частица. Антиген вируса денге может представлять собой один из семи белков или полипептидов (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5), которые вовлечены в репликацию вируса. Вирус денге может относиться к одному из пяти штаммов или серотипов вируса, включая DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4. Антиген может представлять собой любую комбинацию из множества антигенов вируса денге.

Синтетическое антитело, специфическое по отношению к вирусу денге, может включать Ig, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 44.

(d) Антиген вируса гепатита.

Вирусный антиген может включать антиген вируса гепатита (т.е. антиген гепатита) или его фрагмент, или его вариант. Антиген вируса гепатита может относиться к антигену или иммуногену из одного или более из вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D (HDV) и/или вируса гепатита Е (HEV).

Антиген вируса гепатита может относиться к антигену из HAV. Антиген вируса гепатита может относиться к капсидному белку HAV, неструктурному белку HAV, их фрагменту, их варианту или их комбинации.

Антиген вируса гепатита может относиться к антигену из HCV. Антиген вируса гепатита может относиться к нуклеокапсидному белку (т.е. коровому белку), белку оболочки HCV (например, E1 и E2), неструктурному белку HCV (например, NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a и NS5b), их фрагменту, их варианту или их комбинации.

Антиген вируса гепатита может относиться к антигену из HDV. Антиген вируса гепатита может относиться к дельта-антигену HDV, его фрагменту, его варианту или его комбинации.

Антиген вируса гепатита может относиться к антигену из HEV. Антиген вируса гепатита может относиться к капсидному белку HEV, его фрагменту, его варианту или его комбинации.

Антиген вируса гепатита может относиться к антигену из HBV. Антиген вируса гепатита может относиться к коровому белку HBV, белку поверхности HBV, ДНК-полимеразе HBV, белку HBV, кодируе-

мому геном X, их фрагменту, их варианту или их комбинации. Антиген вируса гепатита может относиться к коровому белку HBV генотипа А, коровому белку HBV генотипа В, коровому белку HBV генотипа С, коровому белку HBV генотипа D, коровому белку HBV генотипа Е, коровому белку HBV генотипа F, коровому белку HBV генотипа G, коровому белку HBV генотипа H, белку поверхности HBV генотипа А, белку поверхности HBV генотипа В, белку поверхности HBV генотипа С, белку поверхности HBV генотипа D, белку поверхности HBV генотипа Е, белку поверхности HBV генотипа F, белку поверхности HBV генотипа G, белку поверхности HBV генотипа H, их фрагменту, их варианту или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген гепатита может относиться к антигену из HBV генотипа А, HBV генотипа В, HBV генотипа С, HBV генотипа D, HBV генотипа Е, HBV генотипа F, HBV генотипа G или HBV генотипа H.

(е) Антиген вируса папилломы человека (ВПЧ).

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

Антигены ВПЧ могут относиться к доменам Е6 или Е7 ВПЧ из каждого типа ВПЧ. Например, в случае ВПЧ типа 16 (ВПЧ16) антиген ВПЧ16 может включать антиген ВПЧ16 Е6, антиген ВПЧ16 Е7, их фрагменты, варианты или комбинации. Аналогичным образом, антиген ВПЧ может относиться к ВПЧ 6 Е6 и/или Е7, ВПЧ 11 Е6 и/или Е7, ВПЧ 18 Е6 и/или Е7, ВПЧ 31 Е6 и/или Е7, ВПЧ 33 Е6 и/или Е7, ВПЧ 52 Е6 и/или Е7, или ВПЧ 58 Е6 и/или Е7, их фрагментам, вариантам или комбинациям.

(f) Антиген RSV.

Вирусный антиген может содержать антиген RSV. Антиген RSV может относиться к слитому белку RSV (также в дальнейшем именуемый "RSV F", "белок RSV F" и "белок F") или его фрагменту, или варианту. Слитый белок RSV человека может быть консервативным между подтипами А и В RSV. Антиген RSV может относиться к белку RSV F или его фрагменту, или варианту из штамма RSV Long (GenBank AAX23994.1). Антиген RSV может относиться к белку RSV F из штамма RSV A2 (GenBank AAB59858.1) или его фрагменту, или варианту. Антиген RSV может представлять собой мономер, димер или тример белка RSV F или его фрагмента, или варианта.

F-белок RSV может существовать в двух формах: форме, предшествующей слиянию и форме, образующейся после слияния. Форма F RSV, образующаяся после слияния, вызывает образование высокого титра нейтрализующих антител у иммунизированных животных и защищает животных от инфицирования RSV.

Антиген RSV также может относиться к гликопротеину, обеспечивающему прикрепление RSV (также в дальнейшем именуемый "RSV G", "белок RSV G" и "белок G"), или его фрагменту, или варианту. Белок RSV G человека различается между подтипами А и В RSV. Антиген может относиться к белку RSV G или его фрагменту, или варианту из штамма RSV Long (GenBank AAX23993). Антиген RSV может относиться к белку RSV G из изолята H5601 подтипа В RSV, изолята H1068 подтипа В RSV, изолята H5598 подтипа В RSV, изолята H1123 подтипа В RSV или его фрагменту, или варианту.

В других вариантах реализации изобретения антиген RSV может относиться к неструктурному белку 1 ("белок NS1") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV NS1 или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23987.1). В других вариантах реализации изобретения антиген RSV может относиться к неструктурному белку 1 ("белок NS1") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV NS2 или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23988.1). Антиген RSV может дополнительно относиться к нуклеокапсидному ("N") белку RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV N или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23989.1). Антиген RSV может относиться к фосфопротеину ("P") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV P или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23990.1). Антиген RSV также может относиться к белку матрикса ("M") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV M или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23991.1).

Еще в других вариантах реализации изобретения антиген RSV может относиться к малому гидрофобному ("SH") белку RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV SH или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23992.1). Антиген RSV также может относиться к белку 2-1 матрикса ("M2-1") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV M2-1 или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23995.1). Антиген RSV также может дополнительно относиться к белку 2-2 матрикса ("M2-2") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV M2-2 или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23997.1). В других вариантах реализации изобретения антиген RSV

может относиться к полимеразе L ("L") RSV человека или его фрагменту, или варианту. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV L или его фрагмент, или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23996.1).

В дополнительных вариантах реализации изобретения антиген RSV может иметь оптимизированную аминокислотную последовательность белка NS1, NS2, N, P, M, SH, M2-1, M2-2 или L. Например, антиген RSV может представлять собой белок RSV человека или рекомбинантный антиген, как, например, белки, кодируемые геномом RSV человека.

В других вариантах реализации изобретения антиген RSV может относиться без ограничений к белку RSV F из штамма RSV Long, белку RSV G из штамма RSV Long, оптимизированной аминокислотной последовательности RSV G, геному RSV человека штамма RSV Long, оптимизированной аминокислотной последовательности RSV F, белку RSV NS1 из штамма RSV Long, белку RSV NS2 из штамма RSV Long, белку RSV N из штамма RSV Long, белку RSV P из штамма RSV Long, белку RSV M из штамма RSV Long, белку RSV SH из штамма RSV Long, белку RSV M2-1 из штамма RSV Long, белку RSV M2-2 из штамма RSV Long, белку L из штамма RSV Long, белку RSV G из изолята H5601 подтипа B RSV, белку RSV G из изолята H1068 подтипа B RSV, белку RSV G из изолята H5598 подтипа B RSV, белку RSV G из изолята H1123 подтипа B RSV или их фрагменту, или варианту.

(g) Антиген вируса гриппа.

Вирусный антиген может содержать антиген из вируса гриппа. Антигены вируса гриппа представляют собой антигены, способные вызывать иммунный ответ у млекопитающего против одного или более серотипов вируса гриппа. Антиген может содержать полноразмерный продукт трансляции HA0, субъединицу HA1, субъединицу HA2, их фрагмент, вариант или комбинацию. Антиген гемагглютинаина вируса гриппа может быть получен из множества штаммов вируса гриппа А серотипа H1, серотипа H2, гибридной последовательности, полученной из различных наборов множества штаммов вируса гриппа А серотипа H1, или получен из множества штаммов вируса гриппа В. Антиген гемагглютинаина вируса гриппа может быть получен из вируса гриппа В.

Антиген вируса гриппа также может содержать по меньшей мере один антигенный эпитоп, который может оказывать действие против конкретных иммуногенов вируса гриппа, против которых можно вызвать иммунный ответ. Антиген может обладать полным репертуаром иммуногенных сайтов и эпитопов, присутствующих в интактном вирусе гриппа. Антиген может быть получен из последовательностей антигена гемагглютинаина из множества штаммов вируса гриппа А одного серотипа, как, например, множества штаммов вируса гриппа А серотипа H1 или серотипа H2. Антиген может относиться к гибридной последовательности антигена гемагглютинаина, полученной вследствие объединения двух разных последовательностей антигена гемагглютинаина или их участков. Каждая из двух разных последовательностей антигена гемагглютинаина может быть получена из разного набора из множества штаммов вируса гриппа А одного серотипа, как, например, множества штаммов вируса гриппа А серотипа H1. Антиген может относиться к последовательности антигена гемагглютинаина, полученной из последовательностей антигена гемагглютинаина из множества штаммов вируса гриппа В.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген вируса гриппа может представлять собой антиген H1 NA, H2 NA, H3 NA, H5 NA или BNA.

(h) Вирус Эбола.

Вирусный антиген может быть получен из вируса Эбола. Заболевание, вызванное вирусом Эбола (EVD), или геморрагическая лихорадка Эбола (EHF) включает любой из четырех из пяти известных вирусов Эбола, включая вирус Бундибугио (BDBV), вирус Эбола (EBOV), суданский вирус (SUDV) и вирус тайского леса (TAFV, также называемый вирусом Эбола Кот-д'Ивуара (вирус Эбола Берега Слоновой Кости, CIEBOV)).

(2) Бактериальные антигены.

Чужеродный антиген может представлять собой бактериальный антиген или его фрагмент, или его вариант. Бактерия может принадлежать к любому из следующих типов: Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Caldiseptica, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospira, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Thermotogae и Verrucomicrobia.

Бактерия может относиться к грамположительной бактерии или грамотрицательной бактерии. Бактерия может относиться к аэробной бактерии или анаэробной бактерии. Бактерия может относиться к автотрофной бактерии или гетеротрофной бактерии. Бактерия может относиться к мезофильной, нейтрофильной, экстремофильной, ацидофильной, алкалофильной, термофильной, психрофильной, галофильной или осмофильной бактерии.

Бактерия может относиться к бактерии сибирской язвы, антибиотикорезистентной бактерии, болезнетворной бактерии, бактерии, вызывающей пищевое отравление, инфекционной бактерии, бактерии Salmonella, бактерии Staphylococcus, бактерии Streptococcus или бактерии столбняка. Бактерия может относиться к микобактерии, Clostridium tetani, Yersinia pestis, Bacillus anthracis, метициллин-резистентным Staphylococcus aureus (MRSA) или Clostridium difficile. Бактерия может относиться к Mycobacterium tuber-

culosis.

(a) Антигены *Mycobacterium tuberculosis*.

Бактериальный антиген может представлять собой антиген *Mycobacterium tuberculosis* (т.е. ТВ-антиген или ТВ-иммуноген) или его фрагмент, или его вариант. ТВ-антиген может быть получен из семейства Ag85 ТВ-антигенов, например, Ag85A и Ag85B. ТВ-антиген может быть получен из семейства Esx ТВ-антигенов, например, EsxA, EsxB, EsxC, EsxD, EsxE, EsxF, EsxH, EsxO, EsxQ, EsxR, EsxS, EsxT, EsxU, EsxV и EsxW.

(3) Антигены паразитирующих организмов.

Чужеродный антиген может представлять собой антиген паразитирующих организмов или его фрагмент, или вариант. К паразитирующему организму могут относиться простейшие, гельминты или эктопаразиты. Гельминт (т.е. червь) может относиться к плоским червям (например, трематоды и ленточные черви), колочеголовчатым червям или круглым червям (например, острицы). Эктопаразит может относиться к вшам, блохам и клещам.

Паразит может относиться к любому паразиту, вызывающему любое из следующих заболеваний: акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидиоз, байлисаскаридоз, болезнь Чагаса, клонорхоз, кохлиомиаз, криптоспоририоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, элифантиаз, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсидоз, филяриоз, гиардиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, изоспороз, лихорадка Катаямы, лейшманиоз, болезнь Лайма, малярия, метагонимоз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, чесотка, шистосомоз, сонная болезнь, стронгилоидоз, тениоз, токсокароз, токсоплазмоз, трихинеллез и трихиуриаз.

Паразит может относиться к *Acanthamoeba*, *Anisakis*, *Ascaris lumbricoides*, оводу, *Balantidium coli*, клопу, *Cestoda* (ленточный червь), клещам-тромбикюлидам, *Cochliomyia hominivorax*, *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Giardia lamblia*, анкилостоме, *Leishmania*, *Linguatula serrata*, печеночному сосальщику, *Loa loa*, *Paragonimus* - легочному сосальщику, острице, *Plasmodium falciparum*, шистосоме, *Strongyloides stercoralis*, клещу, ленточному червю, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma*, власоглаву или *Wuchereria bancrofti*.

(a) Антиген возбудителя малярии.

Чужеродный антиген может представлять собой антиген возбудителя малярии (т.е. PF-антиген или PF-иммуноген) или его фрагмент, или его вариант. Антиген может быть получен из паразитического организма, вызывающего малярию. Паразитический организм, вызывающий малярию, может представлять собой *Plasmodium falciparum*. Антиген *Plasmodium falciparum* может включать антиген спорозонта (CS).

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген возбудителя малярии может относиться к одному из иммуногенов P. falciparum CS; LSA1; TRAP; CelTOS; и Amal. Иммуногены могут относиться к полноразмерным или иммуногенным фрагментам полноразмерных белков.

В других вариантах реализации изобретения антиген возбудителя малярии может представлять собой TRAP, который также называется SSP2. Еще в других вариантах реализации изобретения антиген возбудителя малярии может представлять собой CelTOS, который также называется Ag2 и является высококонсервативным антигеном *Plasmodium*. В дополнительных вариантах реализации изобретения антиген возбудителя малярии может представлять собой Amal, который является высококонсервативным антигеном *Plasmodium*. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген возбудителя малярии может представлять собой антиген CS.

В других вариантах реализации изобретения антиген возбудителя малярии может представлять собой слитый белок, содержащий комбинацию двух или более белков PF, представленных в настоящем документе. Например, слитые белки могут содержать два или более иммуногена CS, иммуногена ConLSA1, иммуногена ConTRAP, иммуногена ConCelTOS и иммуногена ConAmal, связанных друг с другом в непосредственной близости или связанных со спейсером или одной, или несколькими аминокислотами посередине. В некоторых вариантах реализации изобретения слитый белок содержит два иммуногена PF; в некоторых вариантах реализации слитый белок содержит три иммуногена PF; в некоторых вариантах реализации слитый белок содержит четыре иммуногена PF; и в некоторых вариантах реализации слитый белок содержит пять иммуногенов PF. Слитые белки с двумя иммуногенами PF могут содержать: CS и LSA1; CS и TRAP; CS и CelTOS; CS и Amal; LSA1 и TRAP; LSA1 и CelTOS; LSA1 и Amal; TRAP и CelTOS; TRAP и Amal; или CelTOS и Amal. Слитые белки с тремя иммуногенами PF могут содержать: CS, LSA1 и TRAP; CS, LSA1 и CelTOS; CS, LSA1 и Amal; LSA1, TRAP и CelTOS; LSA1, TRAP и Amal; или TRAP, CelTOS и Amal. Слитые белки с четырьмя иммуногенами PF могут содержать: CS, LSA1, TRAP и CelTOS; CS, LSA1, TRAP и Amal; CS, LSA1, CelTOS и Amal; CS, TRAP, CelTOS и Amal; или LSA1, TRAP, CelTOS и Amal. Слитые белки с пятью иммуногенами PF могут содержать CS или CS-alt, LSA1, TRAP, CelTOS и Amal.

(4) Антигены грибов.

Чужеродный антиген может представлять собой антиген грибов или его фрагмент, или вариант. Гриб может относиться к виду *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, дрожжевым грибам *Candida* (например, *Candida albicans*), *Coccidioides*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, dermatophyte, видам *Fusarium*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucoromycotina*, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum* или *Cladosporium*.

b) Аутоантигены.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген представляет собой аутоантиген. Аутоантиген может относиться к компоненту организма субъекта, который способен стимулировать иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения аутоантиген не вызывает иммунный ответ, если субъект не болен, например, аутоиммунным заболеванием.

Аутоантигены могут включать без ограничений цитокины, антитела против вирусов, тех, что перечислены выше, включая ВИЧ и вирус денге, антигены, воздействующие на прогрессирование или развитие рака, и рецепторы клеточной поверхности или трансмембранные белки.

(1) WT-1.

Аутоантиген может представлять собой ген-супрессор опухоли Вильмса 1 (WT1), его фрагмент, его вариант или их комбинацию. WT1 представляет собой транскрипционный фактор, содержащий на N-конце ДНК-связывающий домен, богатый на пролин/глутамин, и на C-конце четыре мотива цинковых пальцев. WT1 играет роль в нормальном развитии мочеполовой системы и взаимодействует с многочисленными факторами, например, p53, известным супрессором опухолевого роста, и сериновой протеазой HtrA2, которая расщепляет WT1 во многих сайтах после лечения с помощью цитотоксического лекарственного средства. Мутация WT1 может привести к развитию опухоли или злокачественного новообразования, например, опухоли Вильмса или опухолей, экспрессирующих WT1.

(2) EGFR.

Аутоантиген может включать рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) или его фрагмент, или вариант. EGFR (также называемый ErbB-1 и HER1) представляет собой рецептор клеточной поверхности для представителей семейства эпидермального фактора роста (EGF-семейство), связывающий внеклеточные белковые лиганды. EGFR является представителем ErbB-семейства рецепторов, которое включает четыре близкородственных рецепторных тирозинкиназы: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) и Her 4 (ErbB-4). Мутации, влияющие на экспрессию или активность EGFR, могут привести к развитию злокачественного новообразования.

Антиген может включать антиген ErbB-2. Erb-2 (рецептор эпидермального фактора роста 2 человека) также известный как Neu, HER2, CD340 (кластер дифференцировки 340) или p185, кодируется геном ERBB2. Было показано, что амплификация или повышенная экспрессия этого гена играет роль в развитии и прогрессировании определенных агрессивных типов рака молочной железы. У около 25-30% женщин с раком молочной железы происходит генетическое изменение гена ERBB2, приводящее к выработке повышенного количества HER2 на поверхности опухолевых клеток. Повышенная экспрессия HER2 способствует быстрому делению клеток и, следовательно, HER2 является маркером опухолевых клеток.

Синтетическое антитело, специфическое по отношению к HER2, может включать Fab-фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 40, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 42.

(3) Кокаин.

Аутоантиген может представлять собой антиген рецептора кокаина. Рецепторы кокаина включают дофаминовые транспортеры.

(4) PD-1.

Аутоантиген может включать белок программируемой гибели клеток (PD-1). Белок программируемой гибели клеток (PD-1) и его лиганды, PD-L1 и PD-L2, обеспечивают передачу ингибирующих сигналов, которые регулируют баланс между T-клеточной активацией, толерантностью и иммунопатологией. PD-1 представляет собой белковую молекулу клеточной поверхности, состоящую из 288 аминокислот, включая внеклеточный домен IgV, за которым следует трансмембранная область и внутриклеточная хвостовая часть.

(5) 4-1BB.

Аутоантиген может включать лиганд 4-1BB. Лиганд 4-1BB представляет собой трансмембранный гликопротеин 2-го типа, принадлежащий к суперсемейству ФНО. Лиганд 4-1BB может быть экспрессирован на активированных T-лимфоцитах. 4-1BB представляет собой индуцируемую активацией T-клеточную костимулирующую молекулу. Активация сигнального пути через 4-1BB повышает экспрессию генов, способствующих выживанию клеток, усиливает деление клеток, индуцирует продукцию цитокинов и предотвращает индуцируемую активацией гибель T-клеток.

(6) CTLA4.

Аутоантиген может включать CTLA-4 (антиген цитотоксического T-лимфоцита 4), также известный как CD152 (кластер дифференцировки 152). CTLA-4 представляет собой белковый рецептор, встречающийся на T-клетках, который приводит к клеточно-опосредованной иммунной атаке на антигены. Антиген может представлять собой фрагмент CTLA-4, такой как внеклеточный V-домен, трансмембранный домен и цитоплазматическая хвостовая часть или их комбинация.

(7) ИЛ-6.

Аутоантиген может включать интерлейкин 6 (ИЛ-6). ИЛ-6 стимулирует воспалительные и аутоиммунные процессы при многих заболеваниях, включая без ограничений сахарный диабет, атеросклероз,

болезнь Альцгеймера, системную красную волчанку, множественную миелому, рак, болезнь Бехчета и ревматоидный артрит.

(8) MCP-1.

Аутоантиген может включать моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1). MCP-1 также называется лигандом хемокина (мотив C-C) 2 (CCL2) или малым индуцируемым цитокином A2. MCP-1 представляет собой цитокин, который принадлежит к семейству CC-хемокинов. MCP-1 привлекает моноциты, Т-клетки памяти и дендритные клетки к очагам воспаления, возникающим либо в результате поражения ткани, либо инфекции.

(9) Бета-амилоид.

Аутоантиген может включать бета-амилоид (A β) или его фрагмент, или вариант. A β -антиген может содержать пептид A β (X-Y), в котором аминокислотная последовательность от положения аминокислоты X до аминокислоты Y последовательности белка A β человека, включающего и X и Y, в частности, до аминокислотной последовательности от положения аминокислоты X до положения аминокислоты Y аминокислотной последовательности

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIVIV

(соответствующей положениям аминокислот 1-47; запрашиваемая последовательность человека) или его варианты. A β -антиген может содержать A β -полипептид полипептида AP(X-Y), в котором X может представлять собой 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, 31 или 32, а Y может представлять собой 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16 или 15. A β -полипептид может содержать фрагмент, который состоит по меньшей мере из 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45 или по меньшей мере 46 аминокислот.

(10) IP-10.

Аутоантиген может включать индуцируемый гамма-интерфероном (ИФН) белок 10 (IP-10). IP-10 также известен как малый индуцируемый цитокин B10 или хемокин 10, содержащий мотив C-X-C (CXCL10). CXCL10 секретируют клетки нескольких типов, такие как моноциты, эндотелиальные клетки и фибробласты, в ответ на ИФН- γ .

(11) PSMA.

Аутоантиген может включать простатический специфический мембранный антиген (PSMA). PSMA также известен как глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II), N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase I), PSMA представляет собой интегральный мембранный белок, экспрессируемый на высоком уровне клетками рака предстательной железы.

с) Другие антигены.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген представляет собой антиген, отличный от чужеродного антигена и/или аутоантигена.

(a) VRC01 ВИЧ-1.

В качестве другого антигена может выступать VRC01 ВИЧ-1. VCR01 ВИЧ-1 представляет собой антитело, специфическое по отношению к ВИЧ, нейтрализующее сайт связывания с CD4. VCR01 ВИЧ-1 контактирует с участками ВИЧ-1, включая внутреннюю часть петли D gp120, связывающую петлю CD4 и V5-область ВИЧ-1.

(b) PG9 ВИЧ-1.

В качестве другого антигена может выступать PG9 ВИЧ-1. PG9 ВИЧ-1 является новым представителем расширяющегося семейства гликан-зависимых антител, которые преимущественно связываются с гликопротеином (gp) оболочки (Env) ВИЧ (ВИЧ-1).

(c) 4E10 ВИЧ-1.

В качестве другого антигена может выступать ВИЧ-1 4E10. ВИЧ-1 4E10 представляет собой нейтрализующее антитело, специфичное к ВИЧ. ВИЧ-1 4E10 направлено против линейных эпитопов, картированных в околочембранной внешней области (MPER) ВИЧ-1, которая локализована на С-конце эктодомена gp41.

(d) DV-SF1.

В качестве другого антигена может выступать DV-SF1. DV-SF1 представляет собой нейтрализующее антитело, которое связывается с белком оболочки четырех серотипов вируса денге.

(e) DV-SF2.

В качестве другого антигена может выступать DV-SF2. DV-SF2 представляет собой нейтрализующее антитело, которое связывается с эпитопом вируса денге. DV-SF2 может быть специфичным к серотипу DENV4.

(f) DV-SF3.

В качестве другого антигена может выступать DV-SF3. DV-SF3 представляет собой нейтрализующее антитело, которое связывается с цепью EDIII A белка оболочки вируса денге.

6. Вспомогательные вещества и другие компоненты композиции

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В качестве фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества могут выступать функциональные молекулы, такие как наполнители, носители или разбавители. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой средство, облегчающее трансфекцию, которое может включать поверхностноактивные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфорил-липид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные вещества, облегчающее трансфекцию.

Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид. Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой поли-L-глутамат, и поли-L-глутамат может присутствовать в композиции в концентрации менее 6 мг/мл. Средство, облегчающее трансфекцию, также может включать поверхностноактивные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфорил-липид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален, и гиалуроновую кислоту, также можно использовать для введения в сочетании с композицией. Композиция также может включать средство, облегчающее трансфекцию, такое как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосом (см. например, WO 9324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие средства, облегчающее трансфекцию. Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрация средства для трансфекции в вакцине составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500, 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 средство, облегчающее вхождение генетического материала в клетку, которое описано в заявке на патент США № 021579, поданной 1 апреля 1994 года, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Композиция может содержать ДНК в количестве от около 1 нанограмма до 100 миллиграмм; от около 1 микрограмма до около 10 миллиграмм; или предпочтительно от около 0,1 микрограмма до около 10 миллиграмм; или более предпочтительно от около 1 миллиграмма до около 2 миллиграмм. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция по настоящему изобретению содержит от около 5 нанограмм до около 1000 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция может содержать от около 10 нанограмм до около 800 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция может содержать от около 0,1 до около 500 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция может содержать от около 1 до около 350 микрограмм ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция может содержать от около 25 до около 250 микрограмм, от около 100 до около 200 микрограмм, от около 1 нанограмма до 100 миллиграмм; от около 1 микрограмма до около 10 миллиграмм; от около 0,1 микрограмма до около 10 миллиграмм; от около 1 миллиграмм до около 2 миллиграмм, от около 5 нанограмм до около 1000 микрограмм, от около 10 нанограмм до около 800 микрограмм, от около 0,1 до около 500 микрограмм, от около 1 до около 350 микрограмм, от около 25 до около 250 микрограмм, от около 100 до около 200 микрограмм ДНК.

Лекарственный препарат на основе композиции может быть составлен согласно способу введения, который будет использован. Инъекционная фармацевтическая композиция может быть стерильной, не содержащей пирогенов и механических примесей. Может быть использован изотонический состав или раствор. Добавки для обеспечения изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Композиция может содержать средство для вазоконстрикции. Изотонические растворы могут включать фосфатно-буферный раствор. Композиция может дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизаторы могут обеспечивать стабильность лекарственного препарата при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение продолжительного периода времени, включая LGS или поликатионы, или полианионы.

7. Способ выработки синтетического антитела

Настоящее изобретение также относится к способу выработки синтетического антитела. Способ может включать введение композиции субъекту, который в этом нуждается, путем использования способа доставки, описанного более подробно ниже. В соответствии с этим, синтетическое антитело вырабатывается в организме субъекта или *in vivo* при введении композиции субъекту.

Способ также может включать введение композиции в одну или более клеток и, таким образом, в одной или более клетках может вырабатываться или образовываться синтетическое антитело. Способ может дополнительно включать введение композиции в одну или более тканей, например, без ограниче-

ний в кожу и мышцу и, таким образом, в одной или более тканях может вырабатываться или образовываться синтетическое антитело.

8. Способ идентификации или скрининга антитела

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу идентификации или скрининга антитела, описанного выше, которое взаимодействует или связывается с антигеном, описанным выше. В способе идентификации или скрининга антитела может быть использован антиген согласно методикам, известным специалистам в данной области техники, для идентификации или скрининга антитела. Такие методики могут включать без ограничений выбор антитела в библиотеке (например, фаговый дисплей) и иммунизацию животного с последующим выделением и/или очисткой антитела. См., например, способы, доступные в Rajan, S., and Sidhu, S., *Methods in Enzymology*, vol 502, Chapter One "Simplified Synthetic Antibody Libraries" (2012), который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

9. Способ доставки композиции

Настоящее изобретение также относится к способу доставки композиции субъекту, который в этом нуждается. Способ доставки может включать введение композиции субъекту. Введение может включать без ограничений инъекцию ДНК в присутствии или в отсутствие электропорации, доставку, опосредованную липосомами, и доставку, облегченную наночастицами.

Млекопитающее, получающее композицию, может относиться к человеку, примату, нечеловекообразному примату, корове, крупному рогатому скоту, овце, козе, антилопе, бизону, азиатскому буйволу, полороговому жвачному животному, оленю, ежам, слонам, ламе, альпаке, мышам, крысам и курице.

Композиция может быть введена с использованием разных путей введения, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, посредством ингаляции, посредством буккального введения, интраплевральный, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, интратекальный и внутрисуставно, и их комбинации. Для использования в ветеринарии композиция может быть введена в виде подходящего приемлемого лекарственного препарата в соответствии с нормальной ветеринарной практикой. Ветеринар сможет без труда определить режим дозирования и путь введения, который будет наиболее подходить конкретному животному. Композиция может быть введена с помощью традиционных шприцов, безыгольных инъекторов, "генных пушек для бомбардировки микрочастицами" или других физических методов, таких как электропорация ("EP"), "гидродинамический метод" или ультразвуку.

а) Электропорация.

Введение композиции посредством электропорации может осуществляться с использованием устройств для электропорации, которые можно сконфигурировать для подачи импульса энергии в желаемую ткань млекопитающего, обеспечивающего образование обратимых пор в клеточных мембранах, и предпочтительно импульс энергии представляет собой постоянный ток, аналогичный входному току, заранее заданному пользователем. Устройство для электропорации может содержать компонент для электропорации и электрод в сборке или рукоятку в сборке. Компонент для электропорации может содержать и включать один или более из различных элементов устройств для электропорации, включая: контроллер, генератор формы волны, тестер импеданса, регистратор формы волны, входной элемент, элемент для создания отчетов о состоянии, коммуникационный порт, компонент памяти, источник питания и выключатель питания. Электропорация может осуществляться с использованием устройства для электропорации *in vivo*, например, системы CELLECTRA EP (VGX Pharmaceuticals, Blue Bell, PA) или электропоратора Elgen (Genetronics, San Diego, CA) для облегчения трансфекции клеток плазмидой.

Компонент для электропорации может функционировать как один элемент устройств для электропорации, и другие элементы представляют собой отдельные элементы (или компоненты) во взаимодействии с компонентом для электропорации. Компонент для электропорации может функционировать как один элемент устройств для электропорации, который может находиться во взаимодействии еще с другими элементами устройств для электропорации, отдельными от компонента для электропорации. Можно не ограничиваться элементами устройств для электропорации, входящими в состав одного электромеханического или механического устройства, поскольку элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы во взаимодействии друг с другом. Компонент для электропорации может обеспечивать подачу импульса энергии, который производит постоянный ток в желаемой ткани и включает механизм обратной связи. Электрод в сборке может включать матрицу электродов, имеющую множество электродов, расположенных в пространстве таким образом, что электрод в сборке получает импульс энергии от компонента для электропорации и передает его в желаемую ткань через электроды. По меньшей мере один из множества электродов является нейтральным на протяжении подачи импульса энергии и измеряет импеданс в желаемой ткани, и передает данные импеданса к компоненту для электропорации. Система обратной связи может получать данные измеренного импеданса и регулировать импульс энергии, переданного компонентом для электропорации, для поддержания постоянного тока.

Множество электродов могут передавать импульс энергии децентрализованным способом. Множество электродов могут передавать импульс энергии децентрализованным способом, что обеспечивается посредством контроля электродов в соответствии с запрограммированной последовательностью, а запрограммированная последовательность задается пользователем для компонента для электропорации. За-

программированная последовательность может включать множество импульсов, передаваемых последовательно, причем каждый импульс из этого множества передается по меньшей мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс, и, причем последующий импульс из множества импульсов передается другим электродом по меньшей мере из двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс.

Механизм обратной связи осуществляется либо программным обеспечением, либо аппаратным обеспечением. Механизм обратной связи может осуществляться по аналогии с замкнутой петлей обратной связи. Обратная связь происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но предпочтительно представляет собой обратную связь в реальном времени или мгновенную (т.е. по существу, мгновенную, что определяется с помощью доступных методов для определения времени ответа). Нейтральный электрод может измерять импеданс в желаемой ткани и передавать данные импеданса по механизму обратной связи, и механизм обратной связи отвечает на импеданс и регулирует импульс энергии для поддержания постоянного тока со значением, сходным со значением заранее заданного тока. Система обратной связи может непрерывно и мгновенно поддерживать постоянную силу тока на протяжении передачи импульса энергии.

Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчать доставку композиции по настоящему изобретению, включают устройства и способы, описанные в патенте США № 7245963 Draghia-Akli, et al., публикации патента США 2005/0052630, предоставленной Smith, et al., содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Другие устройства для электропорации и способы электропорации, которые могут быть использованы для облегчения доставки композиции, включают устройства и способы, представленные в находящейся в процессе одновременного рассмотрения и совместной заявке на патент США серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 года, которая испрашивает приоритет в соответствии с 35 USC 119(e) для предварительных заявок США с серийными № 60/852149, поданной 17 октября 2006 года, и 60/978982, поданной 10 октября 2007 года, причем все они включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В патенте США № 7245963 Draghia-Akli, et al. описаны модульные системы электродов и их применение для облегчения введения биомолекулы в клетки определенной ткани животного или растительного организма. Модульные системы электродов могут содержать множество игольчатых электродов; иглу для подкожных инъекций; электрический соединитель, который обеспечивает связь проводимости от программируемого импульсного контроллера постоянной силы тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор сможет взять множество игольчатых электродов, которые установлены на опорной конструкции, и надежно ввести их в определенную ткань в животного или растительного организма. Затем обеспечивается доставка биомолекул в определенную ткань через иглу для подкожных инъекций. Программируемый импульсный контроллер постоянной силы тока активируется, и электрический импульс постоянной силы тока подается на игольчатые электроды. Подаваемый электрический импульс постоянной силы тока облегчает введение биомолекулы в клетку среди множества электродов. Полное содержание патента США № 7245963 включено в настоящий документ посредством ссылки.

В публикации патента США 2005/0052630, предоставленной Smith et al., описано устройство для электропорации, которое может быть использовано для облегчения эффективного введения биомолекулы в клетки определенной ткани животного или растительного организма. Устройство для электропорации содержит электрокинетическое устройство ("ЕКД-устройство"), функционирование которого определено программным обеспечением или встроенным программным обеспечением. ЕКД-устройство генерирует ряд программируемых последовательностей импульсов постоянной силы тока между электродами в матрице под управлением пользователя и на основе введенных пользователем параметров импульсов, и обеспечивает хранение и получение данных формы кривой тока. Устройство для электропорации также содержит заменяемый электродный диск, имеющий матрицу игольчатых электродов, центральный инъекционный канал для инъекционной иглы, и сменный направляющий диск. Полное содержание публикации патента США 2005/0052630 включено в настоящий документ посредством ссылки.

Электродные матрицы и способы, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/0052630, могут быть адаптированы для проникновения не только в ткани, такие как мышца, но также и другие ткани или органы. Из-за конфигурации электродной матрицы инъекционную иглу (для доставки биомолекулы по выбору) также полностью вводят в орган-мишень, и инъекция осуществляется перпендикулярно ткани-мишени в зоне, предварительно разграниченной электродами. Электроды, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/005263, предпочтительно имеют длину 20 мм и калибр 21.

В дополнение к этому, в некоторых вариантах реализации, которые охватывают устройства для электропорации и области их применения, предусмотрены устройства для электропорации, которые описаны в следующих патентах: патент США 5273525 выданный 28 декабря 1993 года, патенты США 6110161, выданный 29 августа 2000 года, 6261281, выданный 17 июля 2001 года, и 6958060, выданный 25 октября 2005 года, и патент США 6939862, выданный 6 сентября 2005 года. Кроме того, в настоящем

документе предусмотрены патенты, охватывающие объект изобретения, представленный в патенте США 6697669, выданном 24 февраля 2004 года, который касается доставки ДНК с использованием любого устройства из множества, и патенте США 7328064, выданном 5 февраля 2008 года, посвященному инъекции ДНК. Вышеуказанные патенты включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10. Способ лечения

Также в настоящем документе предложен способ лечения, защиты и/или предотвращения заболевания у субъекта, который в этом нуждается, посредством выработки у субъекта синтетического антитела. Способ может включать введение композиции субъекту. Введение композиции субъекту может осуществляться с применением вышеописанного способа доставки.

При выработке синтетического антитела в организме субъекта синтетическое антитело может связываться или реагировать с антигеном. Такое связывание может нейтрализовать антиген, блокировать распознавание антигена другой молекулой, например, белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на антиген, тем самым обеспечивая лечение, защиту и/или предотвращение ассоциированного с антигеном заболевания у субъекта.

Доза композиции может составлять от 1 мкг до 10 мг активного компонента/кг массы тела/время, и может составлять от 20 мкг до 10 мг компонента/кг массы тела/время. Композиция может быть введена 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. Количество доз композиции для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В одном способе лечения синтетические антитела или их функциональные фрагменты, могут быть введены субъекту, который нуждается в лечении против инфекции, либо вирусной, либо бактериальной, или против раковых клеток. Введение синтетических антител, описанных в настоящем документе, при экспрессии *in vivo* может обеспечить образование функциональных антител, которые могут быстро появиться в организме в очаге поражения и обеспечить реакцию нейтрализации мишени (для связывания и нейтрализации которой оно было сконструировано). Это быстрое появление может быть важным с точки зрения патологического развития заболевания, которое происходит довольно быстро, и/или для индивидумов, у которых не формируется иммунологическая память. Некоторыми особыми случаями, в которых быстрая нейтрализация играет решающую роль для здоровья инфицированного субъекта, являются тропические болезни, такие как денге, чикунгунья и Эбола. Такие инфекции требуют быстрой нейтрализации, начиная с момента времени инфицирования вирусом. в примере 5 и на фиг. 6А и 6В показана быстрая выработка антител с использованием экспрессирующих конструкций, созданных с помощью описанных способов. На фиг. 6А проиллюстрировано, что антитело экспрессируется со дня введения конструкций плазмидной ДНК; тогда как на фиг. 6В введение белка/антигена приводит к экспрессии антитела через около 8 суток.

Этот способ лечения можно использовать отдельно или комбинировать с обычными вакцинациями антигеном, которые затем приведут к выработке иммунного ответа против мишени в организме субъекта-хозяина. Комбинированная вакцина обладает преимуществом двухфазного иммунного ответа против предполагаемой мишени: 1) первый быстрый ответ, который обеспечивается нуклеотидными последовательностями, кодирующими синтетические антитела и их функциональные фрагменты, и 2) второй иммунный ответ хозяина, запускаемый традиционной вакциной (которая может включать ДНК-вакцину или синтетический иммуноген), которая имеет лаг-период, что длится до тех пор, пока в организме хозяина не сформируется иммунный ответ против мишени.

Настоящее изобретение имеет множество аспектов, проиллюстрированных следующими примерами, не ограничивающими объема настоящего изобретения.

11. Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах. Надо понимать, что хотя эти Примеры и обозначают предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, они приводятся только в иллюстративных целях. Исходя из вышеизложенного обсуждения и этих Примеров, специалист в данной области техники сможет установить существенные признаки настоящего изобретения и в пределах сущности изобретения сможет внести различные изменения и модификации по настоящему изобретению для адаптации различных применений и условий. Следовательно, различные модификации по настоящему изобретению в дополнение к тем, что проиллюстрированы и описаны в настоящем документе, будут понятны специалистам в данной области техники, исходя из предшествующего описания. Такие модификации также предназначены для внесения в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1.

Была сконструирована высокоэффективная система экспрессии для выработки *in vivo* иммуноглобулина (Ig). В частности, последовательности тяжелой и легкой цепей Ig были модифицированы для того, чтобы улучшить экспрессию *in vivo* полностью собранной молекулы Ig, которая содержала 2 полипептида тяжелой и 2 полипептида легкой цепей. Были созданы конструкции молекул тяжелой и легкой цепей gp120IgG и встроены раздельно в вектор pVax1 (Life Technologies, Carlsbad, CA). Это антитело обладает определенными свойствами, которые позволили его использовать для исследования характери-

стик препарата, как описано ниже. Для оптимизации экспрессии Ig *in vivo* были внесены несколько модификаций при создании этих конструкций. Оптимизация включала оптимизацию кодонов и введение последовательности Козак (GCC ACC). Последовательности нуклеиновой кислоты оптимизированных конструкций для тяжелой и легкой цепей Ig изложены в SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, соответственно (фиг. 1 и 2, соответственно). На фиг. 1 и 2 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования конструкций в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 6 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в Набор данных 22 элементов NO:46, т.е. аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG (фиг. 42). SEQ ID NO: 7 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 47, т.е. аминокислотную последовательность легкой цепи IgG (фиг. 43).

Клетки трансфицировали либо с использованием естественных конструкций Ig (т.е. неоптимизированные), либо конструкций, содержащих SEQ ID NO: 6 и 7 (т.е. оптимизированных). После трансфекции в трансфицированных клетках измеряли уровень секреции IgG, а кинетика синтеза IgG проиллюстрирована на фиг. 3. Как проиллюстрировано на фиг. 3, и неоптимизированные, и оптимизированные конструкции обеспечивали экспрессию тяжелой и легкой цепей Ig с образованием IgG, но оптимизированные конструкции приводили к более быстрому накоплению антитела IgG. Клетки, трансфицированные с использованием плазмиды, содержащей SEQ ID NO: 6 и 7 (т.е. оптимизированные последовательности Ig) показали больший уровень образования полностью собранных молекул Ig, чем клетки, трансфицированные с использованием плазмиды, содержащей неоптимизированные последовательности Ig. В соответствии с этим, оптимизация или модификация конструкций существенно увеличивала экспрессию Ig. Другими словами, конструкции, содержащие SEQ ID NO: 6 и 7, обеспечивали существенно более высокий уровень экспрессии Ig по сравнению с естественными конструкциями вследствие оптимизации или модификации, использованных для создания SEQ ID NO: 6 и 7. Эти данные также продемонстрировали, что тяжелая и легкая цепи Ig могут быть собраны *in vivo* на основе плазмидной системы.

Для дополнительного изучения конструкций, содержащих SEQ ID NO: 6 и 7, мышам вводили плазмиду, содержащую последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 6 и 7. В частности, плазмиду вводили с использованием электропорации. После введения у иммунизированных мышей с помощью Вестерн-блота оценивали индукцию иммунного ответа (т.е. уровень IgG), сыворотку мышей использовали для детекции антигена gp120). Как проиллюстрировано на фиг. 4, введение мышам плазмиды, содержащей SEQ ID NO: 6 и 7, приводило к значительному образованию антител, вследствие чего связывание антитела наблюдалось при проведении Вестерн-блот анализа. Было достаточно всего лишь одного введения для наблюдения такого уровня образования антител.

Подводя итог вышесказанному, эти данные свидетельствовали о том, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи Ig, при включении в состав экспрессирующего вектора, такого как pVax1, приводили к экспрессии собранного IgG (т.е. тяжелые и легкие цепи объединяются с образованием антитела, которое связывается с этим антигеном) в трансфицированных клетках и после введения экспрессирующего вектора мышам. Кроме того, эти данные свидетельствовали о том, что оптимизация или модификация последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих тяжелые и легкие цепи Ig, существенно увеличивала образование Ig.

Пример 2.

Материалы и способы для примеров 3-7.

Клетки и реактивы. Клетки 293T и TZM-B1 поддерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Gibco-Invitrogen, CA), дополненной 10% фетальной крупного рогатого скота (FBS) и антибиотиками, и пассировали до достижения конfluентности. Рекомбинантные белки HIV-1 p24 и gp120 Env (rgp120) приобретали у Protein Science Inc., а конъюгированный с пероксидазой стрептавидин - у Jackson Laboratory. Клеточные линии и другие перечисленные реактивы получали по Программе по исследовательским и эталонным реактивам в области борьбы со СПИД (AIDS Research and Reference Reagent Program), Отделение СПИД (Division of AIDS), Национальный институт по изучению аллергических и инфекционных заболеваний (NIAID), Национальные институты здравоохранения (NIH).

Животные и белок, а также введение и доставка плазмиды. Самки мышей BALB/c (8-недельного возраста) были приобретены у Taconic Farms (Germantown, NY).

Для целей введения 25 мкг плазмидной ДНК в объеме 50 мкл (pVax1 или pHIV-1Env-Fab) вводили внутримышечно (IM) путем инъекции с последующим улучшением доставки, опосредованной EP, с применением системы MID-EP (CELECTRA®; Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). Были использованы следующие параметры импульсов для доставки: 3 импульса постоянного тока амплитудой 0,5 А с интервалом 1 секунда и продолжительностью 52 мс. Каждому животному вводили однократно либо исследуемые, либо контрольные препараты плазмид. Для анализа иммунизации белком использовали рекомбинантный gp120 (rgp120) ВИЧ-1 из штамма JRFL (приобретенный у Immune Technology Corp, NY). В исследовании иммунизации белком однократную 25 мкг дозу rgp120 смешивали с адьювантом Titer-Max и вводили подкожно путем инъекции. В зависимости от конкретного анализа получали сыворотки мышей, которым вводили pHIV-1 Env Fab или rgp120 через разные интервалы времени.

Конструирование плазмидной ДНК Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1. Последовательности Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (VH и VL) из мАт VRC01 человека, специфичного к белку оболочки, были созданы с использованием синтетических олигонуклеотидов с несколькими модификациями. Тяжелая цепь (VH-CH1) кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 3, и легкая цепь (VL-CL) кодируется последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 4 (фиг. 9 и 10 соответственно). На фиг. 9 и 10 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов HindIII (AAG CTT) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 3 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 48, т.е. аминокислотную последовательность VH-CH1 Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (фиг. 44). SEQ ID NO: 4 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 49, т.е. аминокислотную последовательность VL-CL Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (фиг. 45).

Для того чтобы улучшить экспрессию, в последовательности гена антигена Env встроили обладающую эффективными свойствами лидерную последовательность IgE (нуклеотид SED ID NO: 65, кодирующий белок SEQ ID NO: 66). Полученные в результате модифицированные и улучшенные ДНК-иммуногены Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, подвергали кодон- и РНК-оптимизации с последующим клонированием в экспрессирующий вектор pVax1 с помощью GenScript (Piscataway, NJ), с последующим получением этих конструкций в большом объеме. Гены VH и VL (SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно) встраивали между сайтами рестрикции BamHI и XhoI. Затем получали препарат очищенной плазмидной ДНК в воде для последующего введения мышам. В качестве плазмиды отрицательного контроля использовали pIgG-E1M2, которая приводит к образованию "неподходящего"/контрольного Ig.

Экспрессия Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, и иммуоблот-анализ. Клеточную линию 293T применили для анализа экспрессии генов с использованием нелипосомного реагента FuGENE6 для трансфекции (Promega, WI), с помощью методов в соответствии с рекомендацией изготовителя. Вкратце, производили посев клеток при 50-70% конfluентности ($1-3 \times 10^5$ клеток/2 мл на лунку в 35 мм чашке для культивирования) за 24 часа до последующей трансфекции с использованием 5 мкг контрольного pVax1 или pHIV-1 Env-Fab. Супернатанты собирали через различные интервалы времени вплоть до 70 часов и оценивали в них уровни специфических молекул Fab с помощью стандартных методов ИФА. Супернатанты из клеток, трансфицированных pVax1, использовали в качестве отрицательного контроля. В дополнение к этому, клетки 293T трансфицировали с использованием гена для белка оболочки ВИЧ gp160.

Дальнейшее подтверждение распознавания естественного белка оболочки ВИЧ-1 образовавшимся Fab осуществляли с помощью иммуоблот-анализа. Для проведения этого исследования вышеописанный grp120 подвергали электрофорезу на 12% SDS-PAGE. Гель переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Millipore, Bedford, MA) и блокировали 5%-ным масса/объем обезжиренным сухим молоком в ФСБ-Т (0,05%). Нитроцеллюлозную мембрану затем в последствии нарезали на отдельные полоски для анализа. Для проведения реакции на нитроцеллюлозные отдельные полоски наносили сыворотки мышей, которым вводили pHIV-1 Env Fab, собранные через 48 часов после введения, разводили 1:100 в ФСБ и инкубировали в течение 1 часа. Впоследствии полоски промывали 4 раза с применением Трис-буференного солевого раствора-0,2% Tween, наносили иммунную сыворотку для реакции, содержащую антитела к мышинному IgG, конъюгированные с пероксидазой (Jackson Laboratories, ME), и инкубировали с диаминобензидиновым субстратом (Sigma, St. Louis, MO), обеспечивая визуализацию соответствующего связывания образовавшегося Fab оболочки ВИЧ-1 с grp120.

Анализ связывания Ig - ИФА. С помощью ИФА оценивали подтверждение связывания Fab, образовавшегося с помощью ДНК-плазмиды, или антитела к grp120 с grp120. Анализы связывания Ig проводили с использованием сывороток отдельных животных, которым вводили либо pHIV-1 Env Fab, pVax1, либо белок grp120. И в этих основных иммуноанализах с использованием Ig образцы сыворотки собирали через 48 часов после однократного введения ДНК-плазмиды. Вкратце, 96-луночные полистирольные планшеты, обеспечивающие высокую степень связывания (Corning, NY), покрывали на протяжении ночи при 4°C grp120 MN ВИЧ клады В (2 мкг/мл), разведенного в ФСБ. На следующий день планшеты промывали с использованием ФСБ-Т (ФСБ, 0,05% Tween 20), блокировали в течение 1 часа с использованием 3% БСА в ФСБ-Т и инкубировали с использованием разведенной 1:100 сыворотки иммунизированных и интактных мышей в течение 1 часа при 37°C. Связавшийся IgG определяли с использованием козьих антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Research Diagnostics, NJ) в разведении 1:5000. Связавшийся фермент определяли путем добавления раствора хромогенного субстрата ТМВ (R&D Systems), и поглощение определяли спектрофотометрически при 450 нм на планшетном анализаторе Biotek EL312e Bio-Kinetics. Все образцы сыворотки тестировали в двух повторностях. Осуществляли дополнительный иммуноанализ, который позволил количественно определить концентрации Fab в сыворотках мышей, которым вводили pHIV-1 Env Fab, с использованием коммерческого ИФА-набора для количественного определения IgG1. Анализ осуществляли согласно спецификациям изготовителя.

Проточная цитометрия (FACS). Для проточной цитометрии (FACS) клетки 293T трансфицировали

либо с использованием плазмиды с консенсусной последовательностью, кодирующей белок оболочки с клады А (pCon-Env-A), либо плазмиды с оптимизированной последовательностью клады А (pOpt-Env-A), экспрессирующей белок оболочки первичного вирусного изолята (Q23Env17). Трансфекцию осуществляли по стандартным методам. После подтверждения трансфекции клетки промывали с использованием охлажденного на льду буфера А (ФСБ/0,1% БСА/0,01% NaN₃) и инкубировали в течение 20 минут при 4°C с первичным Ig в разведении 1:100 (либо очищенный VRC01, либо сыворотки мышей, которым вводили либо pHIV-1 Env Fab, либо контрольную плазмиду pIgG-E1M2, собранные через 48 часов после введения плазмиды). За этим следовала отмывка и инкубация в течение следующих 20 минут с 50 мкл разведенных 1:100 флуоресцентно-меченных вторичных Ig, конъюгированных с фикоэритрином (PE). Затем клетки промывали и сразу же анализировали на проточном цитометре (Becton Dickinson FACS). Все инкубации и промывки осуществляли при 4°C с применением охлажденного на льду буфера А. Проводили гейтинг клеток по одиночным и живым клеткам. Оценку экспрессии GFP для GFP-положительных клеток осуществляли с помощью прибора FACS-LSR с применением программного обеспечения CellQuest (BD Bioscience). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Flow Jo.

Анализ нейтрализации ВИЧ-1 с одним циклом инфицирования. Нейтрализацию ВИЧ-1, опосредованную Fab, определяли в анализе, основанном на использовании TZM-BI (полученных из клеток HeLa), в котором снижение экспрессии люциферазного гена применяется в качестве конечной точки нейтрализации после одного цикла инфицирования Env-псевдотипированным вирусом в присутствии или в отсутствие исследуемых или контрольных сывороток. Клетки TZM-BI были получены методами генной инженерии с возможностью экспрессии CD4 и CCR5 и содержали репортерные гены для люциферазы светлячка. В этом анализе сыворотки мышей, которым вводили только pVax1 или pHIV-1 Env Fab разводили 1:50 в лунках с последующим добавлением псевдотипированных Ba126, Q23Env17, SF162S ВИЧ-1 или внеклеточного вируса ZM53M с множественностью заражения 0,01. И Ba126, и SF162S относятся к вирусам tier 1 клады В, причем этот статус tier свидетельствует о том, что вирусы обладали высокой чувствительностью или выше средней. Q23Env17 и ZM53M относятся к вирусам клады А, Tier 1 и клады С, Tier 2, соответственно. Статус Tier 2 свидетельствовал о том, что вирус обладает средней или умеренной чувствительностью к нейтрализации. Впоследствии в этом анализе в каждую лунку добавляли 10⁴ клеток TZM-BI, инкубировали в течение 48 часов, подвергали лизису, и затем добавляли 100 мкл субстрата Bright-Glo (Luciferase Assay System, Promega, WI), с последующим количественным определением люциферазной активности с использованием люцинометра. Показания индикатора люцинометра в этом анализе представлены в ОСЕ (относительные световые единицы). Снижение ОСЕ в процентах рассчитывали как $(1 - (\text{среднее значение ОСЕ для экспериментальных образцов} / \text{среднее значение для контрольных образцов})) \times 100$. Нейтрализацию ВИЧ-1 затем выражали как процентное уменьшение ОСЕ, что свидетельствовало об уровне подавления инфекции в процентах.

Пример 3.

Создание конструкций, экспрессирующих Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1 кДНК для последовательностей, кодирующих и цепь VH, и VL-Ig (иммуноглобулина) для нейтрализующего мАт VRC01 человека широкого спектра действия к белку оболочки ВИЧ-1 получали из Центра Исследования Вакцин VRC (Vaccine Research Center, NTH) по "Программе по исследовательским и эталонным реактивам в области борьбы со СПИД" (AIDS Research and Reference Reagent Program) Национальных институтов здравоохранения (NIH) и впоследствии клонировали в вектор pVax1. В экспрессирующие векторы вносили несколько модификаций, которые указаны выше в примере 2, для того, чтобы максимально увеличить и оптимизировать выработку биологически активных молекул Ig. Конкретно, эти модификации включали кодон- и РНК-оптимизацию и стабилизацию, повышенное содержание лидерной последовательности, получение плазмид в высоких концентрациях и облегченную доставку плазмид *in vivo* посредством EP. Образовавшиеся конструкции помещали под контроль предраннего промотора цитомегаловируса (ЦМВ) человека, который представляет важность для надлежащей и эффективной экспрессии в клетках и тканях млекопитающих. Схематические карты конструкции, использованной в этом исследовании, представлены на фиг. 5 А и 5В.

В дополнение к этому, Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, получили из pHIV-Env-Fab и использовали для окрашивания клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей белок оболочки ВИЧ. pVax1 использовали в качестве контроля. Как проиллюстрировано на фиг. 11, иммунофлуоресцентное окрашивание продемонстрировало, что вектор pHIV-Env-Fab обеспечил возможность получения Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, поскольку Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1 окрашивал клетки, трансфицированные плазмидой, кодирующей белок оболочки ВИЧ. В соответствии с этим, Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, специфически связывался с гликопротеином оболочки ВИЧ.

Пример 4.

Образование Ig трансфицированными клетками.

Для оценки экспрессии рНIV-1 Env-Fab, конструкции трансфицировали в клетки 293Т. ИФА-анализ с использованием белка gp120 с консенсусной последовательностью ВИЧ-1 клады В подтвердил присутствие Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, в супернатанте трансфицированных клеток 293 Т, уже через 24 часа после трансфекции (фиг. 5С). В клеточных экстрактах были обнаружены высокие значения ОП при 450 нм (т.е. в диапазоне около от 0,5 до 0,8) через 24-72 часа после трансфекции, и впоследствии они достигали пика и плато через 48 часов. Эти результаты подтвердили специфичность Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, по отношению к гликопротеину белка оболочки ВИЧ. Статистический анализ данных, представленных на фиг. 5С, заключался в следующем: значения ОП при 450 нм для сывороток мышей, которым вводили рНIV-1 Env-Fab, статистически значимо ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента) отличались от контроля рVax1, начиная с 22 часов включительно до временной точки 72 часа.

Пример 5.

Характеристика Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, In Vivo.

Чтобы продемонстрировать образование Fab in vivo с помощью ДНК-плазмид, мышам вводили рНIV-1 Env Fab посредством внутримышечного пути введения с последующей усиленной доставкой с помощью EP. Производили однократную инъекцию ДНК-плазмид, и получали сыворотки через 12 часов и через 1, 2, 3,47 и 10 суток после введения. В сыворотках (в разведении 1:100) затем в впоследствии оценивали уровни Ig/Fab с помощью ИФА-анализа, как проиллюстрировано на фиг. 6А. Данные на фиг. 6А представлены (для отдельных мышей и в группе рVax1, и HIV-1 Env-Fab) в виде ОП при 450 нм, которая была пропорциональной уровню Ig/Fab. Эти данные продемонстрировали, что относительные уровни Fab после однократного введения рНIV-1 Env-Fab поддаются обнаружению на 1-е сутки и впоследствии с течением времени увеличиваются. Для целей сравнения осуществляли однократное введение / иммунизацию ggp120, как описано выше в примере 2, мышам Balb/C с последующим получением сывороток и анализом (при разведении 1:100) в динамике с помощью ИФА, для того чтобы определить степень и продолжительность существования уровней специфических антител к gp120. На фиг. 6В проиллюстрированы результаты.

В этом исследовании доставки белка уровни антиген-специфического Ig выше фона можно было обнаружить только через 10 суток после иммунизации. Эта ситуация отличалась от ситуации с уровнями Fab, образование которых было вызвано введением рНIV-1 Env Fab (фиг. 6А), где значения ОП при 450 нм достигали по меньшей мере 0,1 единицы ОП при 450 нм к 1 суткам после введения и выходили на плато на 10 суток на уровне от 0,28 до 0,35 единиц ОП. Таким образом, доставка рНIV-1 Env Fab приводила к более быстрой выработке специфического Fab, чем традиционная иммунизация белком. Этот результат подчеркнул потенциальное клиническое применение этого способа доставки плазмидной ДНК для выработки биологически активного Ig.

Осуществляли дополнительные анализы для обеспечения качества, а также количества рекомбинантного Fab, полученного с помощью технологии доставки ДНК. Конкретно, проводили иммуноблот-анализ с применением рекомбинантного белка gp120 ВИЧ-1, который подвергали электрофорезу и блоттингу, и исследовали с использованием сывороток мышей через 48 часов после введения мышам рНIV-1 Env-Fab (фиг. 6С). Блот, на котором проиллюстрировано пятно, соответствующее молекулярной массе белка gp120, подтверждая, что он сохранил функциональные свойства и был способен связываться с gp120. Аналогичным образом с помощью ИФА проводили количественное определение Fab человека и представляли в виде временной зависимости (т.е. сутки) после введения плазмиды (фиг. 6D). Результаты свидетельствуют о том, что уровни образовавшегося Fab, достигали пика при 2-3 мкг/мл. Эти результаты продемонстрировали правильность сборки полипептидов VH- и VL-цепей Fab, образовавшегося на основе VRC01, а также способность распознавать и специфически связываться с белком оболочки ВИЧ-1.

Статистические анализы данных, представленных на фиг. 6, заключаются в следующем. Что касается итоговых данных, представленных на фиг. 6А, значения ОП при 450 нм для сывороток мышей, которым вводили рНIV-1 Env-Fab, статистически значимо ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента) превышали значения, характерные для сывороток мышей, которым вводили рVax1, начиная с 1-х суток, включительно до временной точки измерений 10 суток. Что касается итоговых данных, представленных на фиг. 6В, значения ОП при 450 нм для группы ggp120 статистически значимо ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента) превышали контрольные значения для ФСБ, начиная с 10-х суток включительно до временной точки измерений 14 суток. Что касается итоговых данных, представленных на фиг. 6D, значения ОП при 450 нм для мышей, которым вводили рНIV-1 Env-Fab, статистически значимо превышали контрольные значения ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента), начиная со 2-х суток включительно до временной точки измерений 10 суток.

Пример 6.

Связывание Fab/Ig с клетками, экспрессирующими разные белки оболочки ВИЧ-1: анализ на основе FACS.

Сыворотки мышей, которым вводили рНIV-1 Env-Fab, также использовали для исследования связывания образовавшегося Fab с разными белками оболочки ВИЧ, транзитивно экспрессированными клетками 293Т. Естественная форма мАт VRC01 была использована в качестве положительного контроля для обеспечения надлежащей экспрессии и обнаружения белков оболочки на поверхности клеток. Как было

указано ранее, "неподходящий/неродственный" Ig (Ig-E1M2) использовали в качестве отрицательного контроля. Как продемонстрировано на фиг. 7А и 7В, по существу, было отмечено только фоновое окрашивание с помощью разных Ig/Fab клеток, трансфицированных рVax1 (т.е. без вставки Env). Однако и в случае очищенного мАт VRC01, и сывороток мышей, которым вводили рHIV-1Env-Fab, было получено значительное положительное окрашивание трансфицированных клеток, экспрессирующих либо консенсусную последовательность плазмиды, кодирующую белок оболочки клады А (рCon-Env-A), либо оптимизированную последовательность плазмиды, кодирующую белок оболочки клады С (рOpt-Env-A), экспрессирующей белок оболочки первичного изолята ВИЧ-1 рQ23Env17. Более того, сыворотки мышей, которым вводили рIg-E1M2, не обеспечивали окрашивание никаких клеток, трансфицированных белком оболочки ВИЧ-1, выше фонового уровня. Результаты FACS-анализа приведены на фиг. 7А. Типичный график, на котором проиллюстрированы данные FACS-анализа (т.е. фиг. 7А) для этого эксперимента, приведен на фиг. 7В.

Статистические анализы данных, представленных на фиг. 7В, заключаются в следующем. Не было выявлено статистически значимой разницы ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента) в специфичности связывания с гликопротеином оболочки, полученным с использованием рCon-Env-A, между естественным антителом VRC01 и сыворотками мышей, которым вводили рHIV-1 Env-Fab. Однако уровень связывания антитела VRC01 с гликопротеином оболочки, полученным с использованием рOpt-Env-A, был значительно более высоким ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента), чем уровень связывания сывороткой мышей, которым вводили рHIV-1 Env-Fab.

Пример 7.

Нейтрализующая активность Ig, полученного с помощью рHIV-1 Env Fab, на ВИЧ.

Сыворотки мышей, которым вводили рHIV-1Env-Fab, использовали для исследования связывания Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ, с белками оболочки ВИЧ-1, экспрессированными в транзитивно трансфицированных клетках 293Т. Были получены сыворотки мышей через 6 суток после введения рHIV-1Env-Fab. Конкретно, клетки трансфицировали плазмидой, в результате экспрессии которой образовался белок оболочки штамма ВИЧ-1 из Клады А, В или С. Были использованы штаммы 92RW020, SF162 и ZM197 из клады А, В и С. Как проиллюстрировано на фиг. 12, сыворотки мышей, которым вводили рHIV-1Env-Fab, связывали белок оболочки штаммов ВИЧ-1 из клады А, В и С, тем самым свидетельствуя о том, что сыворотки содержали антитело (т.е. Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ), которое характеризовалось перекрестной реактивностью с белком оболочки множества подтипов ВИЧ-1.

Для того чтобы оценить в этом исследовании потенциальную нейтрализующую активность по отношению к ВИЧ-1 Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ, проводили анализ нейтрализации, основанный на измерении люминесценции, с применением клеток-мишеней TZM-B1. Клетки-мишени TZM-B1 инфицировали с применением 4 разных псевдотипированных вирусных изолятов в отсутствие или в присутствии исследуемых и контрольных сывороток, как описано в примере 2 выше.

На фиг. 8 проиллюстрированы кривые нейтрализации для сывороток мышей, которым вводили рHIV-1 Env Fab, против псевдотипированных вирусов ВИЧ. Специально тестировали вирусы Ba126 и SF162S, относящиеся к tier 1 ВИЧ-1 (оба из клады В), а также Q23Env (клада А). В дополнение к этому, сыворотки также тестировали против вируса ZM53M, относящегося к tier 2, кладе С ВИЧ-1. Данные представлены как процент нейтрализации/подавления ВИЧ-инфекции. Штрихованные горизонтальные линии на графиках обозначали уровень нейтрализации/подавления на 50% в данном анализе. Нейтрализующее мАт положительного контроля (данные не показаны) было использовано в данном исследовании для подтверждения практичности и валидности данного метода исследования. Вкратце, нейтрализующее мАт положительного контроля было способно подавлять инфекцию, вызванную вирусами всех четырех псевдотипов, по меньшей мере на 50%.

Было продемонстрировано в динамике увеличение нейтрализующего действия на ВИЧ сывороток мышей, которым вводили рHIV-1 Env Fab, после введения плазмид, причем процент нейтрализации достиг 50% ко 2-м суткам для Ba125, Q23Env17 и SF162S. Точно так же, как и плато, процент нейтрализации для этих трех вирусов составлял около 62, 60 и 70%, соответственно. В случае ZM53M до 3 суток не был достигнут 50% порог нейтрализации, и плато нейтрализации не превышало 50%. Этот менее эффективный профиль нейтрализации по сравнению с 3 другими исследованными вирусами, по-видимому, отражал тот факт, что данный вирус относился к Tier 2, подгруппе вирусов, которые в меньшей степени поддаются нейтрализации. В целом, Fab, полученный в настоящем исследовании, обеспечивал эффективную нейтрализацию целого ряда изолятов ВИЧ. Статистические анализы данных, представленных на фиг. 8, заключаются в следующем. На основе непараметрического критерия Краскела-Уоллиса только уровни нейтрализации ВИЧ для вируса ZM53M Клады С (фиг. 8D), индуцированные сывороткой мышей, которым вводили рHIV-1 Env-Fab, достоверно отличались от других исследованных вирусов (фиг. 8А, 8В и 8С). Отмечалась разница по времени (сутки), необходимым для достижения 50% нейтрализации, а также по максимальной достижимой уровню нейтрализации.

Обобщая примеры 3-7, концентрация Fab VRC01 в сыворотке мышей, которым вводили рHIV-1 Env Fab, достигала пика при 2-3 мкг/мл на 12-е сутки после инъекции. Этот диапазон можно было сравнить с

рядом моноклональных антител, разрешенных в настоящее время к применению FDA, что свидетельствует о том, что данный подход к применению антител обеспечил получение значительных и биологически релевантных уровней антител в этой модели на небольших животных. В частности, Устекинумаб (коммерческое название: Стелара) и Голимумаб (Симпони), два антитела, показанные для применения против аутоиммунных заболеваний, таких как бляшковидный псориаз и артрит, имеют средние \pm SD концентрации $0,31 \pm 0,33$ мкг/мл и $1,8 \pm 1,1$ мкг/мл соответственно. Кроме того, ингибитор ФНО Адалиму-маб (Хумира) имеет среднюю приблизительную концентрацию в сыворотке крови около 6 мкг/мл. В этой связи, данные, описанные в Примерах 4-8, продемонстрировали, что доставка ДНК, кодирующей антитело, в организм, приводила к сборке *in vivo*, так что в организме были обнаружены значительные и биологически релевантные уровни антитела.

Эти данные также продемонстрировали возможность более быстрого образования Fab *in vivo* после однократного введения рНIV-1Env Fab, усиленного EP, по сравнению с Ig, которые образуются вследствие общепринятого введения белка (фиг. 6A и 6B). В дополнение к этому, была рассмотрена возможность выработки функциональных защитных Ig-подобных молекул против сложных мишеней вакцины. До настоящего времени индукция образования нейтрализующих антител к ВИЧ-1 после активной вакцинации была невероятно трудной, и на протяжении развития первичной инфекции антитела не вырабатываются спустя годы после передачи. При этом подходе на основе применения ДНК-плазмид титры нейтрализующих антител были отмечены через 1-2 суток после доставки, причем пиковые концентрации нейтрализующих Fab в сыворотке крови ($3,31 \pm 0,13$ мкг/мл) были обнаружены через одну неделю после введения (фиг. 6D). Этот уровень Ig был относительно сходным с концентрацией 8,3 мкг/мл, которая, как было продемонстрировано, обеспечивала полную защиту от инфекции в текущем исследовании. Эти данные продемонстрировали быструю индукцию образования биологически активных фрагментов Ig.

В этих данных также показан титр нейтрализующих антител и ответы на первичные изоляты ВИЧ-1, которые были вызваны введением ДНК, кодирующей Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1. Действие сывороток испытывали на панели разных вирусных изолятов tier 1 и 2, которые представляют примеры из клад A, B и C.

Результаты свидетельствовали о выработке активных нейтрализующих антител против этих вирусов (фиг. 8).

В соответствии с этим, способ, основанный на использовании ДНК-плазмид, обеспечил получение специфических и биологически активных Fab или молекул Ig *in vivo*, минуя необходимость в применении общепринятой вакцинации на основе антигенов для выработки антител, и избавляясь от необходимости в создании и очистке Ig, полученных *in vitro*.

Пример 8.

Конструирование плазмиды, кодирующей антитело Ig человека.

Как описано выше, из антитела VRC01 был получен Fab, а именно Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ, который вырабатывался *in vivo* при введении субъекту кодирующей нуклеиновой кислоты. Чтобы дополнительно расширить эти исследования была создана последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодировала антитело IgG1, полученное из антитела VRC01. Как проиллюстрировано на схеме на фиг. 13, эта последовательность нуклеиновой кислоты кодировала тяжелую и легкую цепи IgG, разделенные сайтом расщепления фурином и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательностью пептида P2A. Последовательность пептида P2A повышала эффективность расщепления протеазой, тем самым обеспечивая образование отдельных полипептидов после расщепления.

Тяжелая цепь IgG содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), константную область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирную область, константную область 2 (CH2) тяжелой цепи и константную область 3 (CH3) тяжелой цепи. Легкая цепь IgG содержала вариабельную (VL) и константную (CL) области. Эту конструкцию помещали под контроль цитомегаловирусного (ЦМВ) промотора, например, в экспрессирующий вектор pVax1. Эта конструкция обеспечивала образование антитела IgG в полностью собранном виде (как проиллюстрировано на фиг. 14), которое взаимодействовало с gp120 (т.е. антигеном, распознаваемым антителом VRC01). Этот IgG в полностью собранном виде в данном документе называется IgG VRC01. Аминокислотная последовательность IgG VRC01 (до расщепления фурином) проиллюстрирована на фиг. 15 и изложена в SEQ ID NO: 5, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей набор данных 22 элементов NO:64 (см. фиг. 62).

В частности, аминокислотная последовательность IgG VRC01 (до расщепления фурином; SEQ ID NO: 5 и фиг. 15), которая кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 64) имеет следующую структуру: сигнальный пептид иммуноглобулина E1 (IgE1), вариабельная область тяжелой цепи (VH), константная область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирная область, константная область 2 (CH2) тяжелой цепи, константная область 3 (CH3), сайт расщепления фурином, линкер GSG, пептид P2A, сигнальный пептид IgE1, вариабельная область легкой цепи (VL) и константная область легкой цепи (CL, конкретно, каппа). Последовательность каждой части структуры (все они содержатся в пределах SEQ ID NO: 15 в порядке, который описан выше и проиллюстрирован на фиг. 13) приведена ниже.

Сигнальный пептид IgE1 антитела IgG VRC-1 - MDWTWILFLVAAATRVHS (Набор данных 22

элементов NO: 8).

Вариабельная область тяжелой цепи IgG VRC01-

QVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGGA
VNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGNCDYNWDFEHWGR
GTPVIVSSPSTKG (SEQ ID NO:9).

Константная область 1 (CH1) тяжелой цепи IgG VRC01-

PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSC (SEQ ID NO:10).

Шарнирная область IgG VRC01 EPKSCDKT HTCPPCP (Набор данных 22 элементов NO: 11).

Константная область 2 (CH2) тяжелой цепи IgG VRC01-

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID
NO:12).

Константная область 3 (CH3) тяжелой цепи IgG VRC01-

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:13).

Сайт расщепления фурином VRC01 IgG - RGRKRRS (SEQ ID NO: 14).

IgG VRC01 Линкер GSG и пептид P2A IgG VRC01

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:15).

Сигнальный пептид IgE1 антитела IgG VRC01-

MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO:8).

Вариабельная область легкой цепи (VL) Ig VRC01-

EIVLTQSPGTLSPGETAISCRTSQYGS LAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSG
SRWGPDYNTISNLESGDFGVYYCQYEFFGQGTKVQVDIKR (SEQ ID NO:16).

Константная область легкой цепи (CL, каппа) Ig VRC01-

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17).

Пример 9.

IgG VRC01, специфичный к ВИЧ-1, кодируемый двумя плазмидами.

Как описано выше в примерах 2-8, из антитела VRC01 был получен Fab (каждая цепь образуется в результате экспрессии отдельной плазмиды), а именно Fab, специфичный к белку оболочки ВИЧ, и из антитела VRC01 был получен IgG (образуется в результате экспрессии одной плазмиды), а именно IgG VRC01. Чтобы дополнительно расширить эти исследования из антитела VRC01 был получен IgG, в котором тяжелая цепь (т.е. вариабельная область тяжелой цепи (VH), константная область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирная область, константная область 2 (CH2) тяжелой цепи и константная область 3 (CH3), и легкая цепь (т.е. вариабельная область легкой цепи (VL) и константная область легкой цепи (CL)) кодировались отдельными конструкциями (фиг. 50 и 51). Этот IgG в данном документе называется IgG VRC01, специфичный к ВИЧ-1.

В состав каждой конструкции также была включена лидерная последовательность для оптимизации секреции антитела, сразу после того как оно вырабатывается *in vivo*. Каждую конструкцию клонировали в сайты BamHI и XhoI вектора pVax1, тем самым помещая конструкцию под контроль цитомегаловирусного (ЦМВ) промотора (фиг. 50 и 51). В соответствии с этим, для образования или выработки IgG VRC01 *in vivo* субъекту необходимо вводить смесь плазмид, а именно плазмиду, содержащую конструкцию, кодирующую тяжелую цепь, и плазмиду, содержащую конструкцию, кодирующую легкую цепь.

В дополнение к этому, каждая конструкция подвергалась дополнительной оптимизации. Оптимизация включала присоединение последовательности Козак (GCC ACC) и оптимизацию кодонов. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь IgG1 в составе IgG VRC01, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1, изложена в SEQ ID NO: 54 и на фиг. 52. На фиг. 52 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестриционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), примененные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 54 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 55 и на фиг. 53, т.е. аминокислотную последовательность тяжелой цепи IgG1 антитела VRC01, специфичного к ВИЧ-1.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь IgG антитела VRC01, специфичного к ВИЧ-1, изложена в SEQ ID NO: 56 и на фиг. 54. На фиг. 54 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 56 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 57 и на фиг. 55, т.е. аминокислотную последовательность легкой цепи IgG VRC01, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1.

Пример 10.

Ig PG9, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1.

В дополнение к IgG VRC01 была создана другая конструкция, которая кодировала IgG, который взаимодействовал с белком оболочки ВИЧ-1. Эта конструкция представляла собой антитело PG9, специфичное к белку оболочки ВИЧ-1, которая была оптимизирована и клонирована в экспрессирующий вектор (фиг. 16А и 16В). Оптимизация включала введение последовательности Козак (например, GCC ACC), лидерной последовательности и оптимизацию кодонов. Создание экспрессирующего вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей Ig PG9, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, подтверждали путем расщепления рестрикционными ферментами, как проиллюстрировано на фиг. 16С. На фиг. 16С на дорожке 1 представлен нерасщепленный экспрессирующий вектор, на дорожке 2 представлен экспрессирующий вектор, расщепленный BamHI и XhoI, и на дорожке М представлен маркер.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Ig PG9, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, изложена в SEQ ID NO: 63 и на фиг. 61. На фиг. 61 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 63 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 2 и на фиг. 18, т.е. аминокислотную последовательность Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (до расщепления фурином).

В этой аминокислотной последовательности сигнальный пептид связан посредством пептидной связи с каждой из тяжелой и легкой цепей для улучшения секреции антитела, которое вырабатывается *in vivo*. В дополнение к этому, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид P2A, локализована между последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими тяжелую и легкую цепи, для обеспечения более эффективного расщепления транслированного полипептида на отдельные полипептиды, содержащие тяжелую или легкую цепь.

В частности, аминокислотная последовательность Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (до расщепления фурином; SEQ ID NO: 2 и фиг. 18), имеет следующую структуру: сигнальный пептид тяжелой цепи IgG человека, переменная область тяжелой цепи (VH), константная область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирная область, константная область 2 (CH2) тяжелой цепи, константная область 3 (CH3), сайт расщепления фурином, линкер GSG, пептид P2A, сигнальный пептид легкой цепи лямбда Ig человека, переменная область легкой цепи (VL) и константная область легкой цепи (CL, конкретно, лямбда). Последовательность каждой части структуры (все они содержатся в пределах SEQ ID NO: 2 в порядке, который описан выше) приведена ниже.

Сигнальный пептид тяжелой цепи Ig человека в составе Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1. MDWTWRILFLVAAATGTHA (SEQ ID NO:18).

Переменная область тяжелой цепи Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1

EFGLSWVFLVAFLRGVQCQRLVESGGGVVQPGSSRLRLSCAASGFDFSRQGMHWVRQAP
GQGLEWVAFIKYDGSEKYHADSVWGRLSISRDNKDTLYLQMNSLRVEDTATYFCVRE
AGGPDYRNGYNYDFYDGYNYHYMDVWGKTTVTVSS (SEQ ID NO:19).

Константная область 1 (CH1) тяжелой цепи Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV (SEQ ID NO:20).

Шарнирная область Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-

EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:21).

Константная область 2 (CH2) тяжелой цепи Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID
NO:22).

Константная область 3 (CH3) тяжелой цепи Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:23).

Сайт расщепления фурином Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-RGRKRRS (SEQ ID NO: 24).

Линкер GSG и пептид P2A Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:25).

Сигнальный пептид легкой цепи лямбда Ig PG9 человека, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
MAWTPLFLFLTCCPGGSNS (SEQ ID NO:26).

Вариабельная область легкой цепи (VL) Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1
QSALTQPASVSGSPGQSITISCNGTSNDVGGYESVSWYQQHPGKAPKVVVIYDVSKRPSG
VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEGDYYCKSLTSTRRRVFGTGTKLTVL (SEQ ID
NO:27).

Константная область легкой цепи (CL, лямбда) Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:28).

Пример 11.

Одноцепочечный Fab (scFab) антитела PG9, специфичного к ВИЧ-1.

В дополнение к Ig PG9, специфичному к белку оболочки ВИЧ-1, который описан выше, был создан одноцепочечный Fab (т.е. VH/CH1 и VL/CL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется с образованием одного транскрипта и транслируется с образованием одного полипептида) на основе антитела PG9 (в дальнейшем именуемый scFab антитела PG9, специфичного к ВИЧ-1).

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая scFab антитела PG9, специфичного к ВИЧ-1, изложена в SEQ ID NO: 50 и на фиг. 46. На фиг. 46 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), которые были использованы для клонирования этой последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). Последовательность нуклеиновой кислоты, изложенная в SEQ ID NO: 50, представляла собой оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты, т.е. с включением последовательности Козак (GCC ACC), оптимизации кодонов и лидерной последовательности. Лидерная последовательность была локализована на 5'-конце конструкции, т.е. перед одноцепочечным Fab и, следовательно, сигнальный пептид, кодируемый линкерной последовательностью, был связан посредством пептидной связи с аминным концом одноцепочечного Fab. Также в состав последовательности нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 50, была включена линкерная последовательность, которая была расположена между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей VH/CH1, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей VL/CL. В соответствии с этим, в полипептиде, кодируемом SEQ ID NO: 50, аминокислотная последовательность, кодируемая линкерной последовательностью, объединяет VH/CH1 и VL/CL. SEQ ID NO: 50 кодировала аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 51 и на фиг. 47, т.е. аминокислотную последовательность scFab антитела PG9, специфичного к ВИЧ-1.

Пример 12.

Ig 4E10, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1.

В дополнение к IgG VRC01 и Ig PG9, специфичному к белку оболочки ВИЧ-1, была создана другая конструкция, которая кодировала IgG, который взаимодействовал с белком оболочки ВИЧ-1. Эта конструкция представляла собой антитело 4E10, специфичное к белку оболочки ВИЧ-1, которая была оптимизирована и клонирована в экспрессирующий вектор (фиг. 17А и 17В). Оптимизация включала введение последовательности Козак (например, GCC ACC), лидерной последовательности и оптимизацию кодонов. Создание экспрессирующего вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей Ig 4E10, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, подтверждали путем расщепления рестрикционными ферментами, как проиллюстрировано на фиг. 17С. На фиг. 17С на дорожке 1 представлен нерасщепленный экспрессирующий вектор, на дорожке 2 представлен экспрессирующий вектор, расщепленный BamHI и XhoI, и на дорожке М представлен маркер.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Ig 4E10, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1, изложена в SEQ ID NO: 62 и на фиг. 60. На фиг. 60 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 62 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1 и на фиг. 19, т.е. аминокислот-

ную последовательность Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (до расщепления фурином).

В этой аминокислотной последовательности сигнальный пептид связан посредством пептидной связи с каждой из тяжелой и легкой цепей для улучшения секреции антитела, которое вырабатывается *in vivo*. В дополнение к этому, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид P2A, локализована между последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими тяжелую и легкую цепи, для обеспечения более эффективного расщепления транслированного полипептида на отдельные полипептиды, содержащие тяжелую или легкую цепь.

В частности, аминокислотная последовательность Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (до расщепления фурином; SEQ ID NO: 1 и фиг. 19), имеет следующую структуру: сигнальный пептид тяжелой цепи IgG человека, переменная область тяжелой цепи (VH), константная область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирная область, константная область 2 (CH2) тяжелой цепи, константная область 3 (CH3), сайт расщепления фурином, линкер GSG, пептид P2A, сигнальный пептид легкой цепи каппа Ig человека, переменная область легкой цепи (VL) и константная область легкой цепи (CL, конкретно, каппа). Последовательность каждой части структуры (все они содержатся в пределах SEQ ID NO: 1 в порядке, который описан выше) приведена ниже.

Сигнальный пептид тяжелой цепи Ig человека в составе Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1- MDWTWRILFLVAAATGTHA (Набор данных 22 элементов NO: 29).

Переменная область тяжелой цепи Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1

QVQLVQSGAEVVKRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVRQAPGRGLEWMGGVIPLLTIT
 NYAPRFQGRITITADRSTSTAYLELNSLRPEDTAVYYCAREGTTGWGWLKPIGAFANW
 GQGTLLTVSS (SEQ ID NO:30).

Константная область 1 (CH1) тяжелой цепи Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVV (SEQ ID NO:31).

Шарнирная область Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:32).

Константная область 2 (CH2) тяжелой цепи Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (SEQ ID
 NO:33).

Константная область 3 (CH3) тяжелой цепи Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:34).

Сайт расщепления фурином Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 RGRKRRS (SEQ ID NO:35).

Линкер GSG и пептид P2A Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:36).

Сигнальный пептид легкой цепи каппа Ig 4E10 человека, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 MVLQTQVFISLLWISGAYG (SEQ ID NO:37).

Переменная область легкой цепи (VL) Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 EIVLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVA
 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQGSLSSTFGQGTKVE (SEQ ID NO:38).

Константная область легкой цепи (CL, каппа) Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1-
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE (SEQ ID NO:39).

Пример 13.

scFab антитела 4E10, специфичного к ВИЧ-1.

В дополнение к Ig PG9, специфичному к белку оболочки ВИЧ-1, который описан выше, был создан одноцепочечный Fab (т.е. VH/CH1 и VL/CL, кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется с образованием одного транскрипта и транслируется с образованием одного полипептида) на основе антитела 4E10 (в дальнейшем именуемый scFab антитела 4E10, специфичного к ВИЧ-1). Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая scFab антитела 4E10, специфичного к ВИЧ-1, изложена в SEQ ID NO: 52 и на фиг. 48. На фиг. 48 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), которые

были использованы для клонирования этой последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). Последовательность нуклеиновой кислоты, изложенная в SEQ ID NO: 52, представляла собой оптимизированную последовательность нуклеиновой кислоты, т.е. с включением последовательности Козак (GCC ACC), оптимизации кодонов и лидерной последовательности. Лидерная последовательность была локализована на 5'-конце конструкции, т.е. перед одноцепочечным Fab и, следовательно, сигнальный пептид, кодируемый линкерной последовательностью, был связан посредством пептидной связи с аминным концом одноцепочечного Fab. Также в состав последовательности нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 52, была включена линкерная последовательность, которая была расположена между последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей VH/CH1, и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей VL/CL. В соответствии с этим, в полипептиде, кодируемом SEQ ID NO: 52, аминокислотная последовательность, кодируемая линкерной последовательностью, объединяет VH/CH1 и VL/CL. SEQ ID NO: 52 кодировала аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 53 и на фиг. 49, т.е. аминокислотную последовательность scFab антитела 4E10, специфичного к ВИЧ-1.

Пример 14.

Fab, специфичный к белку оболочки CHIKV.

Как описано выше, при доставке последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую (VH-CH1) и легкую (VL-CL) цепи Fab белка оболочки ВИЧ-1, в клетку или организм мыши, происходила сборка или образование *in vivo* Fab, взаимодействующего с белком оболочки ВИЧ-1. Чтобы определить возможность выработки *in vivo* Fab, взаимодействующих с другими антигенами, при доставке кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты в клетку или организм субъекта, были созданы конструкции, которые кодировали тяжелую (VH-CH1) и легкую (VL-CL, лямбда тип) цепи антитела, взаимодействующего с белком оболочки (Env) вируса чикунгунья (CHIKV). Каждая конструкция содержала лидерную последовательность и последовательность Козак, как проиллюстрировано на фиг. 20A, 20B и 21. Конструкции, кодирующие VH-CH1 и VL-CL, клонировали в экспрессирующий вектор и, следовательно, поместили под контроль цитомегаловирусного (ЦМВ) промотора (фиг. 21). Экспрессирующие векторы, содержащие конструкции, кодирующие VH-CH1 и VL-CL, была названы CHIKV-H и CHIV-L, соответственно. В целом, смесь векторов CHIKV-H и CHIKV-L была названа pCHIKV-Env-Fab, обеспечила выработку Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, *in vivo* (т.е. при введении в клетку или субъекту). Другими словами, для выработки CHIKV-Env-Fab *in vivo* понадобились оба вектора, как описано более подробно ниже.

Конструкции также были оптимизированы для экспрессии. В частности, в состав каждой конструкции была включена лидерная последовательность для повышения эффективности секреции Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, при выработке Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, *in vivo*. Каждая конструкция также была кодон-оптимизированной и содержала последовательность Козак (GCC ACC). Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, изложена в SEQ ID NO: 58 и на фиг. 56. На фиг. 56 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 58 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 59 и на фиг. 57, т.е. аминокислотную последовательность тяжелой цепи (VH-CH1) CHIKV-Env-Fab.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, изложена в SEQ ID NO: 60 и на фиг. 58. На фиг. 58 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 60 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 61 и на фиг. 59, т.е. аминокислотную последовательность легкой цепи (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV.

Для измерения временной кинетики выработки Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, *in vivo*, клетки трансфицировали pVax1, CHIKV-H, CHIKV-L, или pCHIKV-Env-Fab. После трансфекции использовали ИФА для измерения уровня выработки Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, в динамике. Как проиллюстрировано на фиг. 22, в клетках, трансфицированных pVax1, CHIKV-H или CHIKV-L, не образовывалось антитело, которое взаимодействовало с антигеном белка оболочки CHIKV. В отличие от этого, в клетках, трансфицированных pCHIKV-Env-Fab, образовывалось антитело (т.е. Fab, специфичный к белку оболочки CHIKV, также известный как CHIKV-Fab), который взаимодействовал с антигеном белка оболочки CHIKV. В соответствии с этим, эти данные свидетельствовали о том, что доставка последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих тяжелую (VH-CH1) и легкую (VL-CL) цепи Fab, специфичного к белку оболочки CHIKV, приводила к выработке Fab, который взаимодействовал с антигеном белка оболочки CHIKV.

В дополнение к этому, использовали Fab, специфичный к белку оболочки CHIKV, для Вестерн-блота лизатов, полученных из клеток, трансфицированных pCHIKV-Env, что представляет собой плаз-

миду, которая кодирует антиген белка оболочки СНКV. Как проиллюстрировано на фиг. 23, антиген белка оболочки СНКV был обнаружен благодаря Fab, специфичному к белку оболочки СНКV, что свидетельствовало о том, что этот Fab связывался с антигеном.

Для дополнительного изучения образования или сборки Fab, специфичного к белку оболочки СНКV, *in vivo*, мышам вводили рСНКV-Env-Fab (т.е. 12,5 мкг СНКV-N и 12,5 мкг СНКV-L). В дополнение к этому, второй, третьей и четвертой группе мышей вводили 25 мкг рVax1, СНКV-N и СНКV-L, соответственно, выступали в качестве контроля. Конкретно, плазмиды вводили соответствующим группам мышей на 0-е сутки после получения образца крови до иммунизации. Образцы крови получали на 1-е сутки, 2-е сутки, 3-е сутки, 5-е сутки, 7-е сутки и 10-е сутки (фиг. 24). Измерения с помощью ИФА осуществляли на этих образцах крови, чтобы определить уровни антитела, взаимодействующего с антигеном белка оболочки СНКV. Как проиллюстрировано на фиг. 25, введение мышам рСНКV-Env-Fab приводило к выработке антитела (т.е. Fab, специфичного к белку оболочки СНКV), которое взаимодействовало с антигеном белка оболочки СНКV. У мышей, которым вводили рVax1, СНКV-N или СНКV-L, не вырабатывались антитела, обладающие значительной специфичностью к антигену белка оболочки СНКV. В соответствии с этим, эти данные дополнительно продемонстрировали, что при доставке последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих тяжелую (VH-CH1) и легкую (VL-CL) цепи Fab, специфичного к белку оболочки СНКV, происходила выработка этого Fab *in vivo* (т.е. у мышей), и он взаимодействовал с антигеном (т.е. белком оболочки СНКV), тем самым демонстрируя, что сборка Fab *in vivo* произошла надлежащим образом.

Чтобы определить, сможет ли СНКV-Env-Fab обеспечить защиту против инфицирования СНКV, мышам C57BL/6 (возрастом 2-3 недели; массой около 20-25 грамм) вводили на 0-е сутки рСНКV-Env-Fab (50 мкг) или рVax1. Через 6 часов после введения рСНКV-Env-Fab каждой мышке инокулировали 7 log₁₀ БОЕ в общем объеме 25 мкл с использованием интраназального пути введения. Каждые последующие сутки определяли массу тела для каждой мыши, и мышь умерщвляли, если потеря массы тела была более 30%.

Как проиллюстрировано на фиг. 26 около 75% мышей, которым вводили рСНКV-Env-Fab, выжили при инфицировании СНКV на 14-е сутки исследования, тогда как к 14-м суткам все мыши, которым вводили рVax1, погибли. В дополнение к этому, состояние мышей, которым вводили рСНКV-Env-Fab, было ассоциировано с более низкими уровнями цитокинов ФНО-α и ИЛ-6 по сравнению с мышами, которым вводили рVax1 (фиг. 27 и 28). В сыворотках, полученных у мышей, измеряли уровни ФНО-α и ИЛ-6. У этих выживших мышей не проявлялись признаки патологии, потери массы тела, и у них имелись более низкие уровни цитокинов ФНО-α и ИЛ-6. В соответствии с этим, эти данные свидетельствовали о том, что введение рСНКV-Env-Fab обеспечивало защиту мышей от инфицирования СНК и повышение выживаемости при инфицировании СНКV. Другими словами, выработка *in vivo* Fab, специфичного к белку оболочки СНКV, у мышей обеспечивала защиту и повышение выживаемости при инфицировании СНКV.

Пример 15.

Fab, специфичный к Her-2.

Как описано выше, при доставке последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих тяжелую (VH-CH1) и легкую (VL-CL) цепи белка оболочки ВИЧ-1 или белка оболочки СНКV, в клетку или организм мыши, происходила сборка или образование *in vivo* Fab (т.е. VH/CH1 и VL/CL), взаимодействующего с белком оболочки ВИЧ-1 или белком оболочки СНКV. Чтобы определить возможность выработки *in vivo* Fab, взаимодействующих с аутоантигеном (т.е. эндогенным антигеном субъекта, которому вводят последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие Fab), при доставке кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты в клетку или организм субъекта, были созданы конструкции, которые кодировали тяжелую (VH-CH1) и легкую (VL-CL, каппа тип) цепи антитела, взаимодействующего с рецептором эпидермального фактора роста 2 человека (Her-2; также известного как Erb2). Каждая конструкция содержала лидерную последовательность и последовательность Козак (GCC ACC), которые предшествовали последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей VH-CH1 или VL-CL Fab, специфичного к Her-2, как проиллюстрировано на фиг. 28, 30 и 31. В соответствии с этим, эти конструкции были оптимизированы вследствие введения лидерной последовательности и последовательности Козак, и были дополнительно оптимизированы в отношении частоты использования кодона.

Конструкции, кодирующие VH-CH1 и VL-CL, клонировали в экспрессирующий вектор рVax1, именно между сайтами рестрикции BamHI и XhoI, и, следовательно, их поместили под контроль цитомегаловирусного (ЦМВ) промотора. В частности, конструкции, кодирующие VH-CH1 и VL-CL, клонировали в два отдельных вектора рVax1 и, следовательно, для выработки *in vivo* Fab, специфичного к Her-2, понадобились две полученные в результате плазмиды.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующая VH-CH1 Fab, специфичного к Her-2, изложена в SEQ ID NO: 40 и на фиг. 32. На фиг. 32 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), соответственно, использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор рVax1, тогда как

обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 40 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 41, т.е. аминокислотную последовательность VH-CH1 Fab, специфичного к Her-2 (фиг. 32 и 33).

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующая VL-CL Fab, специфичного к Her-2, изложена в SEQ ID NO: 42 и на фиг. 34. На фиг. 34 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), соответственно, использованные для клонирования последовательности нуклеиновой кислоты в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). SEQ ID NO: 42 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 43, т.е. аминокислотную последовательность VL-CL Fab, специфичного к Her-2 (фиг. 34 и 35).

Для определения наличия или отсутствия выработки *in vivo* Fab, специфичного к Her-2, с использованием смеси плазмид, кодирующих VH-CH1 и VL-CL Fab, специфичного к Her-2, клетки 293T трансфицировали с использованием смеси плазмид, кодирующих тяжелую (VH-CH1) и легкую цепи Fab, специфичного к Her-2 или pVax1. После трансфекции измеряли концентрацию общего IgG, как проиллюстрировано на фиг. 36. На фиг. 36 планки погрешностей представляли стандартное отклонение. Эти данные свидетельствовали о том, что происходила выработка Fab, специфичного к Her-2, *in vivo* при введении двух плазмид, каждая из которых кодирует VH-CH1 или VL-CL Fab, специфичный к Her-2.

Пример 16.

IgG человека к вирусу денге.

Была создана система, состоящая из одной плазмиды, для выработки *in vivo* антитела IgG человека к вирусу денге (DENV). Конкретно, была создана конструкция, которая проиллюстрировано на схеме фиг. 37. Конкретно, лидерная последовательность была помещена выше последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь IgG (т.е. вариабельную область тяжелой цепи (VH), константную область 1 (CH1) тяжелой цепи, шарнирную область, константную область 2 (CH2) тяжелой цепи и константную область 3 (CH3). В свою очередь, последовательность, кодирующая сайт расщепления протеазой, была помещена ниже последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь IgG. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь IgG (т.е. вариабельную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL)) была локализована после последовательности, кодирующей сайт расщепления протеазой (т.е. сайт расщепления фурином). Сигнальные пептиды, кодируемые этой конструкцией, представляли собой родственные сигнальные пептиды, в силу этого обеспечивая надлежащую секрецию антитела при экспрессии. В дополнение к этому, при экспрессии один транскрипт транслируется с образованием одного полипептида, который затем подвергается процессингу с образованием полипептидов, соответствующих тяжелым и легким цепям IgG человека к DENV. Затем происходила сборка полипептидов тяжелой и легкой цепи с образованием функционального IgG человека к DENV, антитела, которое связывается со своим родственным антигеном.

Эту конструкцию клонировали в экспрессирующий вектор pVax1 (именно сайты BamHI и XhoI), тем самым помещая ее под контроль промотора. Эта конструкция, кодирующая IgG человека к вирусу денге, имеет последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную в SEQ ID NO: 44 (фиг. 38), которую оптимизировали для экспрессии. На фиг. 38 одинарное подчеркивание и двойное подчеркивание обозначают сайты рестрикционных ферментов BamHI (GGA TCC) и XhoI (CTC GAG), использованные для клонирования конструкций в вектор pVax1, тогда как обозначения жирным шрифтом обозначают стартовый (ATG) и стоп-кодона (TGA TAA). Оптимизация включала введение последовательности Козак (GCC ACC) и оптимизацию кодонов. SEQ ID NO: 44 кодирует аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 45 и на фиг. 39, т.е. аминокислотную последовательность IgG человека к DENV до расщепления протеазой для разделения тяжелой и легкой цепей на два отдельных полипептида.

Плазмиду, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую IgG человека к вирусу денге, вводили мышам для определения того, происходила ли выработка IgG человека к вирусу денге *in vivo* (т.е. у мышей). После введения плазмиды получали сыворотки мышей и анализировали с помощью ИФА для определения вероятности того, содержали ли сыворотки антитело, которое взаимодействовало с Е-белком денге из серотипов вируса денге, а именно DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4. Как проиллюстрировано на фиг. 40, сыворотка мышей, которым вводили плазмиду, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую IgG человека к DENV, взаимодействовала с Е-белком DENV из серотипов DENV-1, -2, -3 и -4. Изотипическое антитело использовали в качестве положительного контроля. В соответствии с этим, эти данные свидетельствовали о том, что при введении плазмиды мышам последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IgG человека к DENV, транскрибировалась и транслировалась с образованием полипептида, который подвергался процессингу с образованием полипептидов, содержащих тяжелые и легкие цепи IgG человека к DENV. Сборка этих полипептидов приводила к образованию IgG человека к DENV, тем самым обеспечивая функциональное антитело, которое связывалось или взаимодействовало с Е-белком DENV.

Чтобы дополнительно исследовать выработку IgG человека к DENV посредством введения одной плазмиды, мышам вводили путем инъекции плазмиду, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую IgG человека к DENV. Конкретно, мышам вводили 50 мкг или 100 мкг плазмиды,

и в каждой группе было 5 мышей. На 3-й сутки и 6 суток после инъекций мышей исследовали на сероконверсию. Как проиллюстрировано на фиг. 41, мыши из обеих групп были сероположительными на антитела IgG к DENV. В частности, мыши, которым вводили 50 мкг плазмиды, имели около 110 нг/мл IgG человека, и мыши, которым вводили 100 мкг плазмиды, имели около 170 нг/мл IgG человека. В соответствии с этим, эти данные продемонстрировали выработку IgG человека к DENV *in vivo* после введения плазмиды, кодирующей его. Эти данные также продемонстрировали, что образование антитела IgG человека к DENV происходило раньше, чем через 1 неделю, тем самым обеспечивая быстрое образование IgG человека к DENV.

Понятно, что вышеизложенное подробное описание и сопутствующие примеры являются только иллюстративными и не должны приниматься за ограничения объема охраны настоящего изобретения, который определяется исключительно пунктами прилагаемой формулы изобретения и их эквивалентами.

Специалистам в данной области техники будут понятны различные изменения и модификации раскрытых вариантов реализации изобретения. Такие изменения и модификации, включая без ограничений те, что относятся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным продуктам, синтезам, композициям, препаратам или способам использования настоящего изобретения, могут быть внесены в пределах сущности изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения синтетического антитела в организме позвоночного, включающий введение композиции, содержащей либо

(a) последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его фрагмент,

где антитело содержит полипептид тяжелой цепи или его фрагмент, кодируемый первой последовательностью нуклеиновой кислоты, и полипептид легкой цепи или его фрагмент, кодируемый второй последовательностью нуклеиновой кислоты; либо

(b) последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей первую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи или его фрагмент, и вторую последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи или его фрагмент;

где последовательность или последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты экспрессируются в организме позвоночного с получением синтетического антитела,

где введение композиции осуществляется электропорацией и где введение композиции обеспечивает при экспрессии *in vivo* функциональные антитела, которые быстро достигают заданную область организма и индуцируют иммунный ответ на мишень.

2. Способ по п.1(a), в котором последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор для экспрессии первой последовательности нуклеиновой кислоты и второй последовательности нуклеиновой кислоты в виде одного транскрипта в организме позвоночного.

3. Способ по п.2, в котором промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (ЦМВ).

4. Способ по п.2, в котором последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты дополнительно содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сайт расщепления протеазой,

где третья последовательность нуклеиновой кислоты расположена между первой последовательностью нуклеиновой кислоты и второй последовательностью нуклеиновой кислоты.

5. Способ по п.4, в котором протеаза позвоночного распознает и расщепляет сайт расщепления протеазы.

6. Способ по п.1(a), в котором последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит первый промотор для экспрессии первой последовательности нуклеиновой кислоты в виде первого транскрипта и второй промотор для экспрессии второй последовательности нуклеиновой кислоты в виде второго транскрипта,

где трансляция первого транскрипта дает первый полипептид и трансляция второго транскрипта дает второй полипептид,

где синтетическое антитело образуется из первого и второго полипептида.

7. Способ по п.1(b), в котором

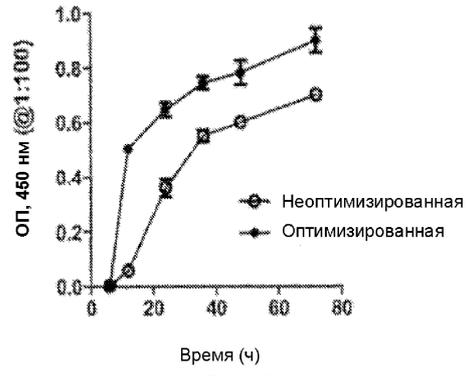
первая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит первый промотор для экспрессии первого полипептида в организме позвоночного и

вторая последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит второй промотор для экспрессии второго полипептида в организме позвоночного.

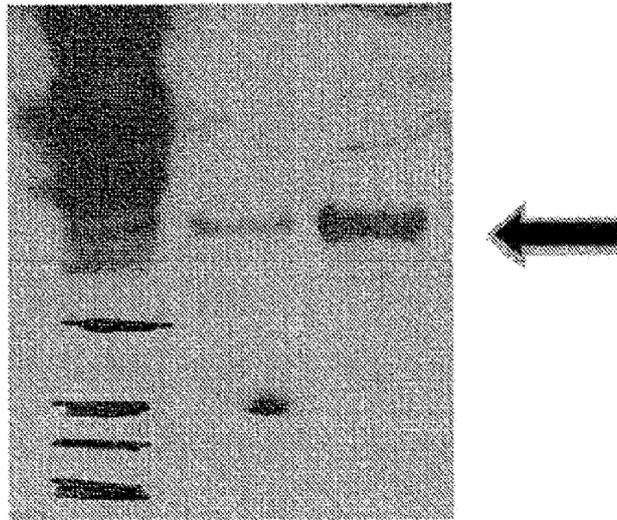
8. Способ по п.6 или 7, в котором первый промотор и второй промотор являются одинаковыми, и промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (CMV).

9. Способ по п.1, в котором

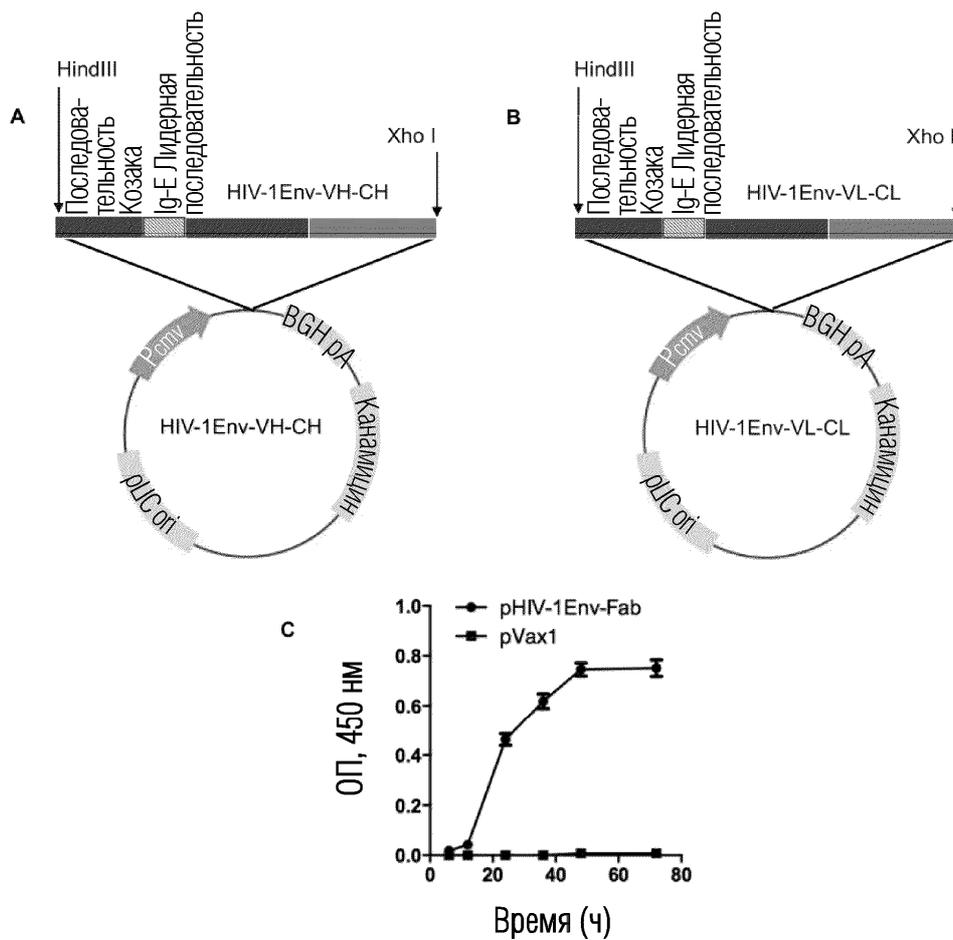
полипептид тяжелой цепи содержит переменную область тяжелой цепи и константную область 1



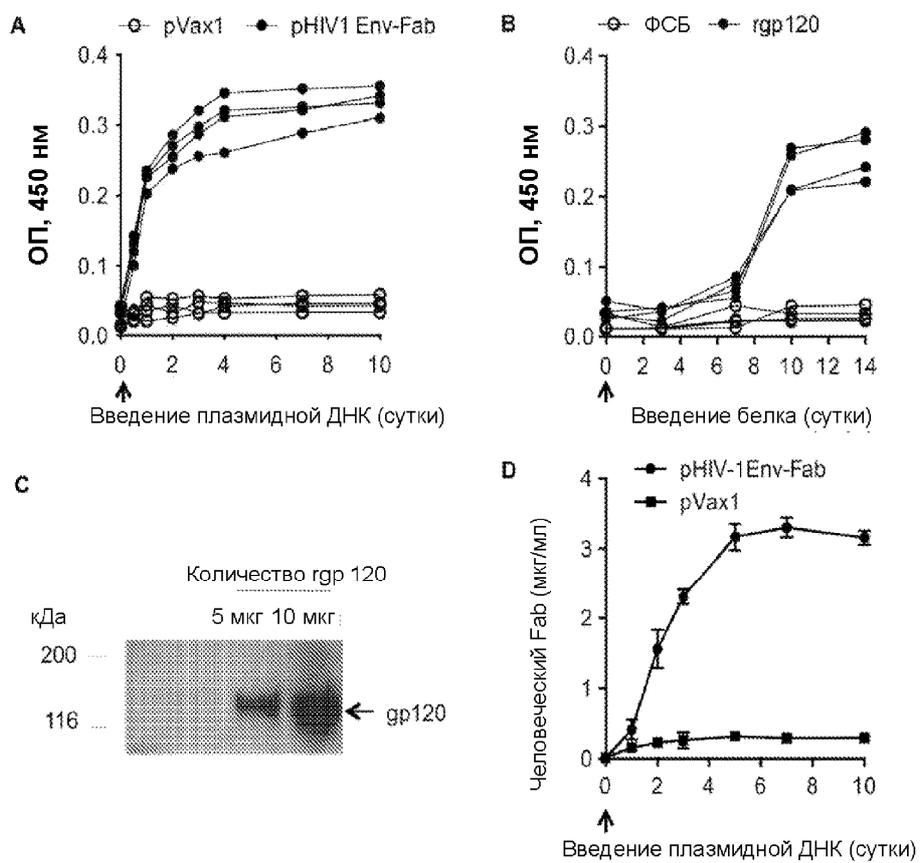
Фиг. 3



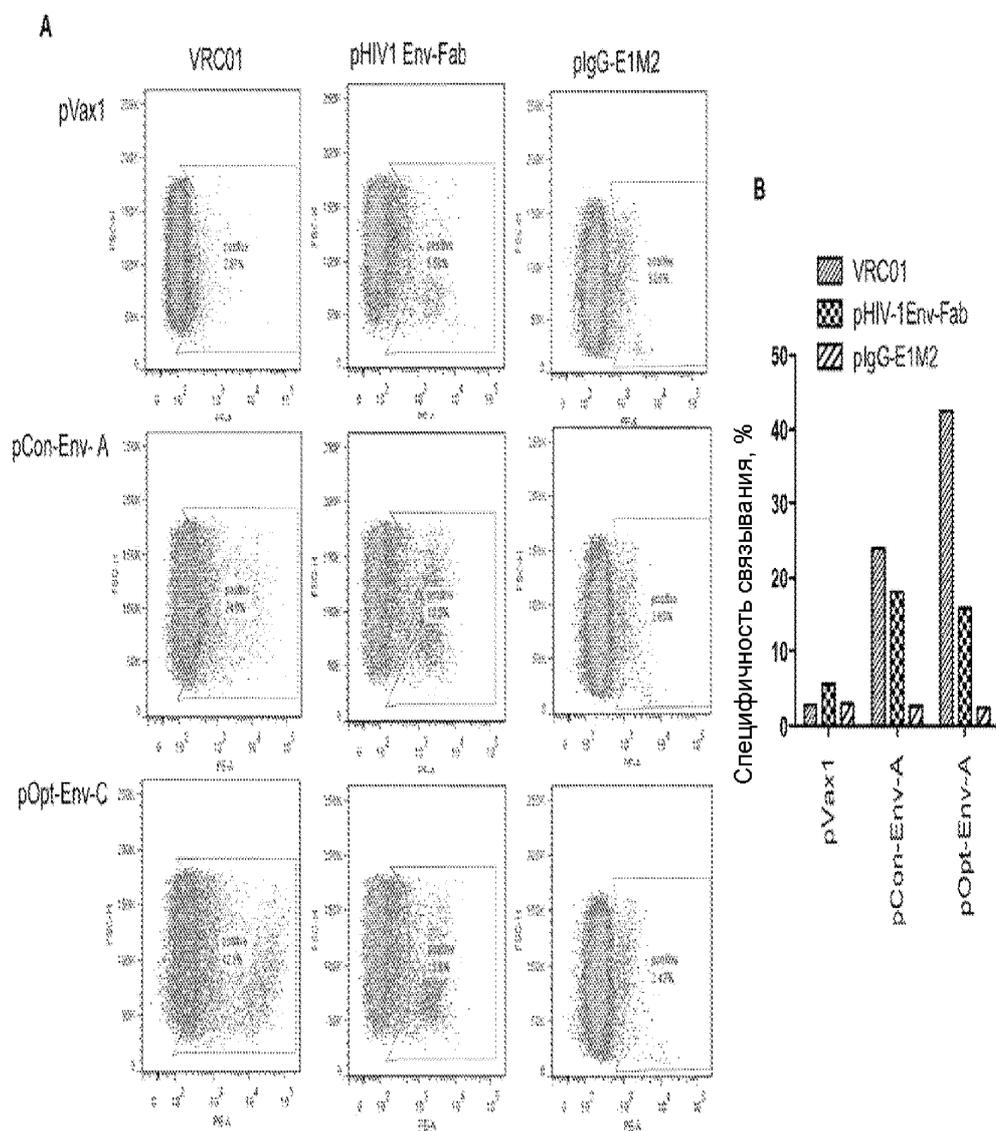
Фиг. 4



Фиг. 5

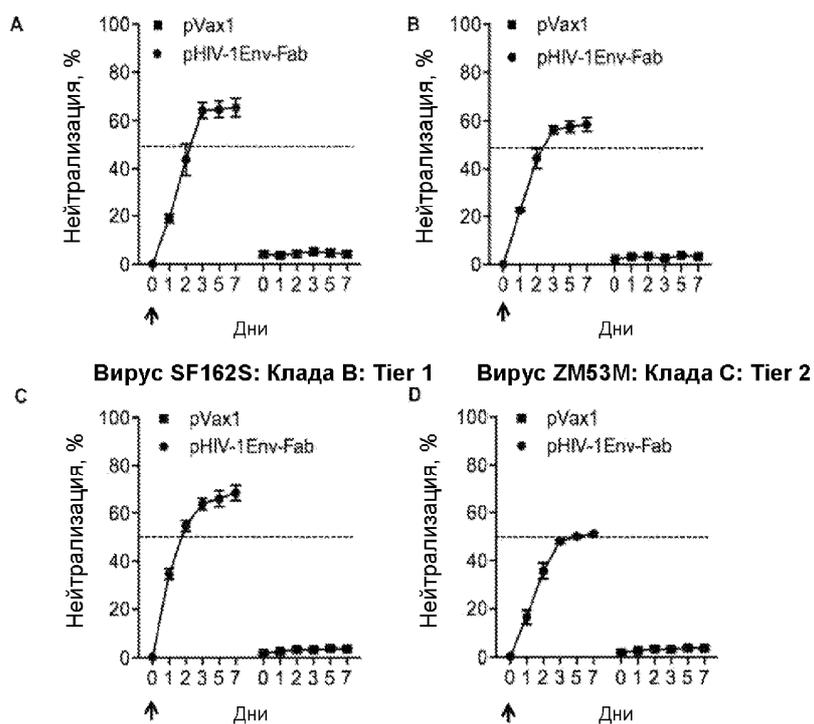


Фиг. 6



Фиг. 7

Вирус Bal26: Клада В: Tier 1 Вирус Q23Env17: Клада А: Tier 1



Фиг. 8

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1

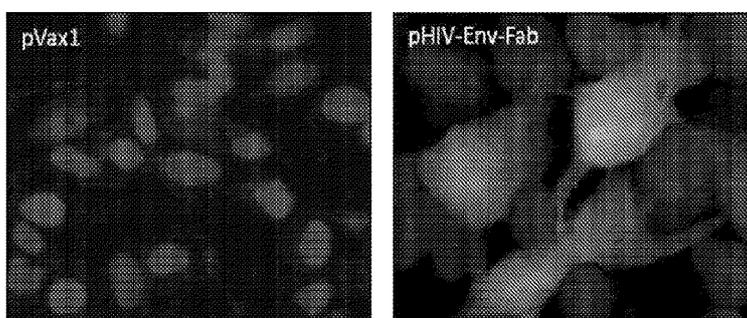
AAGCTTGCCGCCACCATGGAGACTGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG
 GTGCCAGGGTCAACCGGAGATGGGGCTCAGGTCCAGCTGGTCCAGAGCGGCGGACA
 GATGAAGAAACCCGGCGAGAGCATGAGGATCTCCTGCAGAGCATCTGGATACGAGT
 TCATCGACTGTACCCTGAACTGGATTAGGCTGGCTCCTGGAAAGAGACCAGAGTGG
 ATGGGGTGGCTGAAACCACGAGGGGAGCAGTGAATTACGCCCGCCCTGCAGGG
 ACGAGTGACCATGACCAGGGACGTGTACAGCGATACCGCCTTCCTGGAGCTGCGGT
 CCCTGACAGTGGACGATACTGCTGTCTACTTCTGCACACGCGGAAAGAACTGTGACT
 ATAATTGGGATTTTGAACACTGGGGCCGGGGAACACCCGTGATCGTCAGCTCCCCA
 GТАСТАAGGGACSTTCAGTGTTCCTACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAG
 GGACAGCCGCTCTGGGATGCCTGGTGAAGATTATTTCCCCGAACCTGTGACCGTCA
 GTTGGAACTCAGGGGCTCTGACTTCTGGCGTGCACACSTTTCTGCAGTCCTGCAGT
 CAAGCGGGCTGTACAGTCTGTCCCTGTGGTCACTGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCA
 CTCAGACSTATAATTTGTAACGTGAATCATAAGCCATCCAATACAAAAGTGGACAAA
 AAAGCCGAACCCAAATCCTGTTACCSTTATGATGTGCCCGACTACGCTGACTCGAG
 (SEQ ID NO:3)

Фиг. 9

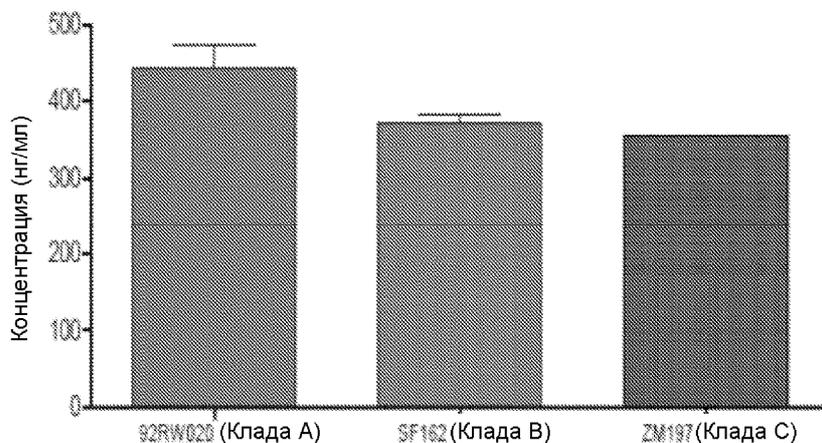
Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1

AAGCTTGCCGCCACCATGGAAACCGATACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG
GTGCCAGGAAGTACCGGGGATGGGGCTCAGGTCCAGATTGTGCTGACTCAGTCCCCT
GGGACCCTGTCTCTGAGTCCAGGCGAGACAGCTATCATTTTCATGCCGAACTAGCCAG
TACGGCAGCCTGGCTTGGTATCAGCAGCGACCAGGACAGGCACCACGACTGGTCAT
CTACTCAGGCAGCACAAGGGCCCGCTGGCATCCCCGACAGGTTCTCCGGCAGCAGGT
GGGGGCTGATTACAACCTGACTATCTCTAATCTGGAGAGTGGGGACTTTGGCGTGT
ACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCTTCGGCCAGGGAACCTAAGGTGCAGGTGGACATC
AAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCCGTCTTCATTTTCCCCCTTCTGATGAGCAGCTG
AAGTCAGGCACCGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCCGGGAAGCC
AAGGTGCAGTGGAAGTGGACAACGCTCTGCAGAGTGGAAATTCACAGGAGAGCGT
GACCGAACAGGACTCCAAGGATTCTACATATAGTCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA
GTAAAGCAGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAAGTCACACATCAGGGC
CTGAGGAGCCCCGTGACTAAAAGTTTCAACCGAGGAGAGTGCTACCCTTATGATGTG
CCCGACTACGCCTAACTCGAG (SEQ ID NO:4)

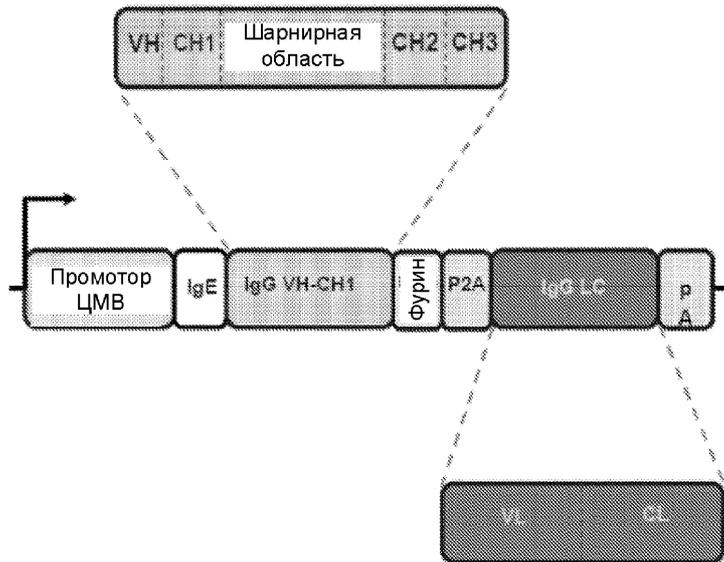
Фиг. 10



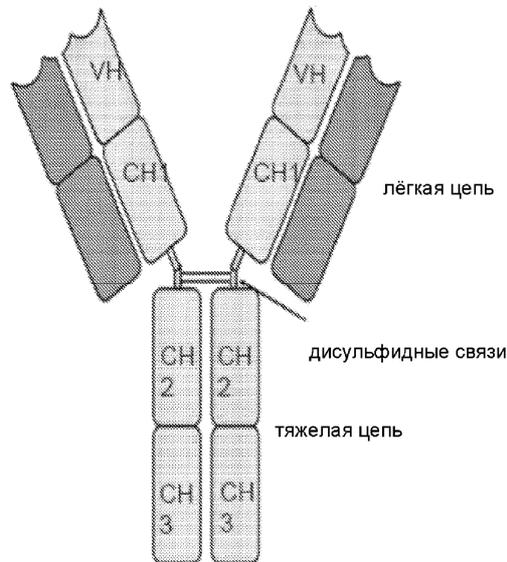
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

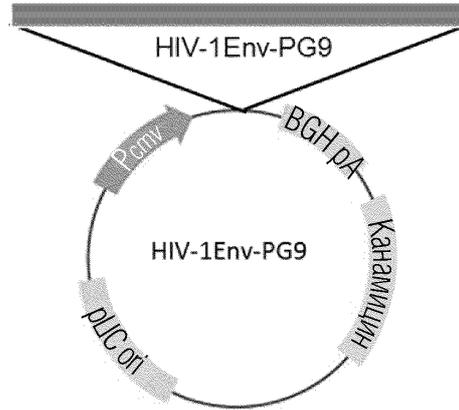
VRC01 IgG

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLA
 PGKRPEWMGWLKPRGGAVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCT
 RGKNC DYNWDFEHWGRGTPVIVSSPSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVD
 KKAEPKSCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGKRGRKRRSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSEIVLTQ
 SPGTLSPGETAIIISCRTSQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRWGP
 DYNLTISNLESGDFGVVYCCQYEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHK
 KVVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:5)

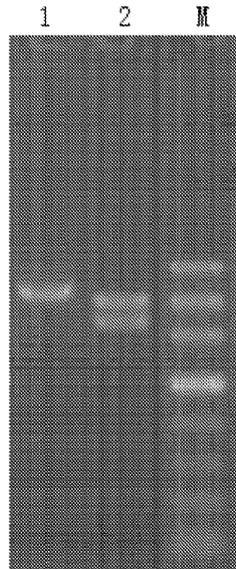
Фиг. 15



Фиг. 16А



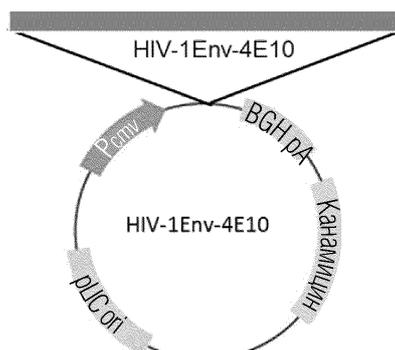
Фиг. 16В



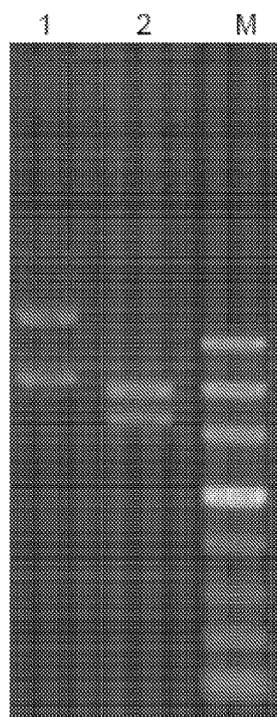
Фиг. 16С



Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 17С

Аминокислотная последовательность Ig PG9, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 до расщепления фурином

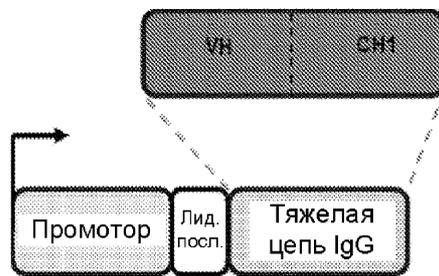
MDWTWRILFLVAAATGTHAEFGLSWVFLVAFLRGVQCQRLVESGGGVVQPSSRLRSC
 AASGFDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEKYHADSVWGRLSISRDNKSDL
 YLQMNSLRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYDFYDGYNYHYMDVWGKTTVT
 VSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKRRRSGSGATNFSLLKQAGD
 VEENPGPMAWTPFLFLLTCCPGGSNSQSALTQPASVSGSPGQSITISCNQTSNDVGGYE
 SVSWYQQHPGKAPKVVIIYDVKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEGDYYCKS
 LTSTRRRVFGTGKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW
 KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWWSHKYSYSCQVTHEGSTVEKTV
 APTECS (SEQ ID NO:2)

Фиг. 18

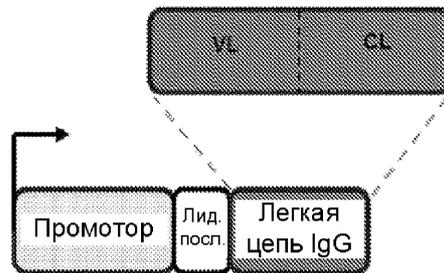
Аминокислотная последовательность Ig 4E10, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1 (до расщепления протеазой)

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVR
 QAPGRGLEWMGGVIPLLITITNYAPRFQGRITITADRSTSTAYLELNSLRPEDTAVYYCAR
 EGTTGWGWLGKPIGAFAHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 SNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGKRGRKRRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVLQTQVFISLLWISGAYGEIVL
 TQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVADRF
 SGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYQGQSLSTFGQGTKVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSK
 ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE (SEQ ID NO:1)

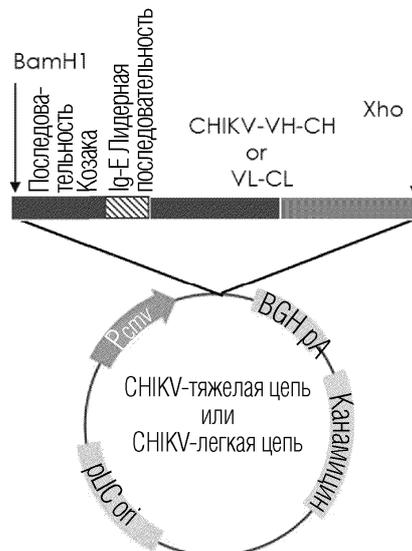
Фиг. 19



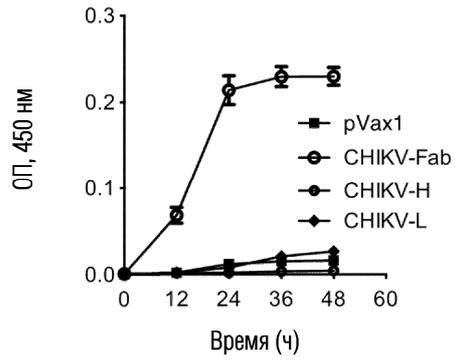
Фиг. 20А



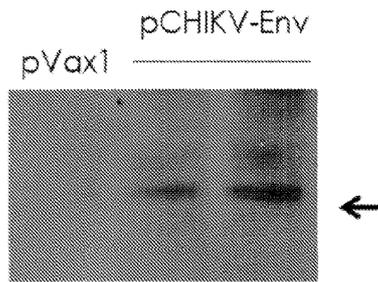
Фиг. 20В



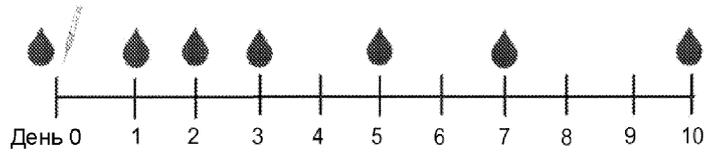
Фиг. 21



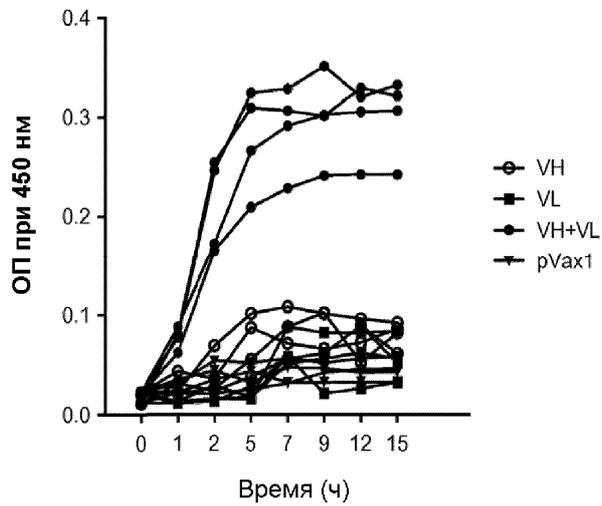
Фиг. 22



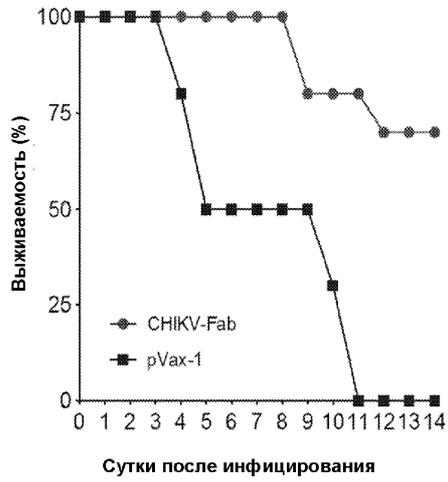
Фиг. 23



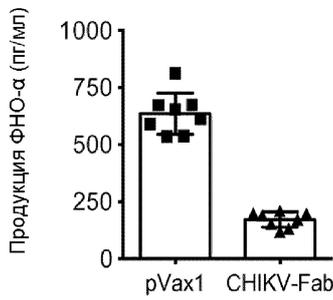
Фиг. 24



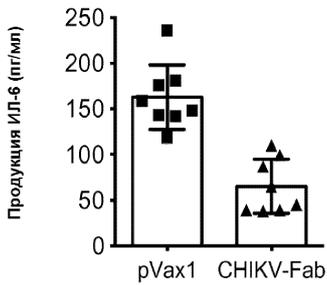
Фиг. 25



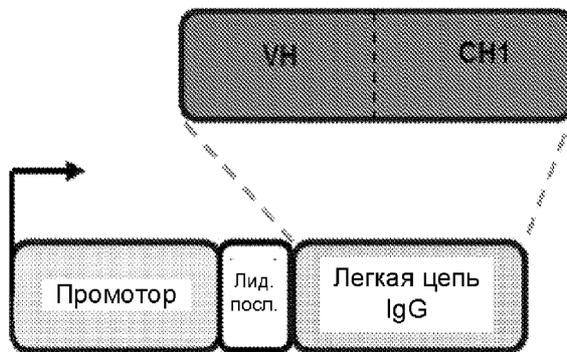
Фиг. 26



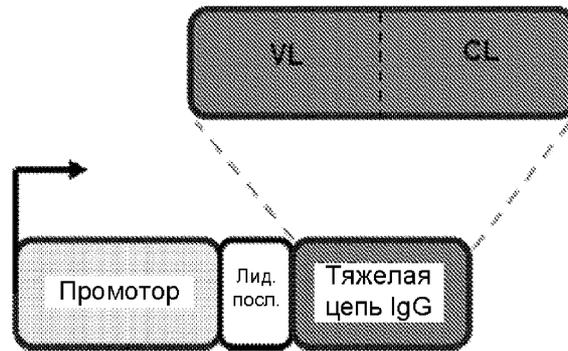
Фиг. 27



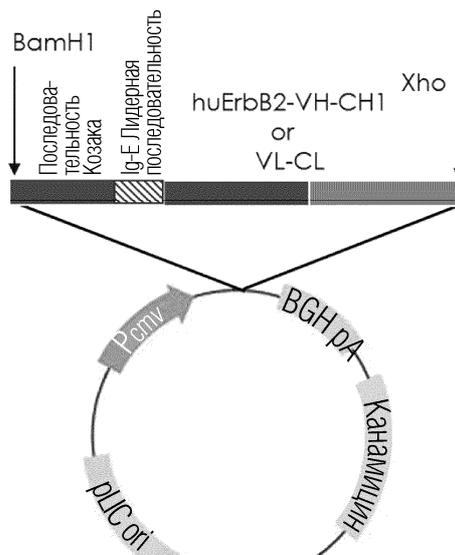
Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая VH-CH1 Fab, специфичного к Her-2

GGATCCGCCACCATGGACTGGACATGGATTCTGTTTCTGGTCGCCGCCGCTACAAGAGTGCATTCCGAAGTGCAGCTGG
 TCGAGAGTGGAGGGGACTGGTGCAGCCCGCGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTTACCTTTACAGA
 STACACCATGGATTGGGTGAGACAGGCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCTGATGTCAACCCAAATAGTGGGGG
 CTCATCTACAACCAGAGGTTCAAGGGCAGGTTACCCTGAGCGTGGACAGGTCAAAAACACTCTGTATCTGCAGAT
 GAATTCTCTCGGGCTGAAGATACCGCAGTCTACTATTGCCCCGCAATCTGGGCCCAAGCTTCTACTTTGACTATTGG
 GGGCAGGGCACACTGGTACTGTCAGCTCCGCTTCTACAAGGGACCAAGCGTGTCCCACTGGCACCCCTCTAGTAAAT
 CCACCTCTGGAGGGACAGCAGCCCTGGGTGTCTGGTGAAGACTATTTCCCGAGCCTGTGACTGTCAGCTGGAATC
 CGGAGCACTGACTAGCGGAGTGCACACCTTCCAGCCGCTCTGCAGTCAAGCGGCCTGACTCCCTGTCTCTGTGGTC
 ACAGTGCCTAGTTCAAGCCTGGAACTCAGACCTATATTTGTAATGTGAACCATAAACCAAGCAATACAAGGTGGAC
 AAGAAGGTGGAACCAAAATCCTGCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:40)

Фиг. 32

Аминокислотная последовательность VH-CH1 Fab, специфичного к Her-2

MDWTWILFLVAAATRVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDVTMDWVRQAPGKLEWVADVNPNSGGSIYN
 QRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKVEPKSC
 (SEQ ID NO:41)

Фиг. 33

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая VL-CL Fab, специфичного к Her-2

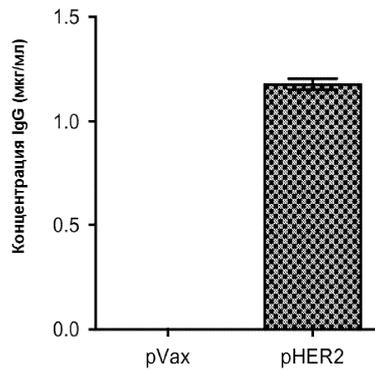
GGATCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATTCTGTTCTGGTCGCCGCCCTACCCGCGTGCATTCCGATATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCTCACTGTCAGCCAGCGTGGGCGACCGAGTCCACATCACATGCAAAGCTTCTCAGGATGTGAGTATGGGGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTTTACAGGTATACAGGAGTGCCAGCAGATTCACTGGCTCAGGAAGCGGGACTGACTTTACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGAACAAAAGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTCCCTTCTGACGAACAGCTGAAGAGCGGAACAGCAAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTCGATAACGCTCTGCAGTCCGGGAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAAGATAGCACSTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCCGTGTGAGGTCAACCACCAGGGGCTGTCAAGTCCCGTACCAAGTCTTCAATAGAGGGCAATGCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:42)

Фиг. 34

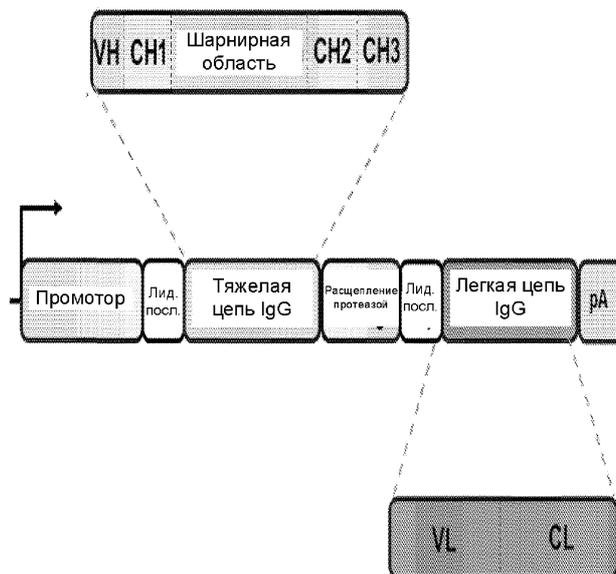
Аминокислотная последовательность VL-CL Fab, специфичного к Her-2

MDWTWILFLVAAATRVHSDIQMTQSPSSLASVGDRTTTCASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

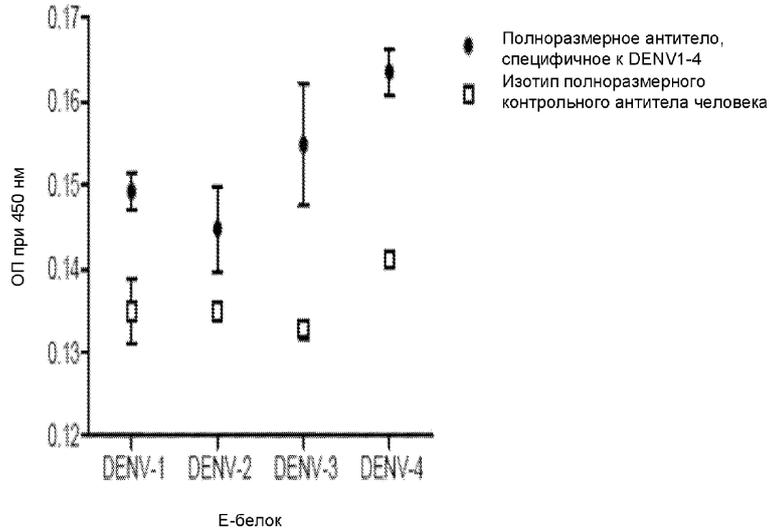
Фиг. 35



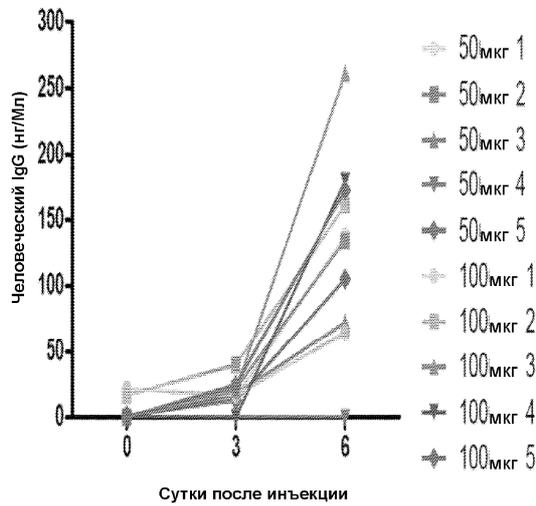
Фиг. 36



Фиг. 37



Фиг. 40



Фиг. 41

Тяжелая цепь IgG

METDLLLLVLLLWVPGSTGDGAQVQLVQSGAVIKTPGSSVKISCRASGYNFRDYSIHVWRLIPDKGFEWIGWIKPLWGAV
 SYARQLQGRVSMTRQLSQPDDPDWGVAYMEFSGLTPADTAEYFCVRRGSCDYCGDFPWQYWCQGTVVVVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCYYPDVPDYA (SEQ ID NO:46)

Фиг. 42

Легкая цепь IgG

METDLLLLVLLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGILSLSPGETATLFCKASQGGNAMTWYQKRRGQVPRLLIYDTSRRASG
 VPDRFVGSQSGTDFFLTINKLDREDFAVYYCQQFEFFGLGSELEVHRTVAAPSVFIPPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREA
 KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECYPYDVPDYA
 (SEQ ID NO:47)

Фиг. 43

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGAQVQLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWMGWLKPRGG
AVNYARPLQGRVTMTRDVYSDTAFLRLSLTVDDTAVYFCTRGNCDYNWDFEHWGRGTPVIVSSPSTKGPSVFLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKA
EPKSCYPYDVPDYA (SEQ ID NO:48)

Фиг. 44

Аминокислотная последовательность легкой цепи (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки ВИЧ-1

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGAQVQIVLTQSPGTLSPGETAIIISCRISQYVGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPD
RFSGSRWGPYDNYLTISNLESGDFGVYCCQYEFFGQGTKVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGECYPYDVPDYA
(SEQ ID NO:49)

Фиг. 45

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Fab антитела PG9, специфичного к ВИЧ-1

GGATCCGCCACCATGGCAAGACCCCTGTGCACCCCTGCTGCTGCTGATGGCAACCCCTGGCCGGAGCCCTGGCACAGAGC
GCCCTGACCCAGCCGCAAGCGTCTCCGGCTCACCAGGCCAGGCATCACTATTAGTTGCAACGGGACTAGCAACGAC
GTGGGAGGCTATGAGAGTGTGAGTGGTACCAGCAGCATCCCGAAAAGCACAAAAGTGGTCATCTACGATGTCAGT
AAAAGGCCAAGTGGGGTCTCAATAGGTTCTCAGGGAGTAAATCTGGGAATACAGCATCTCTGACCATCTCCGGACTG
GGCGCAGAAGATGAAGGGGACTACTATTGCAAAAAGCCTGACCTCAACCAGACGGCGAGTCTTTGGGACAGGCACAA
GCTGACAGTCTGACAGTCCGCTGCCCCCTCCGCTTTCATTTTTCCACCTTCAGATGAGCAGCTGAAATCTGGCACTGCAT
CTGTGGTCTGCCTGCTGAACAATTCTATCCACGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCG
GCAATAGTCAGGAAAAGCGTACTGAGCAGGATCCAAGGACAGTACCTATAGCCTGTCCAGTACACTGACCCCTGTCCA
AGGCTGACTACGAAAAACATAAGGTGTATGCATGTGAAGTACTCACCAGGGACTGAGGTACCAGTCACTAAGTCTT
TTAACAGGGGAGAGTGCAGGGGGGAGGATCTGGAGGGCGGGCTCTGGAGGGGGAGGCTCAGGGGGGGAGGAAAG
CGGGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGAGGCAGTCAAGACTGGTCAAGCGGGGGAGGAGTGGTGCAGCCTGGGTCTCT
CACTGAGACTGTATGCGCTGCCAGTGGCTTTGATTTTTACGACAGGGAATGCATTGGGTCAAGCAGGACCCCGACA
GGGCTGGAATGGGTGCCTTCATTAAGTACGACGGAAGCGAGAAGTACCATGCCGACTCAGTGTGGGGAAGGCTGAG
CATCTCAAGGGACAACCTCAAAGGACACCCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGTGGAAAGATAACCGTACTTATTT
CTGCGTGCAGAGGGCCGAGGGCCAGATTACCGAACGGGTACAATTAATGATTTCTACGACGGCTACTACAATTA
CCATTATATGGATGTCTGGGGCAAAGGAACTACAGTACCCGTGAGCTCCGCAAGTACTAAGGGACCTTCCGTGTTTCT
CTGGTCCCAGTTCAAAAGTACATCCGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTCAAGGACTATTTTCCGAGCCCG
TGACTGTCTCCTGGAACAGCGGGCTCTGACAAGCGGGGTGCACACCTTCTCCTGCTGCTGAGTCCAGTGGGCTGTA
CAGTCTGTCTAGTGTGCTCACTGTGCCAAGCTCAAGTCTGGGACCCAGACATACATTTGTAATGTGAACCATAAACCC
TCAAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTGAACCTAAAAGCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:50)

Фиг. 46

Аминокислотная последовательность Fab антитела PG9, специфичного к ВИЧ-1

MARPLCTLLLLMATLAGALAQSAITQPASVSGSPGQISITISCNSTNDVGGYESVSWYQHPGKAPKVVIYDVKRPSGVS
RFSGSKSGNTASLTISGLAEDEGDYCKSLSTRRRVFGTGTCLTVLVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGECGGGGGGGGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGGQRLVESGGGVVQPSLRLSAAAGSDFSRQGMHWVRQAPGQGLEWVAFIKYDGSEKYN
ADSVWGRLSISRDNKDTLYLQMNLSRVEDTATYFCVREAGGPDYRNGYNYYDFYDGYNYHYMDVWGKGTVTVSSAS
TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNV
NHNKPSNTKVDKKEPKS (SEQ ID NO:51)

Фиг. 47

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Fab антитела 4E10, специфичного к ВИЧ-1

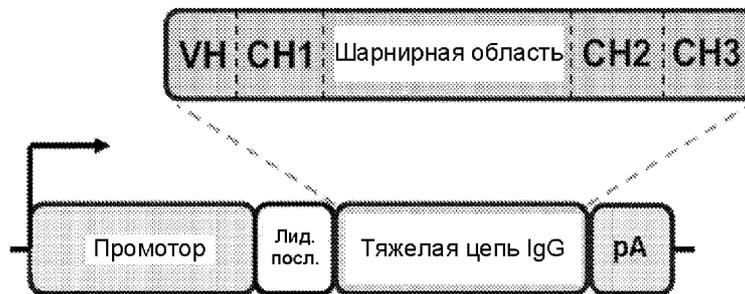
GGATCCGCCACCATGGCAAGACCTCTGTGCACTCTGCTGCTGATGGCTACTCTGGCCGGGGCTCTGGCTGAGATTG
TCCTGACCCAGTCCCCTGGCACTCAGTCACTGTCCCCGGCGAGCGCGCAACTCTGTCTGCAGAGCAAGCCAGTCCGT
CGGAACAACAAGCTGGCATGGTACCAGCAGCGCCAGGACAGCCAGGCTGCTGATCTACGGAGCAAGCTCCC
GGCCTAGCGGAGTCCGTGATAGATTCTCCGGAAGCGGCTCCGGGACCGATTCACTCTGACCATCTCCAGGCTGGAACC
TGAGGATTTTCCCGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGGCAGAGCCTGTCAACTTTCCGCCAGGGAACAAAGTCGAAAA
GAGAACCCTGGCCGACCAAGCGTCTTATTTTCCCCCTAGCGATGAACAGCTGAAATCCGGGACTGCTCCCGTGGTC
TGCTGCTGAATAACTTCTATCCAAGAGAGGCAAAGGTGCACTGGAAGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGAAACTCA
CAGGAATCTGTGACAGAGCAGGACTCCAAGGATAGCACATACAGTCTGTCTCAACTTGACCCCTGTCCAAAGCTGAC
TATGAGAAGCATAAAGTCTACGCATGTGAGGTGACCCACAGGGACTGAGGTCCCCCGTCACTAAGTCTTCAATAGA
GGCGAGTGGGGGGCGGGGCACTGGCGGAGGGGAAGTGGGGCGGAGGGAGTGGCGGCGGGGAGTGGCGGCG
GCGGCTCAGGGGGCGGGCTCCAGGTCCAGCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTCAAGAGACCAGGCTCTCAGTCA
CCGTGAGCTCAAAGCCAGCGGAGGCTCCTTAGCACTTACGCCCTGTCATGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCCGAGGCC
TGGAGTGGATGGGCGCGTGTATCCCCCTGCTGACCACTAATACTATGCCCTAGATTTGGAGGCCGGATCACCATCAC
AGCTGACAGATCCACATCCACAGCTTACCTGGAGCTGAACAGTCTGAGGCCGAGGACACTGCAGTCTACTACTGTGC
ACGAGAAGGCACCACTGGATGGGGTGGTGGGGAAGCCATCGGGCTTTTGCACATTGGGGCGGAGGGACACTGGT
GACTGTGAGCTCTGCCAGCACTAAAGGCCAGTGTCTCCCTCTGGCCCCAAGTCCAAGAGTACATCAGGGGCCACC
GCCGCACTGGGGTGTCTGGTGAAGGATTACTCCAGAGCCCGTGACAGTCACTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGT
GGGGTGCACACTTTCCAGCCGTGTCAGAGTTCAGGGCTGTACTCCCTGTCTCAGTGGTACTGTGCCCTCAAGCA
GTCTGGGGACTCAGACTTACATTTGTAATGTGAACCATAAACCCCTCAAATACTAAAGTGGACAAAAAAGTGAACCAA
AGAGCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:52)

Фиг. 48

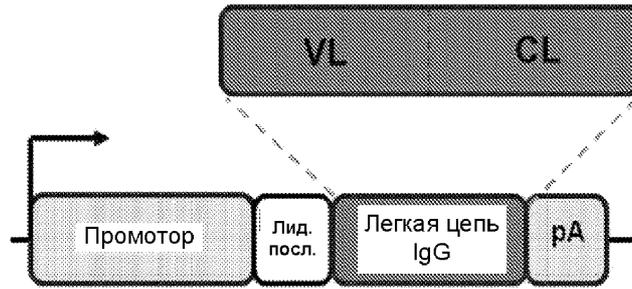
Аминокислотная последовательность Fab антитела 4E10, специфичного к ВИЧ-1

MARPLCTLLLLMATLAGALAEIVLTQSPGTQSLSPGERATLSCRASQSVGNKLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRPSGVADR
FSGSGSDTFILTISRLEPEDFAVYYCQQYQQLSTFGQGTKVEKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGECGGGGSGGGSGG
GGSGGGSGGGSGGGGQVQLVQSGAEVVRPSSVTVSCKASGGSFSTYALSWVRQAPRGRLEWMMGGVPIPLTITNYAP
RFGGRITITADRTSTAYLELNSLRPEDTAVYYCAREGTTGWGWLKPIGAFAHWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
KS (SEQ ID NO:53)

Фиг. 49



Фиг. 50



Фиг. 51

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь (VH/CH1/Шарнирная область/CH2/CH3) IgG1 VRC01, специфичного к ВИЧ-1

GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGATTCTGTTCCTGGTCGCCGCCGCAACTAGAGTGCATTACAGGTGCAGCTGG
 TGCAGTCAGGCGGCAGATGAAGAAACCCGGCGAGAGTATGCGAATCTCATGCCGGGCTAGCGGGTACGAATTCATCG
 ACTGTACCCCTGAACTGGATTAGACTGGCACCTGGGAAGAGGCCAGAGTGGATGGGATGGCTGAAACCTAGAGGGCGG
 GCAGTGAATTACGCCAGACCCTGCAGGGCAGGGTCACTATGACCCGCGACGTGTATTCTGATACCCGATTCTCGGAG
 CTGCGAAGTCTGACAGTCGACGATACTGCCGTGACTTCTGCACACGGGGCAAGAAGTCTGACTATAATTGGGATTTG
 AACACTGGGGCAGGGGACACCTGTCAATTGTGAGCTCCCCAAGTACTAAGGGACCCCTCAGTGTTCCCTGGCCCCCTC
 TAGTAAAAGTACCTCAGGAGGCACAGCCGCTCTGGGATGCCTGGTGAAGGATTACTCCCTGAGCCAGTCACCGTGAG
 TTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGACTCCCTGTCC
 TCTGTGGTCAAGTGCAGTCCAGTTCAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGTAACGTCATCACAAGCCTAGCAATACTA
 AAGTGGACAAGAAAGCCGAGCCTAAGAGCTGCGAACCAGTCTGTGATAAAACCCATACATGCCCTCCCTGTCCAG
 CTCCTGAACTGCTGGGCGGCCATCCGTGTTCTGTTCCACCCAAGCCAAAGACACCCTGATGATTAGCAGGACTCC
 TGAGGTACCTGCGTGGTCTGGACGTGTCCACGAGGACCCGAAGTCAAGTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCGA
 AGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCGGGAGGAACAGTACAACCTTACCTATAGAGTCTGTGAGTGTCTGACAGTGT
 GCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCCAGTCCCATCGAGAAAAC
 AATTTCAAGGCAAAAGCCAGCCAAGGGAACCCAGGTGTACTCTGCCTCCATCCCGCAGCAGCTGACTAAGAA
 CCAGGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGATTCTATCCAAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCC
 GAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTCTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATA
 AAAGCCGCTGGCAGCAGGGGAACGTCTTATGCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTCTGACAATCATTACCCAGAAAGT
 CTCTGAGTCTGTACCTGGCAAGTATAACTCGAG (SEQ ID NO:54)

Фиг. 52

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (VH/CH1/шарнирная область/CH2/CH3) IgG1 VRC01, специфичного к ВИЧ-1

MDWTWILFLVAAATRVHSQVLVQSGGQMKKPGESMRISCRASGYEFIDCTLNWIRLAPGKRPEWGWLKRGGAVNYA
 RPLQGRVTMTRDVYSDTAFLELRSLTVDDTAVYFCTRGKNCYNDWFHWRGTPVIVSSPSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
 AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKKAEPKSC
 PKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:55)

Фиг. 53

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь (VL/CL) IgG VRC01, специфичного к ВИЧ-1

GGATCCGCCACCATGGATTGGACTTGGATTCTGTTCTGGTGGCAGCCGCTACCAGAGTCCATTCCGAAATTGTGCTGA
 CCCAGTCTCCCGGAACACTGTCTCTGAGTCTGGCGAGACAGCCATCATTTCTGTAGGACTTCTCAGTACGGGAGTCT
 GGCATGGTATCAGCAGCGACCAGGACAGGCTCCTCGACTGGTCACTACTCAGGAAGCACTCGGGCAGCCGGCATTCC
 CGACCGATTCTCCGGGTCTCGGTGGGACCTGATTACAACCTGACCATCTCAAATCTGGAAAGCGGAGACTTTGGCGTG
 TACTATTGCCAGCAGTATGAGTCTTTGGGCAAGGAACCAAGTCCAGGTGGACATCAAACGCACAGTCTGCTGCACCA
 AGCGTGTTCATCTTTCCACCCTCAGATGAACAGCTGAAGTCCGGCACCCTCTGTGGTGTGCTGCTGAACAATTTCTA
 CCCCCGGGAGGCAAAGGTCCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCTGGCAATAGTCAGGAGTCAGTGACTGAAC
 AGGACAGCAAGGATCCACCTATTCTCTGTCTCTACTCTGACCCTGAGCAAAGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTA
 TGCATGTGAGGTCAACCACCAGGGACTGCGGTCACCCGTCACCAAGAGCTTCAATCGCGGAGAGTGTGATAACTCGA
G (SEQ ID NO:56)

Фиг. 54

Аминокислотная последовательность легкой цепи (VL/CL) IgG VRC01, специфичного к ВИЧ-1

MDWTWILFLVAAATRVHSEIVLTQSPGTLSPGETAHSRSTSYQYGLAWYQQRPGQAPRLVIYSGSTRAAGIPDRFSGSRW
 GPDYNLTISNLESGDFGVVYQCQYEFFGQGTQVQVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVD
 NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLRSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:57)

Фиг. 55

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь (VH-CH1) Fab, специфичного к белку оболочки СИКВ

GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGAGGATTCTGTTCTGGTCCGCCCGCTACTGGAACCTCACGCTCAGGTGCAGC
 TGGTGCAGTCAGGGTCCGAACCTGAAGAAACCAGGGGCATCTGTGAAGGTCAGTTGCAAAGCCTCAGGCTACACCCTGA
 CACGGTATGCCATGACTTGGGTGCCAGGCTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACTTACACCG
 GAAATCCAACCTATGTGCAGGGGTTACCCGGCCGATTCGTGTTTTCTCTGGACACTCCGCTCTACCCGCTTTCTGCAC
 ATTACAAGTCTGAAGGCAGAGGACACTGCCGTGTACTTCTGCCCTAGGGAAGCGGAGCAAGAGGCTTTGATTATTGG
 GGCCAGGGAACCCGGTGACAGTCAGTCCGCCAGCACAAAGGGACCCTCCGTGTTCCCACTGGCTCCCTTAGTAAA
 AGTACATCAGGGGCACTGCCGCTCTGGGATGTCTGGTCAAAGATTACTTCCCCGAACCTGTGACCGTCAGCTGGAAC
 CCGGAGCTCTGACCAGCGGGTGCATACATTTCCCGAGTCTGCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGT
 CACAGTGCCTAGTTCAAAGCCTGGGGACACAGACTATATCTGTAATGTGAACATAAGCCAAGCAACACCAAAGTGG
 CAAAAAGTGGAAACCTAAGAGCTGCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:58)

Фиг. 56

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab, специфичного к белку оболочки СИКВ

MDWTWRILFLVAAATGTHAQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLTRYAMTWVRQAPGQGLEWMGWINTYTG
 NPITYVQGFTRFVFLDTSYSTAFLHITSLKAEDTAVYFCAREGGARGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKDKVEPKSC
 (SEQ ID NO:59)

Фиг. 57

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки СНИКВ

GGATCCGCCACCATGGCATGGACCCACTGTTCTCTGCTGACTTGTGTCCTGGCGGGAGCAATTCACAGAGCG
 TCCTGACCCAGCCCCCTCTGTGTCCGGAGCACCAGGACAGCGAGTCACAATCTCTTGCCTGGAAGCTCCTCTAACAT
 TGGGGCCAGCCACGACGTGCATTGGTACCAGCAGCTGCCAGGGACCGCTCCACACTGCTGATCTATGTGAACTCTAAT
 AGGCCTAGTGGCGTCCCAGATAGATTTTCAGGGAGCAAGTCCGGCACCTCTGCTAGTCTGGCAATTACAGGACTGCAG
 GCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGCCAGAGTTACGACTCAAACCTGTCAAGGCAGCGCAGTGTTCGGAGGAGGAACT
 AAGCTGACCGTCTGGGACAGCCCAAAGCCGCTCCTCTGTGACCCCTGTTCCCCCTAGTTCAGAGGAACTGCAGGCCA
 ACAAGGCTACTCTGGTGTCTGATCTCCGACTTCTACCCTGGAGCAGTGACCGTCGCATGGAAGGCCGATAGCTCCCC
 AGTGAAAGCTGGGGTCGAGACCACAACCTCCAGCAAGCAGTCCAACAACAAGTACGCAGCCTCTAGTTATCTGTCACT
 GACACCTGAACAGTGAAGAGCCACAATCCTATTCTTGCCAAGTGACTCATGAGGGCAGTACCGTGGAAAAGACAGT
 CGCCCCAACTGAGTGTTCCTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:60)

Фиг. 58

Аминокислотная последовательность легкой цепи (VL-CL) Fab, специфичного к белку оболочки СНИКВ

MAWTPLFLFLLTCCPGGSNSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGASHDVHWYQQLPGTAPTLIIYVNSNRPSGVPDR
 FSGSKSGTSASLAITGLQAEDYDYCQSYDSNLSGSAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY
 PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID
 NO:61)

Фиг. 59

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Ig 4E10, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1

GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGAGGATTCTGTTTCTGGTCGCCGCCGCTACAGGAACTCACGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGAGCCGAAGTGAAGCGACCAGGCAGCTCCGTCAGTGTCTGCAAAGCATCTGGCGGATCATTACGACCTACGCCCTGAGCTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACGAGGACTGGAATGGATGGGAGGCGTCATCCCAGTCTGACAATTAACCTACGCCCCGATTTAGGGCAGGATCACCATTACAGCAGACCGCTCCACTTCTACCGCTATCTGGAGCTGAATAGCCTGAGACCAGAAGATACCGCAGTGTACTATTGCCCCGGGAGGGAACCACAGGATGGGGATGGCTGGAAAGCCCATCGGGGCTTTCGCACACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAAGTGTCTAGTGCCAGCACAAAGGGCCCCTCCTGTTTCCCTGGCTCCTCAAGCAAAAGTACTTCAGGAGGGACCGCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCAGTCTGCAGTCTCTGGGCTGACTCTCTGAGTTCAGTGGTCACTGTGCCTAGCTCCTCTCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGATACACAAGCCCTCCAATACCAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACTAAGTCTTGTGATAAAACCCATACATGCCACCTGTCCAGCACCTGAGCTGTGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCAAAAGACACTGATGATTAGCCGACACCTGAAGTGACTTGTGTGGTCTGGACGTACGCCAGGAGCCCCGAAGTGAAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACCTACTTATAGGGTCTGAGTGTCTGTGACCGTGTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAAGTGTCCAATAAGGCCCTGCCAGTCCCATCGAAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGCCAGCCAGCGAAGCCAGGTGTACTCTGCCTCCAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGTCTGACATGTCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGACAGCCGAAAAACAATTACAAGACTACCCCCCTGTGCTGGACAGTGTGGATCATTCTTTCTGTATTCCAAGTGAACGTGGACAAATCTCGCTGGCAGCAGGGGAACGCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCTCTGAGTCTGTCCAGGCAAGCGGGGACGCAAAAGGAGAAGCGGGTCCGGCGCTACTAAGTTCAGCCTGCTGAAACAGGCAGGGGATGTGGAGGAAAATCCTGGCCAAATGGTCTGCAGACCCAGGTGTTTATCTCACTGTCTGTGGATTAGCGGGCTTATGGCGAAATCGTCTGACTCAGAGCCCCGGAACCCAGTCTCTGAGTCTGGGAGCGCGCTACACTGAGCTGTGAGCATCACAGAGCGTGGGAACAATAAGCTGGCATGGTACCAGCAGAGGCCCTGGCCAGGCTCCAAACTGCTGATCTATGGCGCAAGTTCACGGCTAGCGGAGTGGCAGACCGCTTCTCCGGATCTGGGAGTGGCACCGATTTACTCTGACCATTAGCAGGCTGGAGCCAGAAGACTTCGCTGTGACTATTGCCAGCAGTACGGCCAGTCACTGAGCACA TTTGGACAGGGGACTAAGGTCGAAAAAAGAACCCTGGCAGCCCCAAGTGTCTTCAATTTTCCACCCCTCAGACGAGCAGCTGAAGAGTGGAAACAGCCCTCAGTCGTGTCTGTGTAACAATTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTCCAGTGGAAAGTGATAACGCTCTGCAGAGCGCAATTCAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAGGATTCAACTTATAGCCTGAGCTCCACTGACTCTGTCCAAAGCAGATTACGAGAAGCACAAGTGTATGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGACTGTCTAGTCTGTGACAAAGTCTTTTAAACAGAGGGGAGTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:62)

Фиг. 60

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Ig PG9, специфичный к белку оболочки ВИЧ-1

GGATCCGCCACCATGGACTGGACTTGGAGGATTCTGTTTCTGGTCGCCGCCGCAACTGGAACCTCACGCTGAATTTGGAC
 TGTCATGGGTCTTTCTGGTGGCCTTTCTGCGAGGGTCCAGTGCCAGAGGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGTGGTCCAA
 GCCAGGCAGTCCCTGCGACTGAGTTGTGCCGCTTCAGGGTTCGACTTTTCTAGACAGGGCATGCACTGGGTGCGGCAG
 GCACCAGGACAGGGACTGGAGTGGGTGGCTTTTCATCAAGTACGACGGAAGTGAAAAATATCATGCCGATTCACTGTGG
 GGGCGGCTGTCAATTAGCCGCGACAACCTCCAAGGATACCCTGTACCTGCAGATGAATTCCTCTGAGGGTTCGAGGACACA
 GCTACTTATTTCTGCGTGAGGGAAGCAGGCGGACCTGATTACAGAAAACGGGTATAATTAATGACTTTTACGATGGCT
 АСТАААСТАССАТАТАТGGACGTGTGGGCAAGGGAACCCAGTCACAGTGTCTAGTGCATCAACTAAAGGCCCAA
 GCGTGTTCCTCCCTGGCCCTTCAAGCAAGTCCACTTCTGGAGGAACCGCAGCACTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTT
 CCTGAGCCAGTACCCTGAGTTGGAACCTCAGGCGCCCTGACTAGCGGAGTCCATACCTTTCTGCTGTGCTGCAGTCC
 TCTGGGCTGTACAGCCTGAGTTCAGTGGTCAAGTCCCTCTCTGGGCACCCAGACATATACTGCAACGTGA
 ATCACAAGCCTAGCAATACTAAGGTGACAAAAGAGTGAACCAAAGAGCTGTGATAAAACTCATACTGCCACCTT
 GTCCAGCAGCTGAGCTGTGGGAGGCCCTTCGTGTTCTGTTTCCACCCAAAGCCAAAAGACCCCTGATGATTAGCCG
 GACACCAGAAGTCACTTGGTGGTGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCGAAAGTCAAGTTAACTGGTACGTGGATGG
 CGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACAAAACCGGGAGGAACAGTACAACCTCCACATATCGCGTGTGTCTGTCTGAC
 TGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCCAATAAGGCACTGCCAGCCCCATCGA
 GAAAACCATTTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCACGAGAACCCAGGTGTACACTGCCTCCAAGTAGGGACGAGCTGAC
 TAAGAACCAGGTCTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCCTCTGATATCGCTGTGGAGTGGGAAAAGTAATGGA
 CAGCCTGAAAACAATTACAAGACTACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTATAGCAAGCTGACCC
 TGGACAATCCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTTAGTTGCTCAGTGTGACAGGCACTGCACAATCATTACACCC
 AGAAAAGCCTGTCCCTGTCTCTGGCAAGAGGGGAAGAAAAGGAGAAGTGGGTGAGGCGCAACAACTTCAGCCTG
 CTGAAGCAGGCCGGAGATGTGGAGGAAAATCCTGGGCAATGGCTTGGACCCCTGTTCTCTGTTCTGTGACATGCT
 GTCCTGGCGGAAGCAACTCCAGTCTGCACTGACACAGCCAGCAAGTGTGTGAGGGAGCCAGGACAGAGCATACCA
 TTTCTGTAACGGCACAAGCAATGACGTGCGGGGCTACGAGTCCGTGTCTTGGTATCAGCAGCATCCTGGAAAGGCCCC
 AAAAGTCGTGATCTACGATGTACGAAACGCCCTCTGGGTGAGTAACCGATTCACTGGATCAAAGAGCGGGAATAC
 CGCTTCTCTGACAAATTAGTGGCCTGCAGGCAGAGGACGAAGGAGATTACTATTGCAAATCACTGACAAGCACTCGGCG
 CCGAGTCTTCGGAACCGGGACAAAAGCTGACTGTGCTGGGCCAGCCAAAGCTGCACCTAGCGTGACCTGTTTCCACCC
 AGTTCAGAGGAACTGCAGGCTAATAAGGCAACACTGGTGTGTCTGATCTCCGACTTCTACCCTGGCGCTGCTACTGTGG
 CCTGGAAGGCTGATAGCTCCCACTCAAAGCAGGAGTGGAAACAACCTACCCCTCCAAGCAGTCTAACACAAGTACG
 CCGCTTCTAGTTATCTGTCACTGACTCCCGAGCAGTGGAAAGCCACAATCCTATTCTTGGCAGGTGACCCATGAGGG
 CTCCACTGTCGAAAAGACCGTGGCCCTACAGAGTGTCTTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:63)

Фиг. 61

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IgG VRC01

GGATCCGCCACCATGGATTGGACATGGATTCTGTTCCTGGTCGCCCGCAACTAGAGTGCATTACAGGTGCAGCTGG
 TGCAGTCAGCCGGCAGATGAAGAAACCCGGCAGAGTATGCCAATCTCATGCCGGCTAGCGGGTACGAATTCATCG
 ACTGTACCCTGAACTGGATTAGACTGGCACCTGGGAAGAGGCCAGAGTGGATGGGATGGCTGAAACCTAGAGCGGG
 GCAGTGAATTACGCCAGACCCTGCAGGGCAGGGTCACTATGACCCGCGACGTGATTTCTGATACCGCATTCCTGGAG
 CTGCGAAGTCTGACAGTCGACGATACTGCCGTGACTTCTGCACACGGGCAAGAAGTGTGACTATAATTGGGATTTTG
 AACACTGGGGCAGGGGACACCTGTCAATGTGAGCTCCCCAAGTACTAAGGGACCCCTCAGTGTTCCTCCCTGGCCCTTC
 TAGTAAAAGTACCTCAGGAGGCACAGCCGCTCTGGGATGCCTGGTGAAGGATTAATCCCTGAGCCAGTCACCGTGAG
 TTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAAGCGGGTCCATACTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCC
 TCTGTGGTACAGTCCCAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGTAACGTCATCACAAGCCTAGCAATACTA
 AAGTGGACAAGAAAGCCGAGCCTAAGAGCTGCGAACCAAGTCTGTGATAAAAACCCATACATGCCCTCCCTGTCCAG
 CTCTGAACTGCTGGGCGGCCATCCCTGTCTCTGTTTCCACCCAAGCCAAAGACACCCCTGATGATTAGCAGGACTCC
 TGAGGTACCTGCCGTGGTCTGGACGTGTCCACGAGGACCCGAAGTCAAGTTAACTGGTACGTGGATGGCGTCGA
 AGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCGGGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGACAGTGTCT
 GCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGCCCTGCCAGTCCCATCGAGAAAAAC
 AATTTCCAAGGCAAAAGGCCAGCCAAAGGAAACCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCCCGGACGAGCTGACTAAGAA
 CCAGTCTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGATCTATCCAAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCC
 GAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTCTTCTGTATTCAAAGCTGACCGTGGATA
 AAAGCCGCTGGCAGCAGGGGAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCACAATCATTACACCCAGAAGT
 CTCTGAGTCTGTACCTGGCAAGAGGGGACGAAAACGGAGAAGCGGCAGCGGAGCTACAACTTCAGCCTGCTGAAA
 CAGGCAGGCAGCTGGAGGAAAATCTGGGCCAATGGATTGGACTTGGATTCTGTTCCTGGTGGCAGCCGCTACCAGA
 GTCCATCCGAAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCCGGAACACTGTCTCTGAGTCTGGCGAGACAGCCATCATTTCTGTGTA
 GGACTTCTCAGTACGGGAGTCTGGCATGATCAGCAGCGACCAGGACAGGCTCCTCGACTGGTCACTACTCAGGAA
 GCACTCGGGCAGCCGGCATTCCCGACCGATTCTCCGGTCTCGGTGGGACCTGATTACAACCTGACCATCTCAAATCT
 GGAAAGCGGAGACTTTGGCGTGTACTATTGCCAGCAGTATGAGTTCTTTGGCAGGGAAACCAAGTCCAGGTGGACAT
 CAAACGCACAGTCGCTGCACCAAGCGTGTTCATCTTTCCACCTCAGATGAACAGCTGAAGTCCGGCACCCCTCTGTG
 GTGTGCTGTGAACAATTTCTACCCCGGGAGGCAAGGTCCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTCGAGTCTGGCAAT
 AGTCAGGAGTCACTGACTGAACAGGACAGCAAGGATCCACCTATTCTGTCTCTACTCTGACCCCTGAGCAAAGCTG
 ATTACGAGAAGCAAAAGTGTATGCATGTGAGGTACCCACCCAGGACTGCGGTACCCGTCACCAAGAGCTTCAATC
 GCGGAGAGTGTGATAACTCGAG (SEQ ID NO:64)

Фиг. 62

