



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.26

(21) Номер заявки
201892473

(22) Дата подачи заявки
2017.05.01

(51) Int. Cl. **C12N 9/88** (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 38/51 (2006.01)

(54) IN VIVO ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХОНДРОИТИНАЗЫ И/ИЛИ ГИАЛУРОНИДАЗЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ДОСТАВКИ АГЕНТА

(31) 62/329,593; 62/336,501; 62/488,605

(32) 2016.04.29; 2016.05.13; 2017.04.21

(33) US

(43) 2019.05.31

(86) PCT/US2017/030447

(87) WO 2017/190147 2017.11.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНОВИО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Смит Тревор, Шоммер Нина,
Бродерик Кейт, Юнг Брайан,
Шультеис Кэтрин (US)**

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

(56) Xia, et al. Antisense vimentin cDNA combined with chondroitinase ABC promotes axon regeneration and functional recovery following spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett.* 2015, 590:74-79; Abstract, pg 75, col 1; pg 77, col 2; pg 78, col 1

Lin, et al. Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. *J. Neurochem.* 2008, 104(2):400-408; pg 406, col 1

Zhao, et al. Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci.* 2013, 38(6):2946-61; Abstract, pg 2961, Fig 5 and its legend; pg 2946, col 1; pg 2947, col 2

Yazdi, et al. Antibody-mediated inhibition of Nogo-A signaling promotes neurite growth in PC-12 cells. *J. Tissue Eng.* 28 January 2016, 7:2041731416629767; pg 2, col 1

Dmitrieva, et al. Chondroitinase ABC I-mediated enhancement of oncolytic virus spread and antitumor efficacy. *Clin. Cancer Res.* 2011, 17(6):1362-1372; Abstract, pg 1363, col 1; pg 1368, Fig 5 and its legend

Kim, et al. A novel single-chain antibody redirects adenovirus to IL13R alpha 2-expressing brain tumors. *Sci Rep.* 2015, 5:18133; Abstract, pg 3, last para

(57) В изобретении раскрыты способы доставки агента субъекту. Также в данном документе раскрыты способы лечения заболевания или расстройства у субъекта. Указанные способы могут включать введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, в количестве, достаточном для деградации гликозаминогликанов, и введение указанному субъекту указанного агента. Указанные способы могут дополнительно включать введение полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего гиалуронидазу.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/329593, поданной 29 апреля 2016 г., предварительной заявке США № 62/336501, поданной 13 мая 2016 г., и предварительной заявке США № 62/488605, поданной 21 апреля 2017 г., каждая из которых включена в качестве ссылки во всей их полноте.

Область техники

Данное изобретение относится к доставке агента. Данное изобретение дополнительно относится к профилактике и/или лечению заболеваний у субъекта. Способы могут включать введение полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы и агента. Способы могут включать введение полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы и агента. Способы могут включать введение полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, и агента.

Вступление

Гликозаминогликаны (GAG) представляют собой сложные линейные полисахариды внеклеточного матрикса (ECM). GAG характеризуются повторяемыми дисахаридными структурами N-замещенного гексозамина и уроновой кислоты (например, в гиалуронане (HA), хондроитинсульфате (CS), хондроитине (C), дерматансульфате (DS), гепарансульфате (HS), гепарине (H)) или галактозы (например, в кератансульфате (KS)). За исключением гиалуронана, все они ковалентно связаны с несущими белками. GAG с их несущими белками в структурном отношении называются протеогликами (PG).

Хондроитинсульфат протеоглики (CSPG) являются основными компонентами внеклеточных матриксов и имеют разнообразные функциональные роли. Например, CSPG обычно секретируются из клеток и являются структурными компонентами различных тканей человека, включая хрящ, и, как известно, участвуют в определенных клеточных процессах, таких как клеточная адгезия, рост клеток, связывание рецепторов, миграция клеток и взаимодействие с другими внеклеточными матричными составляющими. Этими другими составляющими внеклеточного матрикса могут быть ламинин, фибронектин, тенасцин и/или коллаген. Гиалуронан также является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, особенно в мягких соединительных тканях. В соединительной ткани вода гидратации, связанная с гиалуронаном, создает промежутки между тканями, создавая, таким образом, среду, способствующую перемещению и пролиферации клеток. Гиалуронан играет ключевую роль в биологических явлениях, связанных с подвижностью клеток, включая быстрое развитие, регенерацию, восстановление, эмбриогенез, эмбриологическое развитие, заживление ран, ангиогенез, регуляцию клеток, развитие клеток, клеточную дифференциацию и миграцию клеток. Продуцирование гиалуронана увеличивается в пролиферирующих клетках и может играть роль в опухолегенезе.

Внеклеточный матрикс включает белки и молекулы полисахаридов, собранные в плотной организованной сети во внеклеточном пространстве большинства тканей. В качестве одного из основных компонентов внеклеточного матрикса CSPG и гиалуронаны оказывают влияние на характеристики внеклеточного матрикса с помощью их способности формировать вязкие растворы. В данной области техники существует потребность в средствах для проникновения через ткани и внеклеточные матриксы для доставки агента субъекту безопасным, экономичным и эффективным способом.

Сущность изобретения

Аспекты данного изобретения включают способы доставки агентов субъекту, причем указанные способы включают введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, в количестве, достаточном для разрушения протеогликана хондроитинсульфата (CSPG), и введение указанного агента субъекту. CSPG может быть, например, агреканом (CSPG1), верисканом (CSPG2), нейроканом (CSPG3), CSPG4 (меланома-ассоциированный хондроитинсульфат протеогликан, NG2), CSPG5, SMC3 (CSPG6, белок структурного поддержания хромосом номер три), бревиканом (CSPG7), CD44 (CSPG8, кластер дифференцировки 44), фосфаканом или их комбинацией. Указанный агент может вызывать иммунный ответ или усиливать иммунный ответ у субъекта.

Другие аспекты данного изобретения включают способы лечения заболевания или расстройства у субъекта, причем указанные способы включают введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы; и введение субъекту агента.

В любом из способов, описанных в данном документе, агент может быть, например, полинуклеотидом, полипептидом, малой молекулой или их комбинацией. Агент может содержать полинуклеотид. Полинуклеотид может кодировать моноклональное антитело. Агент может содержать полипептид. Полипептид может содержать моноклональное антитело. Моноклональное антитело может быть экспрессировано *in vivo*. Агент может вводиться субъекту посредством электропорации (ЭП).

Полипептид хондроитиназы и моноклональное антитело могут кодироваться одним и тем же полинуклеотидом или отдельными полинуклеотидами. Полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы и полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело, может содержаться в пределах одного и того же вектора или в отдельных векторах.

В любом из описанных в данном документе способов полипептид хондроитиназы или полинуклео-

тид, кодирующий полипептид хондроитиназы, можно вводить субъекту перед введением агента. Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, можно вводить субъекту по меньшей мере за от около 15 мин до около 24 ч до введения агента. Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и агент могут вводиться субъекту одновременно. Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и агент можно вводить субъекту подкожно или внутримышечно. Полипептид хондроитиназы или полипептид хондроитиназы, кодируемый полинуклеотидом, гидролизует CSPG и приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса субъекта.

Другие аспекты данного изобретения включают также введение полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, в любом из описанных в данном документе способов в количестве, достаточном для деградации гликозаминогликана. Гликозаминогликан может содержать гиалуронан. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, можно вводить одновременно с хондроитиназой. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, можно вводить субъекту перед введением агента. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, можно вводить субъекту по меньшей мере за от около 15 мин до около 24 ч до введения агента. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, и агент могут вводиться субъекту одновременно. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, и агент можно вводить субъекту подкожно или внутримышечно.

Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и агент могут быть приготовлены в виде комбинированного препарата до введения. Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, и агент могут быть приготовлены в виде комбинированного препарата до введения.

Данное раскрытие изобретения предусматривает другие аспекты и варианты осуществления, которые будут очевидны в свете следующего подробного описания и сопутствующих фигур.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 продемонстрированы уровни (нг/мл) hIgG, измеренные с помощью ИФА между днями 0-7 в группах от 1 до 4 (мышей Balb/c, 6-7 недель). Группа 1 - ФСБ (ФСБ) и pGX9214, группа 2 - предварительная обработка гиалуронидазой и pGX9214, группа 3 - хондроитиназа и pGX9214, группа 4 - предварительная обработка гиалуронидазой/хондроитиназой и pGX9214.

На фиг. 2 продемонстрированы уровни (нг/мл) hIgG, измеренные ИФА между днями 0-7 в группах 1-4 (C57BL/6, 6-7 недель). Группа 1 - ФСБ (ФСБ) и pGX9214, группа 2 - предварительная обработка гиалуронидазой и pGX9214, группа 3 - хондроитиназа и pGX9214, группа 4 - предварительная обработка гиалуронидазой/хондроитиназой и pGX9214.

На фиг. 3 продемонстрированы уровни (нг/мл) hIgG, измеренные с помощью ИФА между днями 0-21 в группах 1-4. Группа 1 - ФСБ и pGX9214, группа 2 - предварительная обработка гиалуронидазой и pGX9214, группа 3 - хондроитиназа и pGX9214, группа 4 - предварительная обработка гиалуронидазой/хондроитиназой и pGX9214 (морская свинка линии Хартли).

На фиг. 4 продемонстрированы уровни (нг/мл) hIgG, измеренные ИФА между днями 0-21 у отдельных морских свинок в группах 1-4.

Фиг. 4А: группа 1 - ФСБ.

Фиг. 4В: группа 2 - предварительная обработка гиалуронидазой (400 ед./мл).

Фиг. 4С: группа 3 - хондроитиназа (0,5 ед./мл).

Фиг. 4D: группа 4 - гиалуронидаза 400 ед./мл и предварительная обработка хондроитиназой 0,5 ед./мл.

На фиг. 5 продемонстрировано, что хондроитиназа усиливает экспрессию hIgG, кодируемого плазмидой у мышей Balb/c.

Фиг. 5А. Уровни hIgG [нг/мл], измеренные с помощью ИФА между днями 0-7 в группах 1 и 2 (мыши Balb/c, 6-7 недель). Группа 1 - ФСБ и pGX9214, группа 2 - предварительная обработка хондроитиназой и pGX9214.

Фиг. 5В. Значительное усиление hIgG хондроитиназой на 7-е сутки. Статистика проведенная с помощью теста Манна Уитни, $P=0,0079$.

На фиг. 6 продемонстрировано, что хондроитиназа усиливает экспрессию hIgG, кодируемого плазмидой у мышей C57BL/6.

Фиг. 6А. Уровни hIgG [нг/мл], измеренные с помощью ИФА между днями 0-7 в группах 1 и 2 (мыши Balb/c, 6-7 недель). Группа 1 - ФСБ и pGX9214, группа 2 - предварительная обработка хондроитиназой и pGX9214.

Фиг. 6В. Значительное усиление hIgG хондроитиназой на 7-е сутки. Статистика проведенная с помощью теста Манна Уитни, $P=0,0079$.

На фиг. 7 продемонстрировано исследование способности различных вариантов хондроитиназы усиливать экспрессию DMAb. График представляет уровни hIgG (нг/мл), измеренные с помощью ИФА

на 7-е сутки в группах 1-4 (Balb/c). Мышей обрабатывали либо ФСБ (контрольная группа 1), хондроитиназой АС, пригодной для медицинского применения хондроитиназой АВС, либо рекомбинантным белком GALNS. Все группы получали инъекцию рGX9203 с последующей электропорацией. Статистика проводилась с помощью теста Краскела-Уоллиса, ** $P=0,0026$.

На фиг. 8 продемонстрировано, что увеличение дозы хондроитиназы АВС дополнительно усиливает экспрессию белка с ДНК. Мышей Balb/c обрабатывали увеличивающимися дозами хондроитиназы АВС за 30 мин до введения пДНК (рGX9207) и электропорации. Уровни hIgG измеряли с помощью ИФА. Статистику проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса, * $P=0,0357$.

На фиг. 9 продемонстрировано, что введение хондроитиназы приводит к усиленной экспрессии флуоресцентного белка.

Фиг. 9А. Левая и правая задние конечности мышей Balb/c, обработанных либо хондроитиназой, либо ФСБ в скелетную мышцу. Визуализацию экспрессии репортерного белка проводили с помощью визуализатора флуоресценции (Protein Simple).

Фиг. 9В. Произвольные единицы интенсивности флуоресценции параллельной экспрессии репортерного гена количественно определялась с помощью программного обеспечения AlphaView SA. Статистика, по тесту Манна-Уитни, $P=0,0022$.

На фиг. 10 продемонстрирована репрезентативная гистопатология мышечной скелетной мышцы задней конечности, проведенная путем окрашивания Н&Е. На верхних панелях продемонстрирована ткань, обработанная только ФСБ (контроль) или только хондроитиназой АВС. Предварительно обработанные (за 30 мин) хондроитиназой или ФСБ (контроль) мышцы перед доставкой пДНК представлены на нижних фигурах. Результаты были проанализированы с помощью сканера слайдов и программного обеспечения CaseViewer (3DHISTECH). Масштаб = 200 мкм.

Фиг. 11 демонстрирует, что хондроитиназа АВС усиливает экспрессию hIgG, кодируемого плазмидой, у новозеландских кроликов (9 недель).

Фиг. 11А. Представлены уровни hIgG [нг/мл], измеренные с помощью ИФА между днями 0 и 6 в группе 2 (предварительно обработанная хондроитиназой) и в группе 1 (контроль ФСБ).

Фиг. 11В. График демонстрирует уровни hIgG с 6-х суток, измеренные с помощью ИФА. Статистика проводилась по тесту Манна-Уитни, $P=0,0043$.

На фиг. 12 продемонстрирован эффект комбинированного препарата хондроитиназы и пДНК (рGX9207) у мышей (Balb/c; 14 мышей на группу). На графике продемонстрированы уровни hIgG [нг/мл] с 6-х суток, измеренные с помощью ИФА. Статистика по тесту Манна Уитни, **** $p<0,0001$.

На фиг. 13 продемонстрировано, что введение хондроитиназы приводит к усилению экспрессии флуоресцентного белка.

Фиг. 13А, Левая и правая задние конечности мышей Balb/c, обработанных либо хондроитиназой, либо ФСБ в скелетную мышцу. Визуализацию экспрессии репортерного белка осуществляли с помощью системы визуализации флуоресценции.

Фиг. 13В. Произвольные единицы интенсивности флуоресценции параллельной экспрессии репортерного гена количественно определялась с помощью программного обеспечения AlphaView SA. Статистика по тесту Манна Уитни, ** $P=0,0004$.

На фиг. 14 продемонстрирован эффект комбинированного препарата хондроитиназы с пДНК (рGX9207) у кроликов (новозеландских кроликов, 6 кроликов на группу).

Фиг. 14А. График демонстрирует уровни hIgG в сыворотке [нг/мл] с 0 до 5 суток, измеренные с помощью ИФА. Сравнение групп 1, 2 и 4

Фиг. 14В. Уровни hIgG в сыворотке крови всех групп, измеренные на 5-е сутки. Статистика по тесту Манна Уитни, **** $p<0,0001$.

На фиг. 15 продемонстрирован электрофорез в агарозном геле образцов комбинированного препарата хондроитиназы (2,5 ед./мл)/пДНК (рGX9207, 250 нг на лунку).

Фиг. 15А. Дорожки с четными числами представляют образцы пДНК, содержащие хондроитиназу АВС, дорожки с нечетными номерами относятся к отрицательным контролям с ФСБ. Дорожки 1-2: нет инкубации образца перед гелем - электрофорезом, дорожки 3-4: инкубация при комнатной температуре (21°C) в течение 10 мин, дорожки 5-6: 6°C, 120 мин, дорожки 7-8: КТ (RT), 120 мин, дорожки 9-10: 6°C, 24 ч, дорожки 11-12: КТ, 24 ч, дорожки 13-14: 6°C, 10 мин. М1 = маркер.

Фиг. 15В. Маркер для суперспиральной ДНК, 2-10 т.п.о. (New England Biolabs).

На фиг. 16 продемонстрировано, что хранение комбинированного препарата хондроитиназы/пДНК в течение 24 ч не влияет на усиленную экспрессию генов у мышей Balb/c. График представляет уровни hIgG в сыворотке (нг/мл), измеренные с помощью ИФА на 6-е сутки. Мышей обрабатывали комбинированным препаратом в скелетную мышцу левой задней конечности, а электропорацию проводили через 1 мин после инъекции препарата. До начала обработки образцы комбинированного препарата инкубировали 10, 120 мин и 24 ч при температуре 4°C. Контроли: мышей предварительно обрабатывали либо хондроитиназой либо ФСБ, за 30 мин до введения пДНК и электропорации. Статистика, выполненная по критерию Краскела-Уоллиса, **** $P=0,0001$.

На фиг. 17 продемонстрированы уровни (нг/мл) hIgG, измеренные с помощью ИФА между днями 0-

28 в группах 1, 2 и 3. Группа 1 обрабатывалась pDVSF-1 и предварительно обрабатывалась гиалуронидазой, группа 2 обрабатывалась только pDVSF, а группа 3 обрабатывалась только ФСБ.

На фиг. 18 продемонстрированы титры, анти-hIgG связывания групп 1 и 2.

Фиг. 19 демонстрирует средний ($\pm$ СОС) ответ ИФН- γ (пятен на миллион) в МКПК групп 1-3 на пептидов NP (нуклеопротеина) вируса гриппа в примере 2.

На фиг. 20 продемонстрирован титр связывающих IgG антител против NP вируса гриппа для групп 1-3 в примере 2.

На фиг. 21 продемонстрирована модель острой пневмонии при инфекции *P. aeruginosa*. Электропорация плазмидных ДНК анти-PcrV или DMAb антитела 1-2 дает экспрессию активного IgG у мышей. Сильная защитная активность наблюдается как для антипсевдомонадного DMAb, так и для DMAb-антитела 1-2 IgG.

На фиг. 22 продемонстрировано количественное определение с помощью IgG экспрессии DMAb в сыворотке. Сыворотку оценивали на экспрессию DMAb до инфицирования *P. aeruginosa*. Несмотря на аналогичные профили выживаемости, экспрессия анти-PcrV DMAb была в 5 раз больше, чем DMAb-антитела 1-2.

На фиг. 23 продемонстрировано снижение нагрузки на орган анти-псевдомонадным DMAb. DMAb-антитело 1-2 и IgG уменьшают нагрузку в легких. Анти-PcrV и DMAb-антитело 1-2 значительно снижают системное распространение бактерий. Ткани собирали через 24 ч после инфицирования. LOD (ПО) = предел обнаружения; * $P < 0,05$ по Краскел-Уоллис и тест множественного сравнения Данн против контрольного IgG DMAb.

На фиг. 24 продемонстрирована гистология острой пневмонии через 48 ч после инфицирования (H&E). А. Контрольные IgG в легких демонстрируют области тяжелых альвеолярных инфильтратов, состоящих из нейтрофилов и макрофагов и кровоизлияния (10 $\times$). С. Мягкая пневмония и редкие бронхиальные дебри (10 $\times$). Е. DMAb-антитело 1-2 ДНК-группа с мягким альвеолитом (10 $\times$). В, D, F. Вставки при 40 $\times$ из А, С, D соответственно.

На фиг. 25 продемонстрировано, что DMAb-антитело 1-2 проявляет защитную активность, зависящую от концентрации. А. Животные получали ДНК в 1, 2 или 3 местах до ЭП. В. Количественная оценка сывороточного IgG. * Указывает на $P < 0,05$, полученное с помощью логрангового теста.

На фиг. 26 продемонстрировано, что субтерапевтические дозы DMAb-антитела 1-2 и меропенема (МЕМ) проявляют повышенную активность против пневмонии при инфекции *P. aeruginosa*. А Животные получали ДНК в 1, 2 или 3 места до ЭП. В. Количественная оценка сывороточного IgG. * Указывает на $P < 0,05$, полученное с помощью логрангового теста.

На фиг. 27 продемонстрирован средний ($\pm$ СОС) ответ ИФН- γ (пятна на миллион) в спленocyтах на эпитопы пептидов NP55 и NP147 через 14 суток после иммунизации pGX2013.

На фиг. 28 продемонстрированы титры связывания анти-NP IgG для групп 7 и 14 суток после иммунизации pGX2013.

На фиг. 29 продемонстрирована экспрессия *in vitro* человеческого IgG анти-MERS-CoV. (а) Диаграммная иллюстрация плазмидной ДНК pMERS DMAb анти-MERS-CoV-антигена. CMV-промотор, расположенный выше последовательностей тяжелой и легкой цепей антител, разделенных участками расщепления фурином и 2А. (b и c) Культуры клеток 293Т трансфицировали 1 мкг/мл pVax или pMERS и культуральные супернатанты собирали через 48 ч. (b) Уровни IgG человека в супернатанте анализировали с помощью ИФА. (c) Связывание IgG с антигеном MERS CoV измеряли с помощью ИФА.

На фиг. 30 продемонстрирована усиленная экспрессия *in vivo* DMAb у мышей BALB/c. От 6,25 до 100 мкг pMERS вводили в ТА мышцу мышей BALB/c (4-8 мышей на группу), (а) только инъекцией (без ЭП (электропорация)), (b) инъекцией с ЭП (ЭП) и (c) инъекцией с ЭП в мышцу, обработанную ГИА (гиалуронидаза) (ЭП+ГИА). (а-с) Уровни человеческого IgG в сыворотке крови были количественно определены (точки данных представляют собой среднее значение ($\pm$ СОС) с помощью ИФА на 6-е сутки после доставки pMERS. (d) связывание антигена MERS CoV реципрокных разведений сыворотки, измеренное с помощью ИФА на сутки 0 и сутки 6 после доставки pMERS. (e) ТА мышцы (поперечные мышцы живота) мышей BALB/c были отобраны через 72 ч после введения репортерного гена pRFP (25 мкг) с протоколом, используемым в (а), (b) или (c) или без введения репортерного гена во вставки 1-4 соответственно. Изображения иллюстрируют экспрессию репортерного гена. Иммунофлуоресцентные изображения срезов ТА мышцы, обработанных pMERS или pVax (100 мкг), доставленных с ЭП+ГИА, и собранных через 72 ч после этого (f). hIgG детектировали античеловеческим IgG, а затем FITC-меченым вторичным антителом. Краситель DAPI - синий. Панель 1. Без обработки. Панель 2. pVax. Панели 3 и 4. pMERS. Панели 1-3 демонстрируют изображение поперечного сечения перпендикулярно мышечным волокнам, а на панели 4 изображение сечения вдоль мышечных волокон.

На фиг. 31. продемонстрирована увеличенная и устойчивая экспрессия DMAb у мышей Crl:Nu-Foxn1nu. От 6,25 до 100 мкг pMERS вводили с ЭП в предварительно обработанную ГИА ТА мышцу мышей Crl:Nu-Foxn1nu (8 мышей на группу). hIgG в сыворотке определяли количественно с помощью ИФА в сутки от 0 до 160 (а). (b) 100 мкг pMERS вводили, как в (а) в 1 (левая ТА), 2 (правая и ле-

вая ТА), 3 (правая и левая ТА и левый квадрицепс) или 4 (правая и левая ТА и левый и правый квадрицепсы) мышцы. hIgG в сыворотке определяли количественно с помощью ИФА на 21 сутки.

На фиг. 32 продемонстрирована экспрессия DMAb *in vivo* у новозеландского белого кролика. (a) Экспрессия репортерного гена в срезах ТА мышц кролика через 72 ч после доставки rGFP (0,2 мг) с помощью ЭП в ФСБ- (верхняя панель) или ГИА- (нижняя панель) обработанной мышце. (b и c) 2 мг rMERS вводили с помощью ЭП в квадрицепс (предварительно обработанный ФСБ или ГИА) кроликов (6 на группу). hIgG в сыворотке определяли количественно в сутки 3, 5 и 6 (a) и измеряли связывание антигена MERS CoV (b) с помощью ИФА на 6-е сутки после доставки.

(c) 2 мг rMERS вводили с помощью ЭП при напряжении от 20 до 65 В в квадрицепс (обработанный ГИА) кроликов (6 на группу), а сывороточный hIgG определяли количественно на 5-е сутки после доставки, (c и d) Значения отображаются как среднее значение $\pm$ СОС (n=6/группа). **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, а ns = несущественный. Значения p представляют собой непарные двусторонние тесты Манна-Уитни.

На фиг. 33 продемонстрирована экспрессия DMAb *in vivo* в макаках резус. 13,5 мг rMERS вводили с ЭП в квадрицепсы (предварительно обработанные ГИА) макак резус (5 на группу). hIgG в сыворотке определяли количественно (a) и измеряли связывание антигена MERS CoV с помощью ИФА в сутки от 0 до 35 (b) и реципрокного разведения сыворотки на сутки 17 (c) для каждого макака резус, (d) Ответ антителами на человеческий IgG (ADA) измеряли прямым ИФА в сыворотке макак резус. (e). Продemonстрирована взаимосвязь уровней DMAb и уровней связывания антител против человеческого IgG в сыворотке. Графики построены по точкам данных (hIgG (мкг/мл) с соответствующим ADA (OD450 нм)) после и при достижении пикового значения hIgG (мкг/мл) в каждой макаке резус. Значение R и коэффициент корреляции Спирмена были рассчитаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.

Фиг. 34 демонстрирует кинетику экспрессии DMAb *in vivo* у мышей BALB/c. (a-c) от 6,25 до 100 мкг rMERS вводили в ТА мышцу мышей BALB/c (4-8 мышей на группу), (a) только инъекцией (без ЭП), (b) инъекцией с ЭП (ЭП) и (c) инъекцией с ЭП в мышцу, обработанную ГИА (ЭП+ГИА). (a-c) Уровни в сыворотке IgG человека были определены количественно (точки данных представляют собой среднее значение $\pm$ СОС) с помощью ИФА в сутки от 0 до 14 после доставки rMERS.

На фиг. 35 продемонстрирован ответ на антитело человеческого IgG у rMERS-обработанных мышей BALB/c. Ответ антителами на человеческий IgG (ADA) измеряли прямым ИФА в сыворотке мышей BALB/c в сутки от 0 до 14 после доставки rMERS с помощью ЭП.

На фиг. 36 продемонстрирован скрининг реагентов для доставки пДНК, известных способностью усиливать экспрессию генов. 100 мкг rMERS вводили в ТА мышцу мышей BALB/c (5 мышей на группу). Целевая ТА мышца была предварительно обработана за 30 мин до доставки rMERS ФСБ, ГИА, 7% сахарозой, коллагеназой D, эластазой или MMP7 в группах 1, 2, 5, 7, 8 и 9 соответственно. rMERS была приготовлена в виде комбинированного препарата с поли-L-глутаминовой кислотой (группа 3), или темполом (Tempol) (группа 4), или (ОН) 3D3 (группа 6), и предварительной обработки не было. Уровни человеческого IgG в сыворотке определяли количественно (точки данных представляют собой среднее значение $\pm$ СОС) с помощью ИФА на 6-е сутки после доставки rMERS.

Фиг. 37 демонстрирует экспрессию DMAb у кроликов. (a и b) 2 мг rGX9207 вводили с ЭП в квадрицепс (предварительно обработанный ГИА) новозеландских белых кроликов (6 на группу). hIgG в сыворотке (a) и связывание с IgG человека (ADA) (b) анализировали с помощью ИФА в сутки от 0 до 10.

На фиг. 38 продемонстрировано исследование комбинированного препарата ГИА с пДНК у кроликов. Шесть новозеландских белых кроликов в группе. 2 мг rGX9207 в левом квадрицепсе. Два места. ГИА (Intropharma) 200 ед. на место. CELLECTRA®-5P пДНК/ГИА комбинированный препарат приготовленный за 5 мин до введения. Кровь отбирали на 5-е сутки. Номер эксперимента INO-16-158b.

На фиг. 39 продемонстрирован комбинированный препарат ГИА с пДНК у кроликов с задержкой ЭП. Шесть новозеландских белых кроликов в группе. 2 мг rGX9207 в левом квадрицепсе. Два места. ГИА (Intropharma) 200 ед. на место. CELLECTRA®-5P пДНК/ГИА комбинированный препарат приготовленный за 5 мин до введения. Кровь отбирали на 5-е сутки. Номер эксперимента INO-16-158a.

Фиг. 40 демонстрирует комбинированный препарат ГИА с пДНК в макаках резус. rGX9207 (rMERS) доставлен в квадрицепс с помощью CELLECTRA®-5P. 4 места. 1 мг пДНК на участок. Intropharma (ГИА очищенный из семенников быка). пДНК/ГИА комбинация приготовлена за 5 мин до введения. Номер эксперимента INO-16-194.

На фиг. 41 продемонстрирована оптимизация задержки ЭП с помощью HyleneX (рекомбинантная гиалуронидаза человека). rGX9207 ГИА комбинированный препарат. Два Тх в левом квадрицепсе. Продemonстрированы уровни в сыворотке hIgG на 5-е сутки. Номер эксперимента INO-16-279.

На фиг. 42 продемонстрирован эффект комбинированного с ГИА препарата на уменьшение дозы ДНК-вакцины. Мыши BALB/c. Сутки 0 IM вируса гриппа rNP CELLECTRA-3P, сутки 7 и 14 ИФА. Номер эксперимента INO-16-218.

На фиг. 43 продемонстрировано увеличение иммунного ответа на опухолевый антиген с помощью препарата ДНК-вакцины с ГИА. Мыши B6. Сутки 0 и 14 IM pmTERT CELLECTRA®-3P, сутки 21

элиспот (ELISpot) ИФН-гамма против пулов нативных пептидов TERT мыши. Номер эксперимента INO-17-018.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к композициям и способам для доставки агента субъекту. Указанные способы могут включать введение субъекту агента и полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, в количестве, достаточном для гидролиза сульфатных групп CSPG. Хондроитиназа может гидролизовать сульфатные группы CSPG у субъекта. Эта дезорганизация может привести к дезорганизации внеклеточного матрикса и тем самым облегчить доставку агента. Указанные способы могут дополнительно включать введение субъекту полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы.

Данное изобретение также относится к введению гиалуронидазы вместе с агентом субъекту. Гиалуронидазу можно вводить в виде полипептида или в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей гиалуронидазу или их фрагмент или вариант. Гиалуронидаза может способствовать доставке агента субъекту. В результате гиалуронидаза может усиливать иммунный ответ у субъекта и/или усиливать экспрессию агента у субъекта.

1) Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае конфликта настоящий документ, включая определения, будет иметь преимущество. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или для тестирования данного изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки в полном объеме. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Термины "содержит(ат)", "включает(ют)", "имеющий(е)", "имеет(ют)", "может(гут)", "вмещает(ют)" и их варианты, используемые в данном документе, используются в качестве открытых переходных фраз, терминов или слов, которые не исключают возможности дополнительных действий или структур. Формы единственного числа также подразумевают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Данное изобретение также рассматривает другие варианты осуществления, "включающие/содержащие", "состоящие из" и "состоящие в основном из", варианты осуществления или элементы, представленные в данном документе, независимо от того, явно они упомянуты или нет.

Термин "около", используемый в данном документе для применения к одному или нескольким представляющим интерес значениям, относится к значению, которое аналогично указанному эталонному значению. В некоторых аспектах термин "около" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее в любом направлении (больше или меньше) от указанного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% возможного значения).

"Антитело" может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, или их фрагменты, или их производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела и их производные. Антитело может быть антителом, выделенным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, моноклональным антителом, аффинно очищенным антителом или их смесью, которые обладают достаточной специфичностью связывания с желаемым эпитопом или полученной из него последовательностью. Антитело может быть синтетическим антителом, как описано в данном документе.

"Антителный фрагмент" или "фрагмент антитела", как взаимозаменяемо используется в данном документе, относится к части интактного антитела, содержащего антигенсвязывающий участок или вариативный участок. Указанная часть не включает константные домены тяжелой цепи (т.е. C_H2, C_H3 или C_H4, в зависимости от изотипа антитела) Fc-области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, 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 вариативный домен легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR вариативного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну вариативную область тяжелой цепи, и одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR вариативного участка тяжелой цепи.

"Фрагмент", как используется в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего. Фрагменты могут быть фрагментами ДНК, выбранными по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют фрагменты белка, представленные ниже. "Фрагмент" также может относиться к полипептидной последовательности или ее части, которая способна вызывать иммунный ответ у млекопитающего.

"Иммунный ответ", как используется в данном документе, означает активацию иммунной системы хозяина, например млекопитающего, в ответ на введение антигена. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа или того и другого.

"Функционально связанный", как используется в данном документе, означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен в 5' положении (вышерасположенный) или в 3' положении (нижерасположенный) по отношению к гену под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между этим промотором и этим геном, который он контролирует в гене, из которого получен промотор. Как известно в данной области техники, изменение этого расстояния может быть выполнено без потери промоторной функции.

"Пептид", "белок" или "полипептид", как используется в данном документе, может означать связанную последовательность аминокислот и он может быть природным, синтетическим или модификацией или сочетанием натурального и синтетического.

"Полинуклеотид", или "олигонуклеотид", или "нуклеиновая кислота", как используется в данном документе, означает по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных друг с другом. Полинуклеотид может быть одноцепочечным или двухцепочечным или может содержать участки как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Полинуклеотидом может быть ДНК, как геномная, так и кДНК, РНК или гибрид. Полинуклеотид может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин, изогуанин и синтетические или неприродные нуклеотиды и нуклеозиды. Полинуклеотиды могут быть получены методами химического синтеза или рекомбинантными методами.

"Промотор", как используется в данном документе, означает синтетическую или природным путем полученную молекулу, которая способна обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или несколько определенных регуляторных последовательностей транскрипции для дальнейшего усиления экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии того же. Промотор может также содержать дистальный энхансер или репрессорные элементы, которые могут быть расположены на отдалении в несколько тысяч пар оснований от участка начала транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включающих вирусные, бактериальные, грибковые, растения, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию компонента гена конститутивно или дифференциально по отношению к клетке, ткани или органу, в котором происходит экспрессия, или по отношению к стадии развития, при которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типичные примеры промоторов включают промотор T7 бактериофага, промотор T3 бактериофага, промотор SP6, промотор lac-оператора, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор IE CMV, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40, и промотор IE CMV.

"Субъект", как используется в данном документе, может обозначать млекопитающее. Млекопитающим может быть человек, шимпанзе, собака, кошка, лошадь, корова, мышь или крыса.

"Лечение" или "лечить", как используется в данном документе, может означать защиту животного от заболевания посредством предотвращения, подавления, репрессирования или полного устранения заболевания. Предотвращение заболевания может включать введение композиции по данному изобретению животному до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение композиции по данному изобретению животному после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Репрессирование заболевания включает введение композиции по данному изобретению животному после клинического проявления заболевания.

"Вариант", как используется в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, означает (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент указанной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) нуклеиновую кислоту, которая по существу идентична указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементом или последовательностями, по существу идентичными ей.

"Вариант" может далее быть определен как пептид или полипептид, который отличается в аминокислотной последовательности по вставке, делеции или консервативной замене аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Типичные примеры "биологической активности" включают способность связываться специфическим антителом или стимулировать иммунный ответ. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична указанному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность.

Консервативная замена аминокислоты, т.е. замена аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), признана в данной области техники как имеющая типично незначительное изменение. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, в частности, с учетом гидропатического индекса аминокислот, как понимается в данной области техники (Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132). Гидропатический индекс аминокислоты основан на учете ее гидрофобности и заряда. В данной области известно, что аминокислоты с подобными гидропатическими индексами могут быть замещены

(друг другом) с сохранением функции белка. В одном аспекте замещены аминокислоты, имеющие гидропатические индексы ± 2 . Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замещений, которые приведут к сохранению биологических функций белков. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезную меру, которая, как сообщается, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Замена аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может приводить к пептидам, сохраняющим биологическую активность, например иммуногенность, как понимается в данной области. Замены могут быть выполнены с использованием аминокислот, имеющих значения гидрофильности в пределах ± 2 друг от друга. Как индекс гидрофобности, так и значение гидрофильности аминокислот зависят от конкретной боковой цепи этой аминокислоты. Согласуется с этим наблюдением то, что аминокислотные замены, которые совместимы с биологической функцией, как полагают, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, что видно из гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера, и других свойств.

Вариантом может быть последовательность нуклеиновой кислоты, которая по существу идентична по всей длине полной последовательности гена или его фрагмента. 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% идентична по всей длине последовательности гена или его фрагмента. Вариантом может быть аминокислотная последовательность, которая по существу идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

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% идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

"Вектор", как используется в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может быть вирусным вектором, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или искусственной хромосомой дрожжей. Вектор может быть ДНК или РНК-вектором. Вектор может быть самореплицирующимся внехромосомным вектором и предпочтительно представлять собой ДНК плазмиду.

Для декларирования числовых диапазонов в данном документе каждое промежуточное число в них с одинаковой степенью точности явно предполагается. Например, для диапазона 6-9 числа 7 и 8 предусматриваются дополнительно к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 - числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0 явно предусматриваются.

2) Использование хондроитиназы для улучшения доставки агента.

Данное изобретение относится к введению хондроитиназы вместе с агентом субъекту. Хондроитиназа может вводиться в виде полипептида или в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей хондроитиназу, или их фрагмента или варианта. Хондроитиназа может облегчить доставку агента субъекту. В результате хондроитиназа может усиливать иммунный ответ у субъекта и/или усиливать экспрессию агента у субъекта.

а) Хондроитиназа.

Хондроитиназу или ее фрагмент можно вводить субъекту. Хондроитиназа может быть любой хондроитиназой. Например, хондроитиназа может представлять собой N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу или хондроитин-ABC-лиазу. Хондроитиназа может быть хондроитиназой AC. Хондроитиназа может быть рекомбинантной хондроитиназой. Хондроитиназа может катализировать гидролиз протеогликана хондроитинсульфата (CSPG). Хондроитиназа может гидролизовать 4-сульфатные группы единиц N-ацетил-D-галактозамин 4-сульфата хондроитинсульфата и/или дерматансульфата.

Хондроитиназа может гидролизовать 4-сульфатные группы N-ацетилглюкозамин 4-сульфата. Хондроитиназа может гидролизовать 6-сульфатные группы единиц N-ацетил-D-галактозамина 6-сульфата хондроитинсульфата и единиц D-галактоз 6-сульфата кератинсульфата. Хондроитин-ABC-лиаза может катализировать деградацию полисахаридов, содержащих 1,4-бета-D-гексозаминильные и 1,3-бета-D-глюкуронозилные или 1,3-альфа-L-идуронозилные связи в дисахаридах, содержащие 4-дезоксид-бета-D-глюк-4-энуринозилные группы. Хондроитин-ABC-лиаза может действовать на хондроитин 4-сульфат, хондроитин 6-сульфат и дерматансульфат.

CSPG может быть, например, агреканом (CSPG1), веришканом (CSPG2), нейроканом (CSPG3), CSPG4 (меланома-ассоциированный хондроитинсульфат протеогликан, NG2), CSPG5, SMC3 (CSPG6, белок структурной поддержки хромосом номер 3), бревиканом (CSPG7), CD44 (CSPG8, кластер дифференцировки 44), фосфаканом или их комбинацией.

Катализируя гидролиз CSPG, составляющих внеклеточного матрикса (ECM), хондроитиназа снижает вязкость CSPG и внеклеточного матрикса, тем самым увеличивая проницаемость ткани. Введение хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего хондроитиназу, может приводить к гидролизу CSPG, что приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса субъекта. Дезорганизация внеклеточного матрикса субъекта, таким образом, может облегчить доставку или введение агента.

Хондроитиназа может быть хондроитиназой, полученной из бактерии. Например, бактерией может быть *Flavobacterium heparinum*. Хондроитиназа может быть рекомбинантно продуцирована в бактерии.

В некоторых вариантах осуществления может быть введен полипептид хондроитиназы или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления может быть введен полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы или его фрагмент. Полипептид хондроитиназы может быть экспрессирован из полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы *in vivo*.

3) Использование гиалуронидазы.

Указанные способы могут также включать в себя дальнейшее введение субъекту полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, в количестве достаточном для разложения гликозаминогликана, например гиалуронана. Введение хондроитиназы и гиалуронидазы может приводить к аддитивному или синергетическому эффекту на экспрессию агента, иммунный ответ или концентрацию агента в сыворотке субъекта, например. Концентрация агента, обнаруженная в сыворотке субъекта, подвергнутого комбинированной обработке хондроитиназой и гиалуронидазой, может быть выше по сравнению с сывороточными уровнями агента у субъекта, обработанного, например, одним ферментом - хондроитиназой или гиалуронидазой.

Данное изобретение также относится к введению гиалуронидазы вместе с агентом субъекту. Гиалуронидазу можно вводить в виде полипептида или в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей гиалуронидазу или их фрагмента или варианта. Гиалуронидаза может способствовать доставке агента субъекту. В результате гиалуронидаза может усиливать иммунный ответ у субъекта и/или усиливать экспрессию агента у субъекта. Указанный способ введения гиалуронидазы субъекту может включать или не включать введение хондроитиназы. Агент может быть любым агентом, как описано в данном документе. Использование гиалуронидазы может быть в сочетании с любым(и) агентом(ами), описанным(ми) сроками введения, способом введения, способом обработки или способом доставки, как описано в данном документе.

Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и агент, можно вводить субъекту одновременно. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, можно вводить одновременно с полипептидом хондроитиназы или полинуклеотидом, кодирующим полипептид хондроитиназы, и агентом. Указанные способы доставки и время введения могут быть такими же или аналогичными способом, описанным в данном документе. См., например, раздел 4b).

Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и агент, можно вводить субъекту последовательно. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и полипептид хондроитиназы, или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и агент могут быть введены субъекту последовательно. Указанные способы доставки и время введения могут быть такими же или аналогичными способом, описанным в данном документе. См., например, раздел 4b). Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, и агент могут быть приготовлены в виде комбинированного препарата до введения. Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, могут быть приготовлены в виде комбинированного препарата до введения. Любое приготовление комбинированного препарата полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, и агента может иметь место, например, за 1, 5, 10, 15, 20, 45 мин, 1, 5, 10, 24 ч, 5, 7, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 суток, 1 год, 400 суток, 1,5 или за 2 года до введения. Любое приготовление комбинированного препарата полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, и агента может иметь место, например, за 1, 5, 10, 15, 20, 45 мин, 1, 5, 10, 24 ч, 5, 7, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 суток, 1 год, 400 суток, 1,5 или 2 года до введения. Любое приготовление комбинированного препарата полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, и агента может иметь место, например, за 1, 5, 10, 15, 20, 45 мин, 1, 5, 10, 24 ч, 5, 7, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 суток, 1 год, 400 суток, 1,5 или 2 года до введения. Любое приготовление комбинированного препарата полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, и полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, может иметь место, например, за 1, 5, 10, 15, 20, 45 мин, 1, 5, 10, 24 ч, 5, 7, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 суток, 1 год, 400 суток, 1,5 или 2 года до введения.

Хондроитиназу и/или гиалуронидазу и/или агент можно вводить посредством электропорации (ЭП), например, способом, описанным в патенте США № 7664545, содержание которого включено в данный документ путем ссылки. Указанная электропорация может осуществляться способом и/или устройством, описанным в патентах США № 6302874; 5676646; 6241701; 6233482; 6216034; 6208893; 6192270; 6181964; 6150148; 6120493; 6096020; 6068650 и 5702359, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Электропорацию можно осуществлять с помощью мало-

инвазивного устройства. Электропорация может происходить до или после введения хондроитиназы и/или гиалуронидазы и/или агента, например. Электропорация может происходить одновременно с введением хондроитиназы, и/или гиалуронидазы и/или агента, например. Может существовать задержка между введением хондроитиназы, гиалуронидазы, агента или любого их комбинированного препарата и ЭП. Например, ЭП можно проводить через 5, 10, 20, 30, 45 с, 1, 2, 3, 4 или 5 мин после введения хондроитиназы, гиалуронидазы, агента, антигена или любого их комбинированного препарата.

Термин гиалуронидаза может подразумевать полипептид, который деградирует гиалуроновую кислоту.

"Гиалуроновая кислота" и "гиалуронан" используются в данном документе взаимозаменяемо. Гиалуронан представляет собой анионный, несulfатированный гликозаминогликан. Гиалуронан представляет собой полимер дисахаридов, каждый дисахарид содержит D-глюкуроновую кислоту и D-N-ацетилглюкозамин, связанные посредством чередующихся β -1,4- и β -1,3-гликозидных связей. Гиалуронан может включать в себя тысячи дисахаридных повторов в длину. Гиалуронан может иметь молекулярную массу от около 1 до около 5000 кДа или более.

Гиалуронидазы представляют собой семейство гликозаминогликановых эндогликозаминидаз, в которых глутаматный остаток в гиалуронидазе гидролизует β -1,4 связи гиалуронансulfатов и хондроитинсulfатов с помощью каталитического механизма на основе кислоты.

Катализируя гидролиз гиалуронана, который является составляющим внеклеточного матрикса (ECM), гиалуронидаза снижает вязкость гиалуронана и внеклеточного матрикса, тем самым увеличивая проницаемость тканей. Введение гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего гиалуронидазу, может приводить к гидролизу гиалуронана, что приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса субъекта. Таким образом, дезорганизация внеклеточного матрикса субъекта может облегчить доставку или введение агента.

Гиалуронидаза может представлять собой гиалуронидазу происходящую из млекопитающих, гиалуронат-гликаногидролазу рептилий или перепончатокрылых, гиалуронат-гликаногидролазу из слюнной железы пиявки или гиалуронидазу бактериального происхождения. Бактериальные гиалуронидазы могут включать, например, стрептококковые, пневмококковые и клостридиальные гиалуронидазы.

4) Агент.

Агент может вводиться субъекту. Агент может содержать полипептид, полинуклеотид, малую молекулу, антиген или любую их комбинацию. Агент может содержать рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию, как описано, например, в документе PCT/US2014/070188, который включен в данный документ посредством ссылки. Агент может представлять собой закодированное в ДНК моноклональное антитело (DMAb).

i) Полипептид.

В некоторых вариантах осуществления агент содержит полипептид. Полипептид может содержать антитело, антиген, фермент или другой белок или любую их комбинацию. Полипептид может быть получен из млекопитающего, животного, бактериального или вирусного источника. Полипептид может представлять собой гетерологичный полипептид, т.е. являющийся производным от разных источников или организмов. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

(1) Антитело.

Как описано выше, полипептид может содержать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело может связываться или реагировать с желаемой молекулой-мишенью, которая может представлять собой антиген, который более подробно описан ниже, лиганд, включающий лиганд рецептора, рецептор, включающий лигандсвязывающий участок на рецепторе, лиганд-рецепторный комплекс и маркер, включая маркер рака.

Антитело может содержать набор участков, определяющих комплементарность ("CDR") легкой и тяжелой цепей, соответственным образом расположенные между набором каркасных участков ("FR") тяжелой и легкой цепей, которые обеспечивают опору для CDR и определяют пространственную взаимосвязь CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельных V-участка тяжелой или легкой цепи. В направлении от N-конца тяжелой или легкой цепи эти области обозначаются как "CDR1", "CDR2" и "CDR3" соответственно. Следовательно, участок связывания антигена может включать шесть CDR, что включает набор CDR из каждого V-участка тяжелой и легкой цепей.

Протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, два из которых (F(ab)-фрагменты) содержат ковалентный гетеродимер каждый, который включает в себя интактный антигенсвязывающий участок. Фермент пепсин способен расщеплять молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, включая фрагмент F(ab')₂, который содержит оба антигенсвязывающих участка. Соответственно, антителом может быть Fab или F(ab')₂. Fab может включать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи Fab может включать V_H-участок и C_H1-участок. Легкая цепь Fab может включать V_L-участок и C_L-участок.

Антитело может быть иммуноглобулином (Ig). Ig может быть, например, IgA, IgM, IgD, IgE и IgG. Иммуноглобулин может включать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина может включать V_H -участок, C_{H1} -участок, шарнирный участок, C_{H2} -участок и C_{H3} -участок. Полипептид легкой цепи иммуноглобулина может включать V_L -участок и C_L -участок.

Антитело может быть поликлональным или моноклональным антителом. Антитело может представлять собой химерное антитело, одноцепочечное антитело, антитело, прошедшее через процесс аффинного созревания, человеческое антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Гуманизированное антитело может быть антителом из видов отличных от человека, которое связывает желаемый антиген и имеет один или несколько участков, определяющих комплементарность (CDR), из видов отличных от человека и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека.

Антитело может быть биспецифическим антителом, его фрагментом, его вариантом или их комбинацией. Биспецифическое антитело может связываться или взаимодействовать с двумя указанными антигенами, например двумя из более подробно описанными ниже антигенами. Биспецифическое антитело может состоять из фрагментов двух антител, описанных в данном документе, что позволяет указанному биспецифическому антителу связываться или реагировать с двумя желаемыми молекулами-мишенями, которые могут включать в себя антиген, который более подробно описан ниже, лиганд, включающий лиганд для рецептора, рецептор, включающий лигандсвязывающий участок на рецепторе, лиганд-рецепторный комплекс и маркер, включая маркер рака.

Антитело может быть бифункциональным антителом, его фрагментом, его вариантом или их комбинацией. Бифункциональное антитело может связываться или реагировать с антигеном, описанным ниже. Бифункциональное антитело также может быть модифицировано, чтобы придать дополнительную функциональность антителу помимо узнавания и связывания антигена. Такая модификация может включать, но не ограничивается ими, связывание с фактором Н или его фрагментом. Фактор Н является растворимым регулятором активации комплемента и, таким образом, может способствовать иммунному ответу через опосредованный комплементом лизис (CML).

Как описано выше, антитело может быть получено у субъекта при введении композиции субъекту. Антитело может иметь период полувыведения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть модифицировано, чтобы продлить или сократить его период полувыведения в субъекте. Такие модификации описаны ниже более подробно.

ii) Полинуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления агент содержит полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой полипептид, кодируемый полинуклеотидом, как описано выше. Полинуклеотид может кодировать антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. Полинуклеотид, кодирующий моноклональное антитело, может облегчать экспрессию *in vivo* и образование моноклонального антитела.

В некоторых вариантах осуществления полипептид хондроитиназы и моноклональное антитело кодируются одним и тем же полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид хондроитиназы и моноклональное антитело кодируются отдельными полинуклеотидами.

1) Вектор.

Один или несколько векторов могут включать полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и полинуклеотид, кодирующий агент, содержатся в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы и полинуклеотид, кодирующий агент, содержатся в отдельных векторах. Один или несколько векторов могут быть способны экспрессировать агент. Один или несколько векторов могут быть конструкцией экспрессии, которая обычно представляет собой плазмиду, которая используется для введения определенного гена в клетку-мишень. После того как вектор экспрессии попадает клетку, полипептид, который кодируется геном, продуцируется с использованием клеточных механизмов транскрипции и трансляции на рибосомных комплексах. Плазмиду часто конструируют так, чтобы она содержала регуляторные последовательности, которые действуют как энхансерные и промоторные участки и приводят к эффективной транскрипции гена, переносимого вектором экспрессии. В одном варианте осуществления данного изобретения векторы данного изобретения могут экспрессировать большие количества стабильной матричной РНК и, следовательно, полипептиды.

(a) Векторы экспрессии.

Вектор может быть кольцевой плазмидой или линейной нуклеиновой кислотой. Кольцевая плазида и линейная нуклеиновая кислота способны направлять экспрессию определенной нуклеотидной последовательности в соответствующей рассматриваемой клетке. Вектор может иметь промотор, функционально связанный с, кодирующей антиген, нуклеотидной последовательностью или кодирующей адъювант нуклеотидной последовательностью, которая может быть функционально связана с сигналами терминации. Вектор также может содержать последовательности, необходимые для правильной трансляции нуклеотидной последовательности. Вектор, содержащий необходимую нуклеотидную последовательность, может быть химерным, это означает, что по меньшей мере один из его компонентов является гете-

рологичным по отношению по меньшей мере к одному из его других компонентов. Экспрессия нуклеотидной последовательности в экспрессирующей кассете может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцибельного промотора, который инициирует транскрипцию только тогда, когда клетка-хозяин подвергается воздействию какого-либо конкретного внешнего раздражителя. В случае многоклеточного организма промотор может также быть специфичным для конкретной ткани или органа или стадии развития.

(b) Кольцевые и линейные векторы.

Вектор может быть кольцевой плазмидой, которая может трансформировать клетку-мишень путем интегрирования в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономная реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации).

Вектор может быть pVAX, pcDNA3.0 или pgrox или любым другим вектором экспрессии, способным экспрессировать ДНК, кодирующую указанный агент, и позволяет клетке транслировать последовательность в агент.

Также в данном документе представлена линейная нуклеиновая кислота или линейная кассета экспрессии ("LEC"), которая способна эффективно доставляться субъекту посредством электропорации и экспрессировать один или нескольких желаемых агентов. LEC может представлять собой любую линейную ДНК, лишенную любого фосфатного остова. Указанная ДНК может кодировать один или несколько агентов. Указанный LEC может содержать промотор, интрон, стоп-кодон и/или сигнал полиаденилирования. Экспрессия агента может контролироваться промотором. Указанная LEC может не содержать генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. Указанная LEC может не содержать другие последовательности нуклеиновой кислоты, не связанные с желаемой экспрессией гена агента.

Указанная LEC может являться производным от любой плазмиды, способной линеаризоваться. Плазида может быть способна экспрессировать агент. Плазмидой может быть pNP (Пуэрто-Рико/34) или pM2 (Новая Каледония/99). Плазида может представлять собой WLV009, pVAX, pcDNA3.0 или pgrox, или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК, кодирующую агент, и позволяющий клетке транслировать последовательность в агент.

Указанная LEC может быть pcrM2. Указанная LEC может быть pcrNP. pcrNP, и pcrMR могут быть получены из pNP (Пуэрто-Рико/34) и pM2 (Новая Каледония/99) соответственно.

(c) Промотор, интрон, стоп-кодон и сигнал полиаденилирования.

Указанный вектор может иметь промотор. Промотором может быть любой промотор, который способен управлять экспрессией гена и регулировать экспрессию изолированной нуклеиновой кислоты. Такой промотор представляет собой cis-действующий элемент последовательности, необходимый для транскрипции посредством ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая транскрибирует описанную в данном документе последовательность агента. Выбор промотора, используемого для направления экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты, зависит от конкретного применения. Промотор может располагаться на примерно таком же расстоянии от точки начала транскрипции в векторе, как и от точки начала транскрипции в его естественном состоянии. Однако изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери функции промотора.

Указанный промотор может быть функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей агент, и сигналами, необходимыми для эффективного полиаденилирования транскрипта, участками связывания рибосомы и терминирования трансляции. Указанный промотор может быть функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей агент, и сигналами, необходимыми для эффективного полиаденилирования транскрипта, участками связывания рибосомы и терминирования трансляции.

Промотором может быть промотор CMV, ранний промотор SV40, поздний промотор SV40, промотор металлотионеина, промотор вируса опухоли молочной железы мышей, промотор вируса саркомы Рауса, промотор полиэдрина или другой промотор, показанный как эффективный для экспрессии в эукариотических клетках.

Вектор может включать энхансер и интрон с функциональными донорными и акцепторными сплайс-участками. Вектор может содержать область терминирования транскрипции ниже структурного гена, чтобы обеспечить эффективную терминацию. Участок терминирования может быть получен из того же гена, что и промоторная последовательность, или может быть получен из разных генов.

iii) Малая молекула.

Указанный агент может содержать малую молекулу. Малые молекулы могут включать, например, фармацевтические препараты или лекарственные средства, органические соединения, металлоорганические соединения, антигены, гормоны, витамины, антибиотики, кофакторы, цитокины, стероиды, углеводы, сахара, спирты, полиены, алкалоиды, гликозиды, флавоноиды, карбоксилаты, пирролы, феназины, жирные кислоты, амины, нуклеотидные основания и их производные (например, нуклеотиды и нуклеозиды), аминокислоты и клеточные метаболиты.

iv) Антиген.

Указанный антиген может вводиться субъекту. "Антиген" может быть любой субстанцией, которая имеет способность генерировать иммунный ответ у субъекта. Антиген может быть полинуклеотидом,

полипептидом или их комбинацией. Полинуклеотид может также включать дополнительные последовательности, которые кодируют последовательности линкеров или тегов, которые связаны с антигеном пептидной связью. Антиген может содержать малую молекулу, как описано выше.

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

Указанный антиген может быть распознан и связан антителом. Некоторые антигены могут вызывать сильный иммунный ответ. Другие антигены могут вызывать слабый иммунный ответ. Указанный антиген может происходить из организма или из внешней среды. Указанным антигеном может быть чужеродный антиген или свой антиген.

В некоторых вариантах осуществления антитело, как описано выше, может связываться или реагировать с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления полипептид хондроитиназы и агент, содержащий полинуклеотид, кодируются одним и тем же полинуклеотидом или отдельными полинуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления полипептид хондроитиназы указанный агент, содержащий полинуклеотид, и указанный антиген находятся в пределах одного и того же вектора или отдельных векторов.

Указанным антигеном может быть любая субстанция, которая вызывает иммунный ответ у субъекта. Очищенные антигены обычно не являются сильно иммуногенными сами по себе и поэтому объединяются с адъювантом, как описано выше. Иммунный ответ, индуцированный антигеном, может быть усилен с помощью бустера (boosted) или другими словами увеличен при сочетании с адъювантом. Такой иммунный ответ может быть гуморальным иммунным ответом и/или клеточным иммунным ответом. В некоторых вариантах осуществления комбинация адъюванта и антигена может стимулировать или увеличивать клеточный иммунный ответ у субъекта.

Указанный 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. Последовательность нуклеиновой кислоты может также включать дополнительные последовательности, которые кодируют последовательности линкеров или тегов, которые связаны с антигеном пептидной связью. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, их вариант, их фрагмент или их комбинацию.

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

Некоторые антигены могут вызывать сильный иммунный ответ. Другие антигены могут вызывать слабый иммунный ответ. Указанный антиген может вызывать больший иммунный ответ в сочетании с адъювантом.

(1) Вирусные антигены.

Указанный антиген может быть вирусным антигеном или его фрагментом или его вариантом. Вирусный антиген может быть вирусом из одного 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 из вирусов папилломы, например вируса папилломы человека (HPV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса полиомиелита, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса оспы (*Variola major* и *minor*), вируса осповакцины, вируса гриппа, вируса гепатита А, вируса лейкемии Т-клеток человека (HTLV-I), вируса волосатоклеточного лейкоза (HTLV-II), вируса калифорнийского энцефалита, хантавируса (геморагическая лихорадка), вируса бешенства, вируса лихорадки Эбола, вируса Марбурга, вируса кори, вируса паротита, респираторно-синцитиальный вируса (RSV), герпес-симплекс 1 (оральный герпес), герпес-симплекс 2 (генитальный герпес), опоясывающего герпеса (варицелла зостер также известная, как ветряная оспа), цитомегаловируса (CMV), например человеческого CMV, вируса Эпштейна-Барр (EBV), флавивируса, вируса ящура, вируса чикунгунья, вируса Ласса, аренавируса, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) или вируса, вызывающего рак.

(a) Антиген гепатита.

Указанным антигеном может быть антиген вируса гепатита (т.е. антиген гепатита), или его фрагментом, или его вариантом. Указанный антиген гепатита может быть антигеном или иммуногеном вируса гепатита А (HAV), вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D (HDV) и/или вируса гепатита Е (HEV). В некоторых вариантах осуществления антиген(ы) гепатита может(гут)

быть гетерологичной(ыми) молекулой(ами) нуклеиновой(ых) кислоты(т), такой(ие) как плазмид(а), которая кодирует один или несколько антигенов из HAV, HBV, HCV, HDV и HEV. Указанный антиген гепатита может представлять собой полноразмерные или иммуногенные фрагменты полноразмерных белков.

Указанный антиген гепатита может содержать консенсусные последовательности и/или одну или несколько модификаций для улучшения экспрессии. Генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности конструкций, могут быть включены в модифицированные консенсусные последовательности. Консенсусный антиген гепатита может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах осуществления может содержать НА-тэг. Иммуногены могут быть спроектированы таким образом, чтобы выявлять более сильные и более широкие клеточные иммунные ответы, чем соответствующие иммуногены с оптимизированными кодонами.

Указанный антиген гепатита может быть антигеном из HAV. Указанный антиген гепатита может быть капсидным белком HAV, неструктурным белком HAV, их фрагментом, их вариантом или их комбинацией.

Указанный антиген гепатита может быть антигеном HCV. Указанный антиген гепатита может представлять собой белок нуклеокапсид HCV (т.е. белок ядра), белок оболочки HCV (например, E1 и E2), неструктурный белок HCV (например, NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a и NS5b), их фрагмент, их вариант или их комбинацию.

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

Указанный антиген гепатита может быть антигеном из HEV. Указанный антиген гепатита может представлять собой капсидный белок HEV, его фрагмент или его вариант.

Указанный антиген гепатита может быть антигеном из HBV. Указанный антиген гепатита может быть белком сердцевин HBV, поверхностным белком HBV, ДНК-полимеразой HBV, белком HBV, кодируемым геном X, их фрагментом, их вариантом или их комбинацией. Указанный антиген гепатита может быть белком сердцевин HBV генотипа А, белком сердцевин HBV генотипа В, белком сердцевин HBV генотипа С, белком сердцевин HBV генотипа D, белком сердцевин HBV генотипа Е, белком сердцевин HBV генотипа F, белком сердцевин HBV генотипа G, белком сердцевин HBV генотипа H, поверхностным белком HBV генотипа А, поверхностным белком HBV генотипа В, поверхностным белком HBV генотипа С, поверхностным белком HBV генотипа D, поверхностным белком HBV генотипа Е, поверхностным белком HBV генотипа F, поверхностным белком HBV генотипа G, поверхностным белком HBV генотипа H, их фрагментом, их вариантом или их комбинацией. Указанный антиген гепатита может быть консенсусным белком сердцевин HBV или консенсусным белком поверхностного белка HBV.

В некоторых вариантах осуществления указанный антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа А, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа А или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа А.

В других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа В, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа В, или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа В.

В еще других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа С, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа С, или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа С.

В некоторых вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа D, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа D, или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа D.

В некоторых других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа Е, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа Е или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа Е.

В некоторых вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа F, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа F, или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа F.

В других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа G, лидерную последовательность IgE,

связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа G, или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа G.

В некоторых вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной сердцевин HBV генотипа H, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка сердцевин HBV генотипа H, или последовательность консенсусного белка сердцевин HBV генотипа H.

В еще других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа A, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа A, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа A.

В некоторых вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа B, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа B, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа B.

В других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа C, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа C, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа C.

В других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа D, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа D, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа D.

В некоторых вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа E, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа E, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа E.

В других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа F, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа F, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа F.

В еще других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа G, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа G, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа G.

В других вариантах осуществления антиген гепатита может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусного поверхностного белка HBV генотипа H, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для поверхностного белка HBV генотипа H, или последовательность консенсусного поверхностного белка HBV генотипа H.

(b) Антиген вируса папилломы человека (HPV).

Указанным антигеном может быть антиген вируса папилломы человека (HPV) или его фрагмент или его вариант. Указанный антиген HPV может быть из HPV типов 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 и 58, которые вызывают рак шейки матки, рак прямой кишки и/или другие виды рака. Указанный антиген HPV может быть из HPV типов 6 и 11, которые вызывают генитальные бородавки и, как известно, могут быть причинами рака головы и шеи.

Указанными антигенами HPV могут быть домены HPV E6 или E7 из каждого типа HPV. Например, для HPV типа 16 (HPV16) антиген HPV16 может включать антиген HPV16 E6, антиген HPV16 E7, их фрагменты, варианты или комбинации. Аналогичным образом, указанный антиген HPV может представлять собой HPV 6 E6 и/или E7, HPV 11 E6 и/или E7, HPV 18 E6 и/или E7, HPV 31 E6 и/или E7, HPV 33 E6 и/или E7, HPV 52 E6 и/или E7, или HPV 58 E6 и/или E7, их фрагменты, варианты или комбинации.

(c) Антиген RSV.

Указанный антиген может представлять собой антиген RSV или его фрагмент или его вариант. Указанный антиген RSV может представлять собой гибридный белок человеческого RSV (также называемый в данном документе "RSV F", "RSV F-белок" и "F-белок") или его фрагмент или вариант. Гибридный белок человеческого RSV может быть одинаковым для подтипов RSV A и B. Указанный антиген RSV может представлять собой белок RSV F или его фрагмент или вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23994.1). Указанный антиген RSV может представлять собой белок RSV F из штамма RSV A2 (GenBank AAB59858.1) или его фрагмент или вариант. Указанный антиген RSV может быть мономером, димером или тримером белка RSV F или их фрагментом или вариантом. Указанный антиген RSV может быть оптимизированной аминокислотной последовательностью RSV F или ее фрагментом или вариантом.

Форма RSV F, полученная вследствие гибридизации, вызывает появление сильных нейтрализующих антител у иммунизированных животных и защищает животных от заражения RSV. Данное изобре-

тение использует этот иммунный ответ в заявленных вакцинах. В соответствии с данным изобретением белок RSV F может находиться в форме до гибридизации или в форме после гибридизации.

Указанный антиген RSV также может быть гликопротеином для присоединения человеческого RSV (также называемым в данном документе "RSV G", "RSV G белок" и "G-белок") или его фрагментом или вариантом. G-белок человеческого RSV отличается между подтипами RSV A и B. Указанный антиген может представлять собой RSV G- белок или его фрагмент или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23993). Указанный антиген RSV может представлять собой G-белок RSV из изолята H5601 подтипа RSV B, изолята H1068 подтипа RSV B, изолята H5598 подтипа RSV B, изолята H1123 подтипа RSV B или их фрагмент или вариант. Указанный антиген RSV может быть оптимизированной аминокислотной последовательностью RSV G или ее фрагментом или вариантом.

В других вариантах осуществления указанный антиген RSV может представлять собой неструктурный белок 1 ("белок NS1") RSV человека или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой NS1-белок RSV или его фрагмент или вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23987.1). Указанный антиген RSV человека также может представлять собой неструктурный белок RSV 2 ("белок NS2") или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой NS2-белок RSV, или его фрагмент или вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23988.1). Указанный антиген RSV может также представлять собой белок нуклеокапсида ("N") RSV человека или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой N белок RSV или его фрагмент или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23989.1). Указанный антиген RSV может представлять собой фосфопротеин ("P-белок") RSV человека или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой P-белок RSV или его фрагмент или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23990.1). Указанный антиген RSV также может быть белком матрикса ("M") человеческого RSV или его фрагментом или вариантом. Например, антиген RSV может представлять собой M-белок RSV, или его фрагмент или вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23991.1).

В других вариантах осуществления указанный антиген RSV может представлять собой малый гидрофобный ("SH") белок человеческого RSV или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой SH-белок RSV, или его фрагмент или вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23992.1). Указанный антиген RSV может также представлять собой матриксный белок 2-1 ("M2-1") человеческого RSV или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой M2-1-белок RSV, или его фрагмент или вариант, из штамма RSV Long (GenBank AAX23995.1). Указанный антиген RSV может представлять собой также матриксный белок 2-2 ("M2-2") человеческого RSV или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой M2-2-белок RSV или его фрагмент или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23997.1). Указанный антиген RSV человека может представлять собой белок полимеразы L ("L") человеческого RSV или его фрагмент или вариант. Например, антиген RSV может представлять собой L-белок RSV или его фрагмент или вариант из штамма RSV Long (GenBank AAX23996.1).

В других вариантах осуществления антиген RSV может иметь оптимизированную аминокислотную последовательность NS1, NS2, N, P, M, SH, M2-1, M2-2 или L-белка. Указанный антиген RSV может представлять собой белок человеческого RSV или рекомбинантный антиген, такой как любой из белков, кодируемых геном человеческого RSV.

В других вариантах осуществления антиген RSV может представлять собой, но не ограничивается ими, F-белок RSV из штамма RSV Long, G-белок RSV из штамма RSV Long, оптимизированную аминокислотную последовательность G RSV, геном человеческого RSV штамма RSV Long, оптимизированную аминокислотную последовательность F RSV, NS1-белок RSV из штамма RSV Long, NS2-белок RSV из штамма RSV Long, N-белок RSV из штамма RSV Long, P-белок RSV из штамма RSV Long, M-белок RSV из штамма RSV Long, SH-белок RSV из штамма RSV Long, M2-1-белок RSV из штамма RSV Long, M2-2-белок RSV из штамма RSV Long, L-белок RSV из штамма RSV Long, G-белок RSV из изолята H5601 подтипа B RSV, G-белок RSV из изолята H1068 подтипа B RSV, G-белок RSV из изолята H5598 подтипа B RSV, G-белок RSV из изолята H1123 подтипа B RSV, или их фрагмент, или их вариант.

(d) Антиген вируса гриппа.

Указанный антиген может представлять собой антиген вируса гриппа, или его фрагмент, или его вариант. Антигенами вируса гриппа являются те, которые способны вызывать иммунный ответ у млекопитающего против одного или нескольких серотипов вируса гриппа. Указанный антиген может содержать полноразмерный продукт трансляции HA0, субъединицу HA1, субъединицу HA2, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Указанный антиген гемагглютиниона вируса гриппа может быть консенсусной последовательностью, полученной из множества штаммов вируса гриппа A серотипа H1, консенсусной последовательностью, полученной из множества штаммов вируса гриппа A серотипа H2, гибридной последовательностью, содержащей части двух разных консенсусных последовательностей, полученных из разных наборов многих штаммов вируса гриппа A серотипа H1 или консенсусной последовательностью, полученной из многих вирусов гриппа B. Указанный антиген гемагглютиниона гриппа может быть из вируса гриппа B.

Указанный антиген вируса гриппа может также содержать по меньшей мере один антигенный эпи-

топ, который может быть эффективным против конкретных иммуногенов вируса гриппа, против которых может быть индуцирован иммунный ответ. Указанный антиген может обеспечить целый репертуар иммуногенных участков и эпитопов, присутствующих в интактном вирусе гриппа. Указанный антиген может представлять собой консенсусную последовательность антигена гемагглютиниона, которая может являться производным от последовательностей антигена гемагглютиниона из множества штаммов вируса гриппа А одного серотипа, таких как множество штаммов вируса гриппа А серотипа Н1 или серотипа Н2. Указанный антиген может представлять собой гибридную консенсусную последовательность антигена гемагглютиниона, которая может являться производным от объединения двух разных консенсусных последовательностей антигена гемагглютиниона или их частей. Каждая из двух различных консенсусных антигенных последовательностей гемагглютиниона может являться производным от другого набора множества штаммов вируса гриппа А одного серотипа, такого как множество штаммов вируса гриппа А серотипа Н1. Указанный антиген может представлять собой консенсусную последовательность антигена гемагглютиниона, которая может являться производным от последовательностей антигена гемагглютиниона из множества штаммов вируса гриппа В.

В некоторых вариантах осуществления антиген вируса гриппа может представлять собой Н1 НА, Н2 НА, Н3 НА, Н5 НА или антиген ВНА. Альтернативно, антиген вируса гриппа может быть консенсусным гемагглютининовым антигеном, содержащим консенсусную аминокислотную последовательность Н1 или консенсусную аминокислотную последовательность Н2. Консенсусным гемагглютининовым антигеном может быть синтетическая гибридная консенсусная последовательность Н1, содержащая части двух разных консенсусных последовательностей Н1, каждая из которых получена из отличающегося набора последовательностей из другого серотипа. Примером консенсусного НА-антигена, который является синтетическим гибридным консенсусным белком Н1, является белок, содержащий аминокислотную последовательность U2. Консенсусным гемагглютининовым антигеном может быть консенсусный гемагглютининовый белок, являющийся производным от последовательностей гемагглютиниона из штаммов вируса гриппа В, такой как белок, содержащий консенсусную аминокислотную последовательность ВНА.

Консенсусный гемагглютининовый антиген может также содержать один или несколько дополнительных элементов аминокислотной последовательности. Консенсусный гемагглютининовый антиген может дополнительно содержать на своем N-конце лидерную аминокислотную последовательность IgE или IgG. Консенсусный гемагглютининовый антиген может дополнительно содержать иммуногенный тэг, который является уникальным иммуногенным эпитопом, который может быть обнаружен с помощью легко доступных антител. Примером такого иммуногенного тэга является 9-аминокислотный НА-тэг вируса гриппа, который может быть связан с C-концом консенсусного гемагглютиниона. В некоторых вариантах осуществления консенсусный гемагглютининовый антиген может дополнительно содержать на своем N-конце лидерную аминокислотную последовательность IgE или IgG и на своем C-конце НА-тэг.

Консенсусным гемагглютининовым антигеном может быть консенсусный гемагглютининовый белок, который состоит из консенсусных аминокислотных последовательностей вируса гриппа или их фрагментов и вариантов. Консенсусным гемагглютининовым антигеном может быть консенсусный гемагглютининовый белок, который содержит белковые последовательности не вируса гриппа и последовательности или фрагменты белка вируса гриппа или их фрагменты и варианты.

Примеры консенсусного белка Н1 включают те, которые могут состоять из консенсусной аминокислотной последовательности Н1, или те, которые также содержат дополнительные элементы, такие как лидерная последовательность IgE, или НА-тэг, или как лидерная последовательность IgE, так и НА-тэг.

Примеры консенсусных белков Н2 включают те, которые могут состоять из консенсусной последовательности аминокислот Н2 или тех, которые дополнительно содержат лидерную последовательность IgE, или НА-тэг, или как лидерную последовательность IgE, так и НА-тэг.

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

Примеры гибридных консенсусных белков гемагглютиниона вируса гриппа В включают те, которые могут состоять из консенсусной аминокислотной последовательности ВНА или они могут содержать лидерную последовательность IgE, или НА-тэг, или как лидерную последовательность IgE, так и НА-тэг.

Консенсусный гемагглютининовый белок может кодироваться консенсусной нуклеиновой кислотой гемагглютиниона, ее вариантом или ее фрагментом. В отличие от консенсусного гемагглютининового белка, который может быть консенсусной последовательностью, являющейся производным от множества различных последовательностей гемагглютиниона из разных штаммов и вариантов, указанная консенсусная нуклеиновая кислота гемагглютиниона относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует консенсусную последовательность белка, и используемые кодирующие последовательности могут отличаться от тех, которые используются для кодирования определенных аминокислотных последовательностей во множестве различных последовательностей гемагглютиниона, из которых получена консенсусная последовательность белка гемагглютиниона.

Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты может иметь оптимизированные кодоны и/или оптимизированную РНК. Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты гемагглютинина может содержать последовательность Козак в 5'-нетранслируемой области. Консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты гемагглютинина может содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют лидерную последовательность. Кодированная последовательность N-концевой лидерной последовательности находится в 5' положении относительно кодирующей последовательности гемагглютинина. N-терминальная лидерная последовательность может облегчить секрецию. N-терминальной лидерной последовательностью может быть лидерная последовательность IgE или лидерная последовательность IgG. Последовательность нуклеиновой кислоты консенсуса гемагглютинина может содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенный тэг. Иммуногенный тэг может находиться на С-конце указанного белка, а последовательность, кодирующая ее, расположена в 3'-положении относительно кодирующей последовательности НА. Иммуногенный тэг обеспечивает уникальный эпитоп, для которого имеются легко доступные антитела, так что такие антитела можно использовать в анализах для обнаружения и подтверждения экспрессии белка. Указанный иммуногенный тэг может быть НА-тэгом на С-конце указанного белка.

(е) Антиген вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) Указанный антиген может быть ВИЧ-антигеном или его фрагментом или его вариантом. ВИЧ-антигены могут включать модифицированные консенсусные последовательности для иммуногенов. Генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности конструкций, могут быть включены в модифицированные консенсусные последовательности. Новые иммуногены могут быть спроектированы таким образом, чтобы вызывать более сильные и более широкие клеточные иммунные ответы, чем соответствующие иммуногены с оптимизированными кодонами.

В некоторых вариантах осуществления ВИЧ-антиген может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсуса оболочки подтипа А, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа А или последовательностью консенсусного белка оболочки подтипа А.

В других вариантах осуществления ВИЧ-антиген может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсуса оболочки подтипа В, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа В или последовательностью консенсусного белка оболочки подтипа В.

В других вариантах осуществления ВИЧ-антиген может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсуса оболочки подтипа С, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа С или последовательностью консенсусного белка оболочки подтипа С.

В других вариантах осуществления ВИЧ-антиген может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсуса оболочки подтипа D, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для белка оболочки подтипа D, или последовательностью консенсусного белка оболочки подтипа D.

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

В других вариантах осуществления ВИЧ-антиген может представлять собой конструкцию последовательности ДНК консенсусной ДНК Gag подтипов А, В, С и D, лидерную последовательность IgE, связанную с консенсусной последовательностью для консенсусного белка Gag подтипов А, В, С и D или последовательностью консенсусного белка Gag подтипов А, В, С и D.

В других вариантах осуществления ВИЧ-антиген может представлять собой последовательность ДНК MPol или последовательность белка MPol. Указанный ВИЧ-антиген может быть последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью Env А, Env В, Env С, Env D, В Nef-Rev, Gag или любой их комбинации.

(f) Антиген вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

Указанный антиген может представлять собой LCMV-антиген или его фрагмент или его вариант. Указанный LCMV-антиген может содержать консенсусные последовательности и/или одну или несколько модификаций для улучшения экспрессии. Генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности конструкций, могут быть включены в модифицированные последовательности. Указанный LCMV-антиген может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина (например, сигнальный пептид IgE или IgG), и в некоторых вариантах осуществления может содержать НА-тэг. Указанные иммуногены могут быть улучшены, чтобы вызвать более сильные и более широкие клеточные иммунные ответы, чем соответствующий кодон оптимизированного иммуногена.

Указанный LCMV-антиген может быть антигеном из LCMV Armstrong. Указанный LCMV-антиген может быть антигеном из LCMV клона 13. Указанный LCMV-антиген может представлять собой нуклеопротеин (NP) из LCMV, гликопротеин (GP, например GP-1, GP-2 и GP-C) из LCMV, белок L из LCMV, полипептид Z из LCMV, их фрагмент, их вариант, или их комбинацию.

(2) Антигены паразитов.

Указанный антиген может быть антигеном паразита или его фрагментом или вариантом. Паразит может быть простейшим, гельминтом или эктопаразитом. Гельминт (т.е. червь) может быть плоским червем (например, сосальщиком и ленточным червем), скребнем или аскаридой (например, острицей). Эктопаразитом могут быть вши, блохи и разные виды клещей.

Указанным паразитом может быть любой паразит, вызывающий следующие заболевания: акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидоз, байлисаскариоз, болезнь Шагаса, клонорхиоз, кохлиомия, криптоспоририоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, элифантиаз, энтеробиоз, фасциолез, фасциолепсидоз, филариоз, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепиоз, изоспороз, лихорадку Катаямы, лейшманиоз, болезнь Лайма, малярию, метагонимиаз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, чесотка, шистосомоз, сонная болезнь, стронгилоидоз, таниоз, токсокариоз, токсоплазмоз, трихиноз и трихураз.

Указанным паразитом может быть акантамеба, анисакис (*Anisakis*), *Ascaris lumbricoides*, овод, *Balantidium coli*, постельный клоп, цестода (ленточный червь), клещи (*Chigger*), *Cochliomyia hominivorax*, *Entamoeba histolytica*, *Fasciola hepatica*, *Giardia lamblia*, анкилостомы, лейшмании, *Linguatula serrata*, печеночная двуустка, *Loa loa*, паразитическая легочная двуустка, острица, *Plasmodium falciparum*, шистосома, *Strongyloides stercoralis*, клещи (*Mite*), ленточный червь, *Toxoplasma gondii*, трипаносома, власоглав (*whipworm*) или *Wuchereria bancrofti*.

(а) Малярийный антиген.

Указанным антигеном может быть антиген малярии (т.е. антиген PF или иммуноген PF), или его фрагмент, или его вариант. Указанный антиген может быть из паразита, вызывающего малярию. Паразитом, вызывающим малярию, может быть *Plasmodium falciparum*. Указанный антиген *Plasmodium falciparum* может включать циркумспорозоитный (CS-circumsporozoite) антиген.

В некоторых вариантах осуществления указанный антиген малярии может представлять собой молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые кодируют один или несколько иммуногенов *P. falciparum* CS, LSA1, TRAP, CelTOS и Ama1. Указанные иммуногены могут представлять собой полноразмерные или иммуногенные фрагменты полноразмерных белков. Указанные иммуногены содержат консенсусные последовательности и/или модификации для улучшения экспрессии.

В других вариантах осуществления антиген малярии может быть консенсусной последовательностью TRAP, который также называется SSP2, спроектированной из компиляции всех полноразмерных последовательностей TRAP/SSP2 *Plasmodium falciparum* базы данных GenBank (всего 28 последовательностей). Консенсусные TRAP-иммуногены (т.е. ConTRAP-иммуноген) могут содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах осуществления могут содержать HA-тэг.

В других вариантах осуществления антиген малярии может быть CelTOS, который также называется Ag2 и представляет собой высококонсервативный антиген плазмодий. Консенсусные CelTOS-антигены (т.е. ConCelTOS-иммуноген) могут содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах осуществления могут содержать HA-тэг.

В других вариантах осуществления указанный антиген малярии может представлять собой Ama1, который представляет собой высококонсервативный антиген плазмодий (*Plasmodium*). Указанный антиген малярии также может быть консенсусной последовательностью Ama1 (т.е. ConAma1-иммуногеном), включающей в некоторых случаях сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах осуществления может содержать HA-тэг.

В некоторых вариантах осуществления указанный антиген малярии может быть консенсусным CS-антигеном (т.е. консенсусным CS-иммуногеном), включающим в некоторых случаях сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах осуществления может содержать HA-тэг.

В других вариантах осуществления антиген малярии может представлять собой слитый белок, содержащий комбинацию двух или более из белков PF, представленных в данном документе. Например, слитые белки могут содержать два или более из консенсусного иммуногена CS, иммуногена ConLSA1, иммуногена ConTRAP, иммуногена ConCelTOS и иммуногена ConAma1, соединенных непосредственно рядом друг с другом или соединенных с присутствием разделителя (*spacer*) или одной или нескольких аминокислот между ними. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит два иммуногена PF; в некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит три иммуногена PF; в некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит четыре иммуногена PF; и в некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит пять иммуногенов PF. Слитые белки с двумя консенсусными иммуногенами PF могут содержать CS и LSA1; CS и TRAP; CS и CelTOS; CS и Ama1; LSA1 и TRAP; LSA1 и

CelTOS; LSA1 и Ama1; TRAP и CelTOS; TRAP и Ama1; или CelTOS и Ama1. Слитые белки с тремя консенсусными иммуногенами PF могут содержать CS, LSA1 и TRAP; CS, LSA1 и CelTOS; CS, LSA1 и Ama1; LSA1, TRAP и CelTOS; LSA1, TRAP и Ama1 или TRAP, CelTOS и Ama1. Слитые белки с четырьмя консенсусными иммуногенами PF могут содержать CS, LSA1, TRAP и CelTOS; CS, LSA1, TRAP и Ama1; CS, LSA1, CelTOS и Ama1; CS, TRAP, CelTOS и Ama1 или LSA1, TRAP, CelTOS и Ama1. Слитые белки с пятью консенсусными иммуногенами PF могут содержать CS или CS-alt, LSA1, TRAP, CelTOS и Ama1.

В некоторых вариантах осуществления указанные слитые белки содержат сигнальный пептид, присоединенный к N-концу. В некоторых вариантах осуществления указанные слитые белки содержат множественные сигнальные пептиды, связанные с N-концом каждого консенсусного иммуногена PF. В некоторых вариантах осуществления разделитель может быть включен между иммуногенами PF слитого белка. В некоторых вариантах осуществления указанный разделитель между иммуногенами PF слитого белка может быть участком протеолитического расщепления. В некоторых вариантах осуществления разделитель может быть участком протеолитического расщепления, распознаваемым протеазой, присутствующей в клетках, которым предполагается вводить вакцину и/или которые предположительно поглотят вакцину. В некоторых вариантах осуществления разделитель может быть включен между иммуногенами PF слитого белка, при этом указанный разделитель представляет собой участок протеолитического расщепления, распознаваемый протеазой, присутствующей в клетках, которым предполагается вводить вакцину и/или которые предположительно поглотят вакцину, и указанный слитый белок содержит множественные сигнальные пептиды, связанные с N-концом каждого консенсусного иммуногена PF, таким образом, что при расщеплении указанный сигнальный пептид каждого консенсусного иммуногена PF транслирует консенсусный иммуноген PF во внеклеточное пространство.

(3) Бактериальные антигены.

Указанный антиген может быть бактериальным антигеном или его фрагментом или вариантом. Бактерия может быть из любого из следующих типов: Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Caldisei, 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.

Указанная бактерия может быть грамположительной бактерией или грамотрицательной бактерией. Указанная бактерия может представлять собой аэробную бактерию или анаэробную бактерию. Указанная бактерия может быть автотрофной бактерией или гетеротрофной бактерией. Указанная бактерия может быть мезофилом, нейтрофилом, экстремофилом, ацидофилом, алкалифилом, термофилом, психрофилом, галофилом или осмофилом.

Указанная бактерия может быть бактерией сибирской язвы, бактерией, устойчивой к антибиотикам, бактерией, вызывающей заболевание, бактерией вызывающей пищевое отравление, инфекционной бактерией, бактерией сальмонеллой, бактерией стафилококком, бактерией стрептококком или бактерией столбняка. Указанная бактерия может быть микобактерией, *Clostridium tetani*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, метициллин-устойчивым *Staphylococcus aureus* (MRSA) или *Clostridium difficile*. Указанная бактерия может быть *Mycobacterium tuberculosis*.

(a) Антигены *Mycobacterium tuberculosis*.

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

В некоторых вариантах осуществления антиген TB может представлять собой молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые кодируют один или несколько иммуногенов *Mycobacterium tuberculosis* из семейства Ag85 и семейства Esx. Указанные иммуногены могут представлять собой полноразмерные белки или иммуногенные фрагменты полноразмерных белков. Указанные иммуногены могут содержать консенсусные последовательности и/или модификации для улучшения экспрессии. Консенсусные иммуногены могут содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах осуществления могут содержать НА-тэг.

(4) Грибковые антигены.

Указанный антиген может быть грибковым антигеном или его фрагментом или вариантом. Указанный гриб может представлять собой виды *Aspergillus*, *Blastomyces dermatitidis*, дрожжи *Candida* (например, *Candida albicans*), *Coccidioides*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, дерматофит, виды *Fusarium*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucoromycotina*, *Pneumocystis jirovecii*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum* или *Cladosporium*.

b) Введение.

Указанные хондроитиназа и агент могут быть приготовлены в соответствии со стандартными методами, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Указанные хондроитиназа и агент

могут содержаться в тех же или отдельных композициях. Указанные гиалуронидазу и агент можно приготовить в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Указанные гиалуронидаза и агент могут быть включены в те же или отдельные композиции. Такие композиции можно вводить в дозах и способами, хорошо известными специалистам в области медицины, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, вес и состояние конкретного субъекта, а также путь введения.

Указанные хондроитиназу и агент можно вводить профилактически или терапевтически. При профилактическом введении указанные хондроитиназу и агент можно вводить в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа. В терапевтических применениях указанные хондроитиназу и агент вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать терапевтический эффект. Указанную гиалуронидазу и агент можно вводить профилактически или терапевтически. При профилактическом введении гиалуронидазу и агент можно вводить в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа. В терапевтических применениях гиалуронидазу и агент вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать терапевтический эффект. Количество, достигающее для достижения этого, обозначается как "терапевтически эффективная доза". Количество, эффективные для этого использования, будут зависеть, например, от конкретного состава применяемого режима вакцинации, способа введения, стадии и степени тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента и оценки назначающего врача.

Указанные хондроитиназу и агент или указанные гиалуронидазу и агент, например, можно вводить способами, хорошо известными в данной области, как описано в Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 1997, 15, 617-648); патенты США № 5580859; 5703055 и 5679647, содержание которых включено в данное описание посредством ссылки во всей их полноте. Указанный полинуклеотид может быть пришит к частицам или гранулам, которые можно вводить индивидууму, например, с использованием пистолета для вакцинаций. Специалист в данной области должен знать, что выбор фармацевтически приемлемого носителя, включая физиологически приемлемое соединение, зависит, например, от способа введения вектора экспрессии.

Указанные хондроитиназа и агент могут быть доставлены различными путями. Указанные гиалуронидаза и агент могут быть доставлены различными путями. Типичные пути доставки включают парентеральное введение, например, внутривенное, внутримышечное, доставку в жировую ткань или подкожную доставку. Другие пути включают пероральное введение, интраназальный и интравaginaльный пути. В частности, для полинуклеотида указанные хондроитиназа и агент или указанные гиалуронидаза и агент могут быть доставлены в интерстициальные пространства тканей индивидуума (патенты США № 5580859 и 5703055, содержание которых включено в данное описание посредством ссылки во всей их полноте). Указанные хондроитиназу и агент, или указанные гиалуронидазу и агент также можно вводить в мышцы или вводить путем внутривенных или подкожных инъекций или трансдермально, например, путем ионтофореза. Эпидермальное введение также может быть применено. Эпидермальное введение может включать механическое или химическое раздражение поверхностного слоя эпидермиса для стимуляции иммунного ответа на раздражитель (патент США № 5679647, содержание которого включено в данное описание посредством ссылки во всей его полноте).

Указанные хондроитиназа и агент могут быть жидким препаратом, таким как суспензия, сироп или эликсир. Указанные хондроитиназа и агент также могут быть препаратом для парентерального, подкожного введения, введения в жировую ткань, внутривенного, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), таким как стерильная суспензия или эмульсия. Указанные гиалуронидаза и агент могут быть жидким препаратом, таким как суспензия, сироп или эликсир. Указанные гиалуронидаза и агент также могут быть препаратом для парентерального, подкожного введения, введения в жировую ткань, внутривенного, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), таким как стерильная суспензия или эмульсия.

Указанные хондроитиназа и агент, или гиалуронидаза и агент, могут быть включены в липосомы, микросферы или другие полимерные матрицы (патент США № 5703055, Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III, 2nd ed. 1993), содержание которых включено в данное описание посредством ссылки во всей их полноте). Липосомы могут состоять из фосфолипидов или других липидов и могут быть нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в приготовлении и введении.

Хондроитиназу и агент, или гиалуронидазу и агент, можно вводить посредством электропорации, например, способом, описанным в патенте США № 7664545, содержание которого включено в данный документ путем ссылки. Указанная электропорация может осуществляться способом и/или устройством, описанным в патентах США № 6302874; 5676646; 6241701; 6233482; 6216034; 6208893; 6192270; 6181964; 6150148; 6120493; 6096020; 6068650 и 5702359, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Электропорацию можно осуществлять с помощью малоинвазивного устройства.

Минимально инвазивное устройство для электропорации ("MID") может быть устройством для инъекции указанных хондроитиназы и агента, описанных выше, и связанной с ними жидкости в ткань

тела. Указанное устройство может содержать полую иглу, кассету ДНК и средство для доставки жидкости, причем указанное устройство приспособлено для приведения в действие средства для доставки жидкости при одновременном (например, автоматическом) введении ДНК в ткань тела во время введения иглы в указанную ткань тела. Это имеет то преимущество, что способность вводить ДНК и связанную с ней жидкость постепенно в процессе введения иглы приводит к более равномерному распределению жидкости через ткань тела. Боль, испытываемая во время инъекции, может быть уменьшена благодаря распределению вводимой ДНК на большую область.

Указанное MID может вводить указанные хондроитиназу и агент в ткань без использования иглы. Указанное MID может вводить указанную вакцину в виде небольшого потока или струи с такой силой, что вакцина пробивает поверхность ткани и входит в низлежащую ткань и/или мышцу. Сила для небольшого потока или струи может быть обеспечена расширением сжатого газа, такого как двуокись углерода, через микроотверстие в течение доли секунды. Примеры малоинвазивных устройств электропорации и способы их использования описаны в опубликованной заявке на патент США № 20080234655; патентах США № 6520950; 7171264; 6208893; 6009347; 6120493; 7245963; 7328064 и 6763264, содержание каждого из которых включено в данное описание в качестве ссылки.

Указанное MID может содержать инжектор, который создает высокоскоростную струю жидкости, которая безболезненно пробивает ткань. Такие безигловые инжекторы коммерчески доступны. Примеры безигловых инжекторов, которые могут быть использованы в данном изобретении, включают те, которые описаны в патентах США № 3805783; 4447223; 5505697 и 4342310, содержание каждого из которых включено в данное описание посредством ссылки.

Желаемые хондроитиназа и агент, гиалуронидаза и агент в форме, подходящей для прямой или непрямой электротранспортировки, могут быть введены (например, инъецированы) с использованием безиглового инжектора в обрабатываемую ткань, обычно путем контактирования поверхности ткани с инжектором, таким образом чтобы была возможность привести в действие подачу струи указанного агента с достаточной силой, чтобы вызвать проникновение в ткань. Например, если обрабатываемая ткань представляет собой слизистую оболочку, кожу или мышцу, указанный агент выпускается по направлению к поверхности слизистой оболочки или кожи с достаточной силой, чтобы вызвать проникновение агента через роговой слой и в дермальные слои или в низлежащую ткань и мышцы, соответственно.

Безигловые инжекторы хорошо подходят для доставки во все типы тканей, особенно в кожу и слизистую оболочку. В некоторых вариантах осуществления безигловой инжектор может использоваться для продвижения жидкости, которая содержит хондроитиназу и агент, на поверхность и в кожу или слизистую оболочку субъекта. Типичные примеры различных типов тканей, которые можно лечить с использованием способов данного изобретения, включают поджелудочную железу, гортань, носоглотку, гипотаринкс, орофаринкс, губу, горло, легкие, сердце, почку, мышцы, грудь, толстый кишечник, простату, тимус, яички, кожу, ткани слизистой оболочки, яичник, кровеносные сосуды или любую их комбинацию.

Указанное MID может иметь игольчатые электроды, которые электропорировать указанную ткань. Путем пропускания импульса между многими парами электродов в многоэлектродной решетке, например, созданной в виде прямоугольных или квадратных структур, обеспечивается улучшенный результат по сравнению с импульсом между одной парой электродов. В патенте США № 5702359, озаглавленном "Игольчатые электроды для опосредованной доставки лекарств и генов", например, раскрыт массив игл, в котором через множество пар игл может быть пропущен импульс во время терапевтической обработки. В той заявке, которая включена в данное описание посредством ссылки в качестве полностью изложенной, иглы были расположены в круговом массиве, но имеют коннекторы и коммутационное устройство, обеспечивающие пропускание импульса между противоположными парами игольчатых электродов. Можно использовать пару игольчатых электродов для доставки рекомбинантных векторов экспрессии в клетки. Такое устройство и система описаны в патенте США № 6763264, содержание которого включено в данное описание посредством ссылки. В качестве альтернативы можно использовать устройство с одной иглой, которое позволяет вводить ДНК и электропорацию с помощью одной иглы, напоминающей иглу для нормальной инъекции, и применяет импульсы с более низким напряжением, чем то, которое применяется в используемых в настоящее время устройствах, что ослабляет дискомфорт от электричества, испытываемый пациентом.

Указанное MID может содержать один или несколько электродных массивов. Указанные массивы могут содержать две или более игл одинакового диаметра или разных диаметров. Указанные иглы могут быть равномерно или неравномерно разнесены друг от друга. Указанные иглы могут составлять от 0,005 (0,0127) до 0,03 (0,0762) дюйма (см), от 0,01 (0,0254) дюйма (см) до 0,025 (0,0635) дюйма (см) или от 0,015 (0,0381) дюйма (см) до 0,020 (0,0508) дюйма (см). Игла может быть 0,0175 (0,04445) дюйма (см) в диаметре. Иглы могут быть на расстоянии друг от друга 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 мм или более.

Указанное MID может состоять из генератора импульсов и двух или более оснащенных иглами инжекторов вакцин, которые доставляют вакцины и импульсы электропорации в один этап. Генератор импульсов может обеспечить гибкое программирование параметров импульса и инъекции с помощью пер-

сонального компьютера управляемого флэш-картами, а также всестороннюю запись и хранение данных электропорации и данных пациента. Указанный генератор импульсов может подавать импульсы различного вольтажа в течение коротких промежутков времени. Например, генератор импульсов может подавать три 15-вольтовых импульса длительностью 100 мс. Примером такого MID является система Elgen 1000 от Inovio Biomedical Corporation, которая описана в патенте США № 7328064, содержание которого включено в данное описание посредством ссылки.

Указанное MID может быть устройством и системой CELLECTRA (Inovio Pharmaceuticals, Плимут Митинг, Пенсильвания), которые представляют собой модульную систему электродов, которая облегчает введение макромолекулы, такой как ДНК, в клетки выбранной ткани в теле или растении. Указанная модульная электродная система может содержать множество игольчатых электродов; иглу для подкожных инъекций; электрический коннектор, который обеспечивает проводящую связь от программируемого регулятора импульсов постоянного тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может обхватить множество игольчатых электродов, которые установлены на опорной конструкции, и устойчиво вставить их в выбранную ткань в теле или растении. Затем макромолекулы доставляются через иглу для подкожных инъекций в выбранную ткань. Программируемый импульсный контроллер постоянного тока активируется, и электрический импульс постоянного тока подается на множество игольчатых электродов. Приложенный электрический импульс постоянного тока облегчает введение макромолекулы в клетки между множеством электродов. Гибель клеток из-за перегрева клеток сводится к минимуму путем ограничения рассеивания электричества в ткани за счет импульсов постоянного тока. Устройство и система CELLECTRA описана в патенте США № 7245963, содержание которого приведено в данном документе в качестве ссылки.

Указанное MID может быть системой Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals). Система Elgen 1000 может содержать устройство, которое имеет полые иглы; и средство доставки жидкости, в котором указанный аппарат выполнен с возможностью приводить в действие средство доставки жидкости таким образом, чтобы одновременно (например, автоматически) ввести жидкость желаемой вакцины, описанной в данном документе, в ткань тела во время введения иглы в указанную ткань тела. Преимущество в том, что способность постепенно вводить жидкость во время введения иглы, приводит к более равномерному распределению жидкости в ткань тела. Также считается, что боль, возникающая во время инъекции, снижается из-за распределения объема вводимой жидкости на большую область.

Кроме того, автоматический впрыск жидкости облегчает автоматический контроль и регистрацию фактической дозы вводимой жидкости. При необходимости эти данные могут быть сохранены блоком управления для целей документирования.

Следует принимать во внимание, что скорость инъекции может быть либо линейной, либо нелинейной и что инъекция может быть выполнена после того, как иголки были вставлены через кожу пациента, подлежащего лечению, и в то время, как они вставляются в ткань тела.

Подходящие ткани, в которые может вводиться жидкость, включают опухолевую ткань, ткань кожи или печени, но могут быть и мышечной тканью.

Устройство для введения может дополнительно содержать средства для введения иглы для направления введения иглы в ткань тела. Скорость впрыскивания жидкости контролируется скоростью введения иглы. Это имеет то преимущество, что как вставка иглы, так и впрыск жидкости могут контролироваться таким образом, что, по желанию, скорость вставки может быть согласована со скоростью инъекции. Это также облегчает управление устройством для оператора. При желании, можно предусмотреть возможность автоматической вставки иглы в ткань тела.

Пользователь может выбрать, когда начать инъекцию жидкости. В идеале, однако, инъекция начинается, когда кончик иглы достигает мышечной ткани, и устройство может включать в себя средство для определения глубины вставки иглы, достаточной для начала введения жидкости. Это означает, что инъекция жидкости может быть начата автоматически, когда игла достигла желаемой глубины (которая обычно будет глубиной, с которой начинается мышечная ткань). Глубина, с которой начинается мышечная ткань, может быть, например, принята за заданную глубину вставки иглы, такую как величина 4 мм, которая будет считаться достаточной для прохождения иглой через слой кожи.

Средства детекции могут содержать ультразвуковой зонд. Средства детекции могут содержать средство для измерения изменения импеданса или сопротивления. В этом случае средство не может само определять глубину вставки иглы в ткань тела, а будет адаптировано для детекции импеданса или сопротивления при перемещении иглы из другого типа ткани тела в мышцу. Любая из этих альтернатив обеспечивает относительно точные и простые в эксплуатации средства определения того, что инъекция может начаться. Глубина вставки иглы может быть дополнительно регистрироваться, если это необходимо, и может быть использована для управления впрыском жидкости, таким образом что объем вводимой жидкости будет определяться по мере регистрации глубины вставки иглы.

Устройство для введения может дополнительно содержать основание для поддержки иглы и корпус для приема основания в нем, причем основание подвижно относительно корпуса, так что игла убирается внутрь корпуса, когда основание находится в первом, заднем положении относительно корпуса, и игла выступает из корпуса, когда основание находится во втором, переднем положении внутри корпуса. Это

является преимуществом для пользователя, так как корпус может быть приложен к коже пациента, и иглы затем могут быть вставлены в кожу пациента путем перемещения корпуса относительно основания.

Как указано выше, желательно достичь контролируемой скорости впрыскивания жидкости, такой, чтобы жидкость равномерно распределялась по длине иглы, когда она вводится в кожу. Средство доставки жидкости может содержать средство привода поршня, адаптированное для введения жидкости с контролируемой скоростью. Указанное средство привода поршня может быть, например, активировано сервомотором. Однако средство привода поршня может приводиться в действие посредством перемещения основания в осевом направлении относительно корпуса. Понятно, что могут быть предусмотрены альтернативные способы доставки жидкости. Таким образом, например, может быть обеспечен закрытый контейнер, который может быть сжат для подачи жидкости с контролируемой или неконтролируемой скоростью вместо шприца и поршневой системы.

Можно использовать любой тип инъекции. Однако предполагается, что это особенно полезно для электропорации и поэтому может также содержать средства для приложения напряжения к игле. Это позволяет использовать иглу не только для инъекций, но и как электрод во время электропорации. Это дает особое преимущество, так как это означает, что электрическое поле прикладывается к той же области, что и вводимая жидкость. Традиционная проблема электропорации заключается в том, что очень трудно точно выровнять электрод с предварительно введенной жидкостью, и поэтому пользователи имеют тенденцию вводить больший объем жидкости, чем требуется и на большей области, и применять электрическое поле на большей области, чтобы попытаться гарантировать перекрытие между впрыскиваемым веществом и электрическим полем. Используя данное изобретение, как объем вводимой жидкости, так и размер приложенного электрического поля могут быть уменьшены при достижении хорошего соответствия между электрическим полем и жидкостью.

Введение полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, и агента может быть одновременным или последовательным.

i) Параллельное введение.

Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы и агент, можно вводить субъекту параллельно. Как используется в данном документе, "параллельно" и "одновременно" используются взаимозаменяемо. Например, полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, и агент могут быть приготовлены в виде комбинированного препарата. При приготовлении в виде комбинированного препарата полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы и агент, можно вводить субъекту в одном этапе. При приготовлении в виде комбинированного препарата полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы и агент, можно вводить субъекту путем одного этапа инъекции, например.

Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и агент, можно вводить субъекту одновременно. Как используется в данном документе, "параллельно" и "одновременно" используются взаимозаменяемо. Например, полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, и агент могут быть приготовлены в виде комбинированного препарата. При приготовлении в виде комбинированного препарата полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и агент, можно вводить субъекту в один этап. При приготовлении в виде комбинированного препарата полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и агент, можно вводить субъекту путем одного этапа инъекции, например.

ii) Последовательное введение.

Полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы и агент, можно вводить субъекту последовательно. Как используется в данном документе, "последовательно" и "друг за другом в определенный временной отрезок" используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления полипептид хондроитиназы или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, вводят субъекту до введения агента. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и агент, можно вводить субъекту последовательно. Как используется в данном документе, "последовательно" и "друг за другом в определенный временной отрезок" используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, вводят субъекту перед введением агента. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и/или полипептид хондроитиназы, или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, можно вводить субъекту

по меньшей мере около за 3, 5, 15 мин, по меньшей мере около 20 мин, по меньшей мере около 25 мин, по меньшей мере около 30 мин, по меньшей мере около 35 мин, по меньшей мере около 40 мин, по меньшей мере около 45 мин, по меньшей мере около 50 мин, по меньшей мере около 55 мин, по меньшей мере около 1 ч, по меньшей мере около 1,5 ч, по меньшей мере около 2 ч, по меньшей мере около 2,5 ч, по меньшей мере около 3 ч, по меньшей мере около 3,5 ч, по меньшей мере около 4 ч, по меньшей мере около 4,5 ч, по меньшей мере около 5 ч,

по меньшей мере около 5,5 ч при по меньшей мере около 6 ч, по меньшей мере около 7 ч, по меньшей мере около 8 ч, по меньшей мере около 9 ч, по меньшей мере около 10 ч, по меньшей мере около 11 ч, по меньшей мере около 12 ч, по меньшей мере около 15 ч, по меньшей мере около 18 ч, по крайней мере около 21 ч или по крайней мере около 24 ч до введения агента.

Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и/или полипептид хондроитиназы, или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, можно вводить субъекту за менее чем около 24 ч, менее чем около 21 ч, менее чем около 18 ч, менее чем около 15 ч, менее чем около 12 ч, менее чем около 11 ч, менее чем около 10 ч, менее чем около 9 ч, менее чем около 8 ч, менее чем около 7 ч, менее чем около 6 ч, менее чем около 5,5 ч, менее чем около 5 ч, менее чем около 4,5 ч, менее чем около 4 ч, менее чем около 3,5 ч, менее чем около 3 ч, менее чем около 2,5 ч, менее чем около 2 ч, менее чем около 1,5 ч, менее чем около 1 ч, менее чем около 55 мин, менее чем около 50 мин, менее чем около 45 мин, менее чем около 40 мин, менее чем около 35 мин, менее чем около 30 мин, менее чем около 25 мин, менее чем около 20 мин, менее чем около 10 мин, менее чем около 5 мин или менее чем около 15 мин до введения агента. Полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы и/или полипептид хондроитиназы, или полинуклеотид, кодирующий полипептид хондроитиназы, можно вводить субъекту по меньшей мере за от около 5 мин до около 24 ч перед введением агента.

с) Способы.

i) Способ доставки агента.

Данное изобретение также относится к способу доставки агента субъекту. Указанные способы могут включать введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, в количестве, достаточном для деградации гликозаминогликанов, и введение субъекту агента. Указанные способы могут дополнительно включать введение субъекту полинуклеотида, кодирующего антиген.

Данное изобретение также относится к способу доставки агента субъекту. Указанные способы могут включать введение субъекту полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, в количестве, достаточном для деградации гликозаминогликанов, и введение субъекту агента. Указанные способы могут дополнительно включать введение субъекту полинуклеотида, кодирующего антиген.

ii) Указанный способ лечения болезни или расстройства.

Данное изобретение также относится к способу лечения заболевания или расстройства у субъекта. Указанные способы могут включать введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, и введение субъекту агента. Указанные способы могут включать введение субъекту полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, и введение субъекту агента.

Заболевания могут включать, но не ограничиваются ими, сердечно-сосудистые заболевания, такие как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, гипертония, гипертрофия сердца, инфаркт миокарда, фибрилляция желудочков или предсердий и кардиомиопатия; неврологические заболевания, такие как нейропатия или нейродегенеративные заболевания; метаболическое заболевание, такое как диабет; воспалительные заболевания, включая воспалительное заболевание кишечника, такое как болезнь Крона и язвенный колит; дерматологические расстройства; аутоиммунное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, псориаз, системный дерматомиозит, ухудшение иммунных реакций на антигены, атеросклероз, ревматоидный артрит и красную волчанку; остеопороз; остеоартрит; заболевания, вызванные вирусными, бактериальными, паразитарными или грибковыми инфекциями; и рак. Например, вирусное заболевание может быть ближневосточным респираторным синдромом. Субъект, которому ввели агент и хондроитиназу, может иметь повышенный или усиленный иммунный ответ по сравнению с субъектом, которому вводили только агент. Повышенный иммунный ответ может использоваться для лечения и/или профилактики заболеваний у субъекта.

Болезнь может быть раком, например, ассоциированным с HPV раком, HBV-ассоциированным раком, раком яичников, раком предстательной железы, раком молочной железы, раком мозга, раком головы и шеи, раком горла, раком легкого, раком печени, раком поджелудочной железы, раком почки, раком кости, меланомой, метастатическим раком, раком, связанным с hTERT, раком, связанным с FAP-антигеном, немелкоклеточным раком легкого, раком крови, карциномой пищевода с ороговением, раком шейки матки, раком мочевого пузыря, колоректальным раком, раком желудка, раком анального отверстия, синовиальной карциномой, раком яичек, рецидивирующим респираторным папилломатозом, раком кожи, глиобластомой, гепатокарциномой, раком желудка, острым миелоидным лейкозом, трижды негативным раком молочной железы и первичной кожной Т-клеточной лимфомой.

Указанный способ может дополнительно включать уменьшение размера развитой опухоли или поражения у субъекта. Опухоль может быть уменьшена в размере на от около 50 до около 100%, от около 60 до около 100%, от около 70 до около 100%, от около 80 до около 100%,

от около 90 до около 100%, от около 50 до около 95%, от около 60 до около 95%, от около 70 до около 95%, от около 80 до около 95%, от около 90 до около 95%, от около 50 до около 90%, от около 60 до около 90%, от около 70 до около 90% или от около 80 до около 90% по сравнению с введением агента без хондроитиназы и/или гиалуронидазы, например.

Опухоль может быть уменьшена на около 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89%, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% по сравнению с введением агента без хондроитиназы и/или гиалуронидазы, например.

Указанный способ может дополнительно включать увеличение регрессии опухоли у субъекта по сравнению с субъектом, которому вводили агент без хондроитиназы и/или гиалуронидазы. Введение агента с хондроитиназой и/или гиалуронидазой может увеличить регрессию опухоли на от около 40 до около 60%, от около 45 до около 55% или около 50% по сравнению с введением агента без хондроитиназы и/или гиалуронидазы, например. Введение агента с хондроитиназой и/или гиалуронидазой также может увеличить скорость регрессии опухоли. Введение агента с хондроитиназой и/или гиалуронидазой может дополнительно обеспечивать регрессию опухоли у субъекта на около от 80 до около 100%, от около 85 до около 100%, от около 90 до около 100%, от около 95 до около 100%, от около 80 до около 95%, от около 85 до около 95%, от около 90 до около 95%, от около 80 до около 90% или от около 85 до около 90% по сравнению с введением агента без хондроитиназы и/или гиалуронидазы.

Опухолевая регрессия может составлять около 80%, около 81%, около 82%, около 83%, около 84%, около 85%, около 86%, около 87%, около 88%, около 89%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% у субъекта, которому вводят агент с хондроитиназой и/или гиалуронидазой, по сравнению с введением только одного агента. Опухолевая регрессия у субъекта, которому вводят агент с хондроитиназой и/или гиалуронидазой, может также составлять около 90 или около 100%.

Указанный способ может дополнительно включать предотвращение развития рака или опухоли у субъекта, которому вводили агент с хондроитиназой. Эта профилактика может позволить субъекту, которому ввели агент с хондроитиназой, выжить при появлении рака в будущем. Другими словами, агент с хондроитиназой обеспечивает защиту от рака субъекту, которому вводится агент с хондроитиназой. Субъект, которому ввели агент с хондроитиназой, может иметь от около 90 до 100% выживаемости при раке по сравнению с введением только одного агента. Субъект, которому ввели агент с хондроитиназой, может иметь около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% выживаемости при раке, по сравнению с введением только одного агента.

Данное изобретение имеет множество аспектов, иллюстрируемых следующими неограничивающими примерами.

5) Примеры.

Пример 1.

Способы для примеров 2 и 3.

В общей сложности 20 мышей для обоих исследований INO-16-056 (Balb/c) или INO-16-057 (C57BL/6) были разделены на четыре группы из 5 самок мышей (в возрасте 6-7 недель) и были иммунизированы рGX9214, ДНК-плазмидой, кодирующей человеческое антитело (DMAb), реакционноспособное к *Pseudomonas aeruginosa*.

Левую ТА мышцу каждой мыши в экспериментальной группе 2 (см. табл. 1) предварительно обрабатывали 30 мкл гиалуронидазы (400 единиц/мл, очищенной из семенников быка) за 30 мин до доставки рGX9214. Мыши 3-й группы получали предварительную обработку 30 мкл хондроитиназы АС из *Flavibacterium herapinum*, а мышам группы 4 давали предварительную обработку, содержащую комбинацию гиалуронидазы и хондроитиназы в тех же концентрациях в и их левую ТА-мышцу, и за этим следовал рGX9214 плюс ЭП через 30 мин. Мышам контрольной группы (группа 1) вводили ФСБ до доставки ДНК и ЭП.

Плазмидную ДНК вводили в концентрации 0,1 мг в 30 мкл SSC внутримышечно в участки, которые получали предварительную обработку ферментом (группа 2, 3 и 4) или были без предварительной обработки (группа 1), и электропорацию проводили сразу после инъекции. Электропорацию применяли к месту инъекции с использованием прибора CELLECTRA®-3P (2 мм электроды) (Inovio Pharmaceuticals, Inc.).

Параметры были следующими:

Количество импульсов = 2 серии из 2 импульсов (2×2).

Сила тока = 0,1 А.

Максимальное напряжение = 200 В.

Длительность импульса электропорации = 52 мс.

Интервалы, разделяющие импульсы = 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

В сутки 0, 3, 7 у мышей брали кровь (50 мкл) и уровни IgG каппа человека (DMAb PseudoV2L2MD) измеряли в сыворотке с помощью ИФА.

Для анализа гуморальных ответов против hIgG был выполнен ИФА против стандартного белка hIgG каппа.

Пример 2.

Обработка мышц хондроитиназой до доставки вакцины pMAb-Balb/c.

Определяли уровень экспрессии, кодируемого ДНК, моноклонального антитела в сыворотке мышей Balb/c, обработанных pGX9214 (Pseudo V2L2MD). Предварительная обработка участка доставки в мышцы хондроитиназой AC из *Flavobacterium heparinum* аналогична гиалуронидазе, полученной из бычьих семенников, значительно повышает детектируемые системные уровни hIgG в сыворотке.

Таблица 1

Детали эксперимента для примера 2

Номер Группы (№/группа)	№ ушной бирки животного	Предварительная обработка	Плазмида	№ участка (-ов) инъекции/Местоположение/Тх	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	831-835	ФСБ	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
2. 5	836-840	* Гиалуронидаза (семенники быка)	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
3. 5	841-845	** Хондроитиназа AC (<i>F. Heparinum</i>)	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
4. 5	846-850	Хондроитиназа AC (<i>F. Heparinum</i>) + гиалуронидаза (семенники быка)	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1

* Гиалуронидаза: Sigma Aldrich; № в каталоге H4272-30 мг; 400 ед./мл; 4 мкл/100 мкл ФСБ.

** Хондроитиназа; Sigma Aldrich; № в каталоге C2780; 0,5 ед./мл; разбавить 1:10 из стока в ФСБ. Обработка ферментами проводилась за 30 мин до доставки DMAb.

Таблица 2

Детали плазмиды для примера 2

Код	Название	№ партии R&D	Дата изготовления
pGX9214	Pseudo V2L2MD	D150827	9/1/2015

Пример 3.

Обработка мышц хондроитиназой до доставки вакцины пДНК-C57BL/6.

Подобно мышам Balb/c, мыши C57BL/6, обработанные хондроитиназой и pGX9214, демонстрируют повышенный уровень экспрессии, кодируемого ДНК, моноклонального антитела в их сыворотке по сравнению с мышами, которые получали только pGX9214 плюс ФСБ. Уровни hIgG были сопоставимы с уровнями у мышей, предварительно обработанных гиалуронидазой перед инъекцией ДНК и ЭП, тем самым показывая, что предварительная обработка участка доставки в ТА мышцу мыши хондроитиназой

значительно повышает системные уровни hIgG в сыворотке (см. фиг. 2).

Таблица 3

Детали эксперимента для примера 3

Номер Группы (№/группа)	№ ушной бирки животного	Предварительная обработка	Плазмида	№ участка (-ов) инъекции/Местополо жение/Тх	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	876- 880	ФСБ	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
2. 5	881- 885	* Гиалуронидаз а (семенники быка)	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
3. 5	886- 890	** Хондроитиназ а АС (F. Heparinum)	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
4. 5	891- 895	Хондроитиназ а АС (F. Heparinum) + гиалуронид аза (семенники быка)	pGX9214	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1

* Гиалуронидаза: Sigma Aldrich; № в каталоге H4272-30 мг; 400 ед./мл; 4 мкл/100 мкл ФСБ.

** Хондроитиназа; Sigma Aldrich; № в каталоге C2780; 0,5 ед./мл; разбавить 1:10 из стока в ФСБ. Обработка ферментами проводилась за 30 мин до доставки DMAb.

Таблица 4

Детали плазмиды для примера 2

Код	Название	№ партии R&D	Дата изготовления
pGX9214	Pseudo V2L2MD	D150827	9/1/2015

Резюме примеров 2 и 3.

Данные исследования демонстрируют, что введение хондроитиназы в ТА мышцу мышей Balb/c, а также мышей C57BL/6 до доставки DMAb плюс ЭП усиливает экспрессию hIgG в сыворотке.

На фиг. 1 продемонстрировано, что экспрессия hIgG в сыворотке у мышей Balb/c в момент пика (7-е сутки) в группе 3 предварительно обработанной хондроитиназой была увеличена в 13,5 раз (среднее значение 2904,53 нг/мл) по сравнению с группой 1 (среднее значение 214,86 нг/мл). C57BL/6, получавшие такую же обработку (исследование INO-16-057), продемонстрировали 8,8-кратное увеличение экспрессии hIgG в сыворотке на 7-е сутки в группе 3, предварительно обработанной хондроитиназой (среднее значение 5428,49 нг/мл) по сравнению с контрольной группой 1 (среднее значение 618,21 нг/мл). Уровни экспрессии hIgG в сыворотке групп, предварительно обработанных хондроитиназой, были сопоставимы с уровнями экспрессии hIgG в сыворотке, продемонстрированными в группах, предварительно обработанных гиалуронидазой в обоих линиях мышей.

Предварительную обработку мышцы хондроитиназой можно использовать для усиления экспрессии DMAb в мышечной сыворотке.

Пример 4.

Способы для примера 5.

Четырем группам самок морских свинок, содержащих по пять животных каждая, вводили pGX9207, ДНК-плазмиду, кодирующую человеческое антитело (DMAb), реактивное к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (MERS-coV). Инъекция ДНК с последующей электропорацией выполнялась в обеих четырехглавых мышцах (квадрицепсах) во всех группах.

Морских свинок из группы 3 обрабатывали 200 мкл хондроитиназы АС (0,5 единиц/мл) в каждую мышцу за 90 мин до доставки DMAb. Контрольные группы либо были предварительно обработаны ФСБ (группа 1), либо гиалуронидазой (группа 2, 400 единиц/мл, очищенная из семенников быка). Чтобы проверить, обладает ли хондроитиназа аддитивным эффектом для деградации внеклеточного матрикса квадрицепсов при доставке с гиалуронидазой, животных предварительно обрабатывали обоими ферментами, гиалуронидазой и хондроитиназой, за 90 мин до доставки DMAb и ЭП в группе 4.

PGX 9207 вводили в концентрации 0,45 мг в 200 мкл SSC внутримышечно на участках, которые получали предварительную обработку ферментом (группа 2, 3 и 4), или участках без предварительной обработки (группа 1) и ЭП выполняли сразу после инъекции. Электропорацию применяли к участку инъекции с использованием устройства CELLECTRA®-3P (8 мм электроды) (Inovio Pharmaceuticals, Inc.).

Параметры были следующими:

количество импульсов: 2 серии из 2 импульсов (2×2);

сила тока: 0,2 А;

максимальное напряжение: 200 В;

длительность импульса электропорации: 52 мс;

интервалы, разделяющие импульсы: 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

В сутки 0, 3, 7, 10, 14, 17 и 21 у морских свинок отбирали кровь (200 мкл), а уровни человеческого IgG каппа (DMAb MERS-hIgG) измерялись в сыворотке с помощью ИФА.

Таблица 5

Детали эксперимента для примера 5

Номер Группы (№/группа)	№ ушной бирки животного	Предварительная обработка	Плазмида	№ участка (-ов) инъекции/Место положения/Тх	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	201-205	ФСБ	pGX9207	1/ квадрицепс, левый и правый участок	CELL., 8 мм, удлиненный	0,2	0,45	0,9
2. 5	206-210	* Гиалуронид аза (семенники быка)	pGX9207	1/ квадрицепс, левый и правый участок	CELL., 8 мм, удлиненный	0,2	0,45	0,9
3. 5	211-215	** Хондроитин аза АС (F. Heparinum)	pGX9207	1/ квадрицепс, левый и правый участок	CELL., 8 мм, удлиненный	0,2	0,45	0,9
4. 5	216-220	Хондроитин аза АС (F. Heparinum) +гиалурони даза (семенники быка)	pGX9207	1/ квадрицепс, левый и правый участок	CELL., 8 мм, удлиненный	0,2	0,45	0,9

* Гиалуронидаза: 400 ед./мл. ** Хондроитиназа: 0,5 ед./мл.

Обработка ферментами проводилась за 90 мин до доставки DMAb.

Таблица 6

Детали плазмиды для примера 2

Код	Название	№ партии R&D	Концентрация (мг/мл)	Дата изготовления
pGX9207	MERS IgG	Объединено из нижеуказанных	8,7 мг/мл	2/26/2016
		D150803A	13,9	8/6/2015
		D150730	10,6	8/3/2015
		D150528	10,4	5/28/2015
		D150728	8,45	7/28/2015
		D150311B	5,6	3/11/2015
		D163682	1	
		D160216	8,93	2/6/2016

Пример 5.

Обработка хондроитиназой усиливает системную, основанную на ДНК, экспрессию антитела.

Действие хондроитиназы AC, полученной из бактерии *Flavobacterium heparanum*, повышает системные уровни hIgG в сыворотке у морских свинок после введения pGX9207 путем инъекции и электропорации (ЭП).

Кинетика уровней hIgG в сыворотке у морских свинок Хартли продемонстрирована на фиг. 3. В каждой группе пиковая экспрессия наблюдается на 7-е сутки. Морские свинки Хартли, обработанные 0,5 ед/мл хондроитиназы AC в 200 мкл в оба квадрицепса за 90 мин до доставки DMAb и ЭП имели 8,6-кратное увеличение уровня hIgG в их сыворотке (среднее значение 7-х суток - 485,39 нг/мл) по сравнению с морскими свинками предварительно обработанными контрольным реагентом ФСБ (среднее значение 7-х суток - 98,79 нг/мл, см. фиг. 3). Предварительная обработка хондроитиназой приводила к 1,74-кратному увеличению уровней hIgG, по сравнению с предварительной обработкой гиалуронидазой (среднее значение 7-х суток - 278,41 нг/мл), используемой в качестве положительного контроля. Одновременное применение обоих ферментов за 90 мин до доставки DMAb и ЭП (среднее значение 849,57 нг/мл) свидетельствует об аддитивном эффекте (повышение в 3 раза по сравнению с гиалуронидазой и в 1,75 раз по сравнению с хондроитиназой).

Концентрации IgG, обнаруженные в сыворотке морских свинок, подвергшихся воздействию комбинации ферментов гиалуронидазы и хондроитиназы, были выше по сравнению с уровнями у морских свинок, предварительно обработанных одним ферментом. Пример кинетики экспрессии pGX9207 изображен на фиг. 4.

Пример 6.

Хондроитиназа усиливает экспрессию белка, кодируемую плазмидой у мышей (INO-16-056 и INO-16-057).

В общей сложности 10 мышей для INO-16-056 (Balb/c) или INO-16-057 (C57BL/6) были разделены на две группы из 5 самок мышей (в возрасте 6-7 недель) и получили инъекцию pGX9214 (PseudoV2L2MD (№ партии D150827)), ДНК-плазмиды, кодирующей человеческое антитело (DMAb), реакционноспособное к *Pseudomonas aeruginosa*.

Левую скелетную мышцу каждой мыши в экспериментальной группе 2 (табл. 7) предварительно обрабатывали 30 мкл хондроитиназы AC (очищенной из *Flavobacterium heparinum*, Sigma Aldrich) за 30 мин до доставки pGX9214. Мышам контрольной группы (группа 1) вводили ФСБ до доставки ДНК и ЭП.

Таблица 7

Детали эксперимента для примера 6

Номер Группы (№/группа)	№ ушной бирки животного	Предварительная обработка	Плазмида	№ участка (-ов) инъекции/Местоположение/Гх	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	831-835	ФСБ	pGX9214	1/ТА, левая сторона	CELL., 3P	30	0,1	0,1
2. 5	841-845	* Хондрои тиназа АС	pGX9214	1/ТА, левая сторона	CELL., 3P	30	0,1	0,1

* Протокол табл. 6 INO-16-056 - хондроитиназа АС (Sigma Aldrich, № в каталоге C2780; 0,5 ед./мл, обработка ферментом была выполнена за 30 мин до доставки пДНК. Линия мышей: Balb/c.

Таблица 8

Дополнительные детали эксперимента для примера 6

Номер Группы (№/группа)	№ ушной бирки животного	Предварительная обработка	Плазмида	№ участка (-ов) инъекции/Местоположение/Гх	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	876-880	ФСБ	pGX9214	1/ТА, левая сторона	CELL., 3P	30	0,1	0,1
2. 5	886-890	* Хондрои тиназа АС	pGX9214	1/ТА, левая сторона	CELL., 3P	30	0,1	0,1

* Протокол табл. 8 INO-16-057-хондроитиназа АС (Sigma Aldrich, № в каталоге C2780; 0,5 ед./мл, обработка ферментом была выполнена за 30 мин до доставки пДНК. Линия мышей: C57BL/6.

Плазмидную ДНК вводили в концентрации 0,1 мг в 30 мкл SSC внутримышечно на участках, которые получали предварительную обработку ферментом (группа 2) или участках без предварительной обработки (группа 1), и электропорацию проводили сразу после инъекции. Электропорацию применяли к месту инъекции с использованием прибора CELLECTRA®-3P (2 мм электроды) (Inovio Pharmaceuticals, Inc.).

Параметры для мышей для всех экспериментов в этом отчете были такими:

количество импульсов = 2 серии из 2 импульсов (2×2),

сила тока = 0,1 А,

максимальное напряжение = 200 В,

длительность импульса электропорации = 52 мс,

интервалы, разделяющие импульсы = 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

В сутки 0, 3, 7 у мышей отбирали кровь (50 мкл), а уровни IgG каппа человека (DMAb PseudoV2L2MD) измеряли в сыворотке с помощью ИФА.

Результаты INO-16-056:

Здесь представлен уровень экспрессии кодируемого ДНК моноклонального антитела в сыворотке мышей Balb/c, обработанных pGX9214 (PseudoV2L2MD). Предварительная обработка участка доставки в мышцы с помощью хондроитиназы АС из *Flavobacterium heparinum* значительно повышает детектируемые системные уровни в сыворотке hIgG (фиг. 5).

Результаты INO-16-057:

Подобно мышам Balb/c, мыши C57BL/6, обработанные хондроитиназой и pGX9214, демонстрируют

повышенный уровень экспрессии кодируемого ДНК моноклонального антитела в их сыворотке по сравнению с мышами, которые получали только рGX9214 плюс ФСБ (фиг. 6).

Вывод для исследований INO-16-056 и INO-16-057:

Эти исследования демонстрируют, что введение хондроитиназы в скелетную мышцу мышей Balb/c, а также мышей C57BL/6 до доставки DMAb плюс ЭП усиливает экспрессию hIgG в сыворотке. На фиг. 5 продемонстрировано, что экспрессия hIgG в сыворотке у мышей Balb/c в пиковой временной точке (7-е сутки) в группе 2, предварительно обработанной хондроитиназой, была увеличена в 13,5 раза (среднее значение 2904,53 нг/мл) по сравнению с группой 1 (среднее значение 214,86 нг/мл). C57BL/6, которые получали такую же обработку (исследование INO-16-057), продемонстрировали 8,8-кратное увеличение экспрессии hIgG в сыворотке на 7-е сутки в группе 2, предварительно обработанной хондроитиназой (среднее значение 5428,49 нг/мл) по сравнению с контрольной группой 1 (среднее 618,21 нг/мл).

Ввиду вышеизложенного предварительная обработка мышцы хондроитиназой может быть использована для усиления экспрессии пДНК.

Пример 7.

Cho-ABC (хондроитиназа ABC) клинического уровня качества приводит к увеличению уровней белков, кодируемых плазмидой (INO-16-083B и INO-16-097).

Чтобы в конечном итоге перенести основные доклинические исследования хондроитиназы в клинику, была протестирована хондроитиназа ABC клинического уровня качества. По заверениям производителя, этот продукт очищается из *Proteus vulgaris* катионообменной хроматографией, имеет низкие уровни эндотоксинов и не содержит никаких примесей, таких как хондросульфатазы, протеазы, гепариназы и гепаритиназы. Указанный фермент проявляет сходную активность с хондроитиназой ABC (Condoliase) от Seikagaku. Кроме того, добавили GALNS, человеческую рекомбинантную хондроитиназу (R&D system) к нашему анализу. Этот фермент, также известный как лизосомальная N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза (GalNAc6S), гидролизует 6-сульфатные группы единиц N-ацетил-D-галактозамин-6-сульфата хондроитинсульфата и единиц D-галактоз-6-сульфата кератансульфата. В клинике этот фермент применяется для лечения синдрома Моркио типа А или мукополисахаридоза 4А, лизосомальной болезни накопления. Болезнь характеризуется внутриклеточным накоплением кератансульфата и хондроитин-6-сульфата из-за отсутствия GalNAc6S. Источником этого белка является *Spodoptera frugiperda*, полученный из Sf 21 (бакуловирус) Ala27-His522 с N-концевым 6-His-тэгом.

Целью было определить способность хондроитиназы AC (*F. heparinum*, Sigma Aldrich), хондроитиназы ABC клинического уровня качества (*P. vulgaris*, Amsbio) и GALNS (рекомбинантная хондроитиназа человека, R&D systems) для усиления экспрессии пДНК. Позже исследовали влияние различных доз хондроитиназы ABC.

INO-16-083B: для оценки эффективности трех разных типов хондроитиназ мышей Balb/c разделили на четыре группы из 5 мышей на группу. Каждая мышь получала инъекцию 0,1 мг плазмидной ДНК рGX9203, кодирующей вирус-специфическое моноклональное антитело к вирусу Денге hIgG-DVSF-1 (№ партии D160222A) в левую скелетную мышцу с последующей электропорацией. Параметры процедур выполнялись, как описано для исследования 1. Мышей обрабатывали соответствующими ферментами или ФСБ в качестве контроля за 30 мин до введения ДНК, как показано в табл. 2.1. Образцы крови собирали в сутки 0, 3 и 7, а уровни в сыворотке человеческого IgG лямбда измеряли с помощью ИФА.

Данные демонстрируют, что оба фермента хондроитиназа AC и хондроитиназа ABC усиливают экспрессию гена (фиг. 7). Однако рекомбинантный белок GALNS не усиливает.

INO-16-097: для определения оптимальной концентрации для следующих экспериментов было проверено влияние различных доз хондроитиназы ABC клинического уровня качества. Подробная экспериментальная стратегия описана в табл. 2.3. Четыре разных дозы хондроитиназы ABC в диапазоне от 0,1 до 5 ед./мл применяли у мышей Balb/c (группа 2-5) до переноса гена рGX92 07 в левую скелетную мышцу и сравнивали с ФСБ контрольной группой 1.

Увеличение концентраций хондроитиназы ABC дополнительно усиливало экспрессию трансгена при 2,5 ед./мл в качестве оптимальной дозы для наших животных моделей (фиг. 8).

Для исследований INO-16-083B и INO-16-097: Когда животных предварительно обрабатывали соответствующими хондроитиназами, фермент клинического уровня качества приводил к аналогичному увеличению экспрессии генов, как и хондроитиназа AC, что было успешно показано в предыдущих экспериментах. Путем применения концентрации 2,5 ед./мл перед инъекцией рGX9207 обнаружили 4-кратное увеличение уровней IgG человека в сыворотке по сравнению с контрольной ФСБ группой. Это наблюдение подтвердило, что хондроитиназа ABC приводит к значительному увеличению уровней белка, кодируемых плазмидой, и является отличной отправной точкой для дальнейшего тестирования.

Таблица 9

Детали эксперимента для примера 7

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	Предварительная обработка	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	201-205	pGX9203	ФСБ	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1
2. 5	211-215	pGX9203	* Хондроитиназа АС	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1
3. 5	216-220	pGX9203	** Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1
4. 5	221-225	pGX9203	*** GALNS	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1

Протокол INO-16-083B.* Хондроитиназа АС (F. heparinum); Sigma Aldrich; № в каталоге C2780; 0,5 ед./мл; ** Хондроитиназа ABC (P. vulgaris); Amsbio, № в каталоге AMS.E1028-10; 0,5 ед./мл, рекомбинантный белок GALNS человека, R&D systems, № в каталоге 8269-SU-050; 20 мкг/мл. Обработку ферментами проводили за 30 мин до доставки пДНК; линия мышей: Balb/c.

Таблица 10

Дополнительные детали эксперимента для примера 7

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	Предварительная обработка	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл) – Конц. фермента (ед./мл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 5	201-205	pGX9207	ФСБ	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30 - -	0,1	0,1
2. 5	211-215	pGX9207	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30-0,1	0,1	0,1
3. 5	216-220	pGX9207	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30-0,2	0,1	0,1
4. 5	221-225	pGX9207	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30-0,5	0,1	0,1
5. 5	351-355	pGX9207	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30-2,5	0,1	0,1

Протокол INO-16-097 хондроитиназа ABC (P. vulgaris); Amsbio, № в каталоге AMS.E1028-10; обработку ферментами проводили за 30 мин до доставки пДНК; линия мышей: Balb/c. pGX9207 (MERS IgG) - партия № 63682.

Пример 8.

Введение Cho-ABC приводит к усиленной экспрессии белка (INO-16-188).

Предыдущие эксперименты показали, что хондроитиназа ABC клинического уровня чистоты применима для усиления, зависимой от плазмиды, экспрессии генов у мышей. Чтобы дополнительно под-

твердить это открытие, следующим шагом было предоставление визуальных изображений этой усиленной экспрессии генов в обработанной хондроитиназой мышце скелета мышей. Следовательно, экспрессия репортерного гена и измеренная экспрессия белка основаны на флуоресценции.

Для количественной оценки экспрессии репортерного гена фермент (2,5 ед./мл, стандартная предварительная обработка 30 мин) ФСБ (контроль) и пДНК (pGX9902, доза 50 мкг на ногу) доставляли в левую и правую скелетную мышцу мышей путем электропорации (табл. 11). Через 72 ч мышинные задние конечности рассекали и удаляли кожу. Интенсивность флуоресценции в обработанных мышцах мыши измеряли с помощью системы визуализации флуоресценции (ProteinSimple) и количественно определяли AlphaView SA.

Указанные данные демонстрируют, что экспрессия репортерного гена в мышцах мыши при обработке (30 мин) хондроитиназой ABC была усилена (фиг. 9).

Путем визуализации белка через 72 ч после обработки были получены данные, которые демонстрируют, что хондроитиназа значительно улучшает экспрессию генов. Было достигнуто 6,7-кратное улучшение с применением фермента до обработки репортерной пДНК по сравнению с контрольной группой. Этот вывод доклинических экспериментов с мышью также гарантировал, что хондроитиназа ABC может потенциально продвинуть иммунотерапию на основе ДНК.

Таблица 11

Детали эксперимента для примера 8

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмиды	Предварительная обработка	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл)	Доза ДНК на участок (мкг)	Общая доза ДНК/плазмиды (мг)
1. 3	151-153	pGX9902	ФСБ	1/ТА, левый и правый участок	CELL., ЗР	30	50	0,1
2. 3	154-156	pGX9902	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый и правый участок	CELL., ЗР	30	50	0,1

Протокол INO-16-188. Мышей предварительно обрабатывали хондроитиназой ABC (2,5 ед./мл) или ФСБ (контроль) в скелетную мышцу с левой и правой стороны за 30 мин до инъекции пДНК (pGX9902). Линия мышей: Balb/c.

Пример 9.

Гистологический анализ мышц, обработанных хондроитиназой ABC (INO-16-195).

Чтобы проверить, влияет ли хондроитиназа ABC на морфологические изменения мышечной ткани мыши, была исследована гистопатология обработанных задних конечностей в месте инъекции.

Четыре группы мышей получали либо обработку хондроитиназой (группа 2 и 3), либо ФСБ (группы 1 и 4) в их левую и правую скелетные мышцы задней конечности (табл. 12). Плазмидную ДНК (pGX9207 - MERS IgG (№ партии 163682)) доставляли электропорацией в мышцы мышей, принадлежащих к группам 1 и 2. Через 72 ч мышинные задние конечности были рассечены и скелетные мышцы были выделены для окрашивания гематоксилином и эозином (H&E). Окрашивание H&E, а также сканирование слайдов выполнялось контрактной исследовательской организацией (Reveal Biosciences). После получения изображений всей мышцы были отобраны репрезентативные примеры гистопатологии мышц с использованием программного обеспечения CaseViewer.

Экспериментальные животные не проявляли никаких признаков изменения их поведения и казались здоровыми во время и после процедур экспериментальной обработки. После завершения анализа доказательств спонтанного воспаления не наблюдалось и не наблюдалось никакого повреждения тканей или других явных гистологических изменений, когда мышцы мышей обрабатывались только хондроитиназой по сравнению с ФСБ контролем (фиг. 10). Когда пДНК дополнительно доставляли электропорацией, наблюдалось присутствие проникнувших иммунных клеток как у мышей, предварительно обработанных хондроитиназой, так и у мышей предварительно обработанных ФСБ.

Эти данные демонстрируют, что электропорация, а не фермент, вызывает обратимые изменения в морфологии тканей, что указывает на то, что введение фермента не должно опосредовать серьезные нежелательные явления (SAE).

Несколько большее количество проникающих клеток в группе хондроитиназы плюс пДНК/ЭП, ве-

роятно, связано с более высокой эффективностью трансфекции пДНК.

Таблица 12

Дополнительные детали эксперимента для примера 9

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	Предварительная обработка	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл)	Конц. фермента (ед./мл)	Доза ДНК на участок (мкг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 3	326-330	pGX9 207	ФСБ	1/ТА, левый и правый участок	CELL., 3P	30	---	50	0,1
2. 3	336-340	pGX9 207	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый и правый участок	CELL., 3P	30	2.5	50	0,1
3. 3	341-345	Нет плазмиды	Хондроитиназа ABC	1/ТА, левый и правый участок	CELL., 3P	30	2.5	50	0,1
4. 3	346-350	Нет плазмиды	ФСБ	1/ТА, левый и правый участок	CELL., 3P	30	---	50	0,1

Пример 10.

Cho-ABC усиливает экспрессию белка, кодируемого плазмидой у новозеландских кроликов (INO-16-157).

Для дальнейшего изучения влияния хондроитиназы на иммунотерапию на основе ДНК было проведено исследование того, была ли внутримышечная предварительная обработка хондроитиназой ABC эффективной для улучшения экспрессии белка у кролика.

2 мг pGX9207 (MERS IgG (№ партии 63682)) вводили 12 новозеландским кроликам (группа 1 и группа 2, возраст животных: 9 недель, табл. 13). Электропорацию применяли к участку инъекций в скелетной мышце с использованием устройства CELLECTRA®.

Параметры для кроликов были такими для всех экспериментов в этом отчете:

количество импульсов = 3 импульса,

сила тока = 0,5 А,

длительность импульса электропорации = 52 мс,

интервалы, разделяющие импульсы = 1 с между импульсами.

Животных группы 2 предварительно обрабатывали хондроитиназой в тот же участок, что и доставляли пДНК и животные группы 1 служили контрольной ФСБ группой. Отбор крови проводили в сутки 0, 3, 5 и 6. Уровни IgG человека измеряли с помощью ИФА.

Данные продемонстрировали значительное повышение уровней hIgG в сыворотке в группах, мышцы которых были предварительно обработаны ферментом по сравнению с предварительной обработкой ФСБ.

Значительное улучшение экспрессии генов на основе ДНК у кролика путем инъекции фермента, разрушающего матрикс (в 4,9 раза по сравнению с контролем) согласуется с данными у мышей и еще более утверждает эффективность использования хондроитиназы ABC в генной терапии на основе плазмидной ДНК.

Таблица 13

Детали эксперимента для примера 10

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмиды	Предварительная обработка	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение объем на обработку (мл)	Конц. фермента (ед./мл)	Доза ДНК на участок (мкг)	Общая доза ДНК/плазмиды (мг)
1. 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	pGX9207	ФСБ	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	---	1	2
2. 6	21, 22, 23, 24, 25, 26	pGX9207	Хондроитиназа ABC	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	2.5	1	2

Пример 11.

Комбинированный препарат Cho ABC с пДНК у мышей (INO-16-99B, INO-16-201, INO-16-188).

Предыдущие эксперименты показали, что точное время предварительной обработки хондроитиназой не является существенным для оптимальной экспрессии генов. Никаких существенных различий у мышей не наблюдалось, когда их предварительно обрабатывали 5, 15, 30 мин, 2, 24 или 48 ч до доставки пДНК и ЭП. Это поставило вопрос, возможен ли комбинированный препарат хондроитиназы ABC с пДНК без отрицательного воздействия на экспрессию гена.

С этой целью 14 мышей обрабатывали ферментом (2,5 ед./мл) и пДНК (pGX9702, MERS IgG (№ партий: 63682 и 72883)) в одной инъекции (группа 3). ЭП проводили через 1 мин после инъекции из-за необходимого времени реакции хондроитиназы. В этот эксперимент были включены две контрольные группы: мышей группы 1 предварительно обрабатывали ФСБ, а мышам группы вводили инъекцию фермента (группа 2). Доставка пДНК путем электропорации проводилась в обеих группах через 30 мин.

Параметры для мышей для всех экспериментов с комбинированным препаратом в этом отчете были такими:

количество импульсов = 2 серии из 2 импульсов (2×2),

сила тока = 0,1 А,

максимальное напряжение = 200 В,

длительность импульса электропорации = 52 мс,

интервалы, разделяющие импульсы = 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

В сутки 0, 3, 6 у мышей отбирали кровь (50 мкл), а уровни IgG каппа человека (DMAb PseudoV2L2MD) измеряли в сыворотке с помощью ИФА.

Животные, получившие комбинированный препарат, показали значительное сильное увеличение hIgG в их сыворотке по сравнению с контрольной ФСБ группой (группа 1). Примечательно, что не было существенных различий в продукции белка между животными, которые прошли стандартную процедуру (предварительная обработка 30 мин, группа 2) и животными, которые получали новую процедуру переноса гена (группа 3).

Результаты демонстрируют, что комбинированный препарат хондроитиназы с пДНК возможен. Экспрессия генов у животных, которые получали единственную инъекцию (фермент/пДНК), была в 5,6 раза выше, чем уровни экспрессии в контрольной ФСБ группе. Повышенные уровни экспрессии белка были эквивалентны первоначальной процедуре предварительной обработки тканей. Техники и способы комбинированного препарата могут быть менее сложными, менее технически требовательными и менее времязатратными.

Детали эксперимента для примера 11

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	фермент или ФСБ	Временная точка введения фермента или комбинированной доставки	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 14	437-442, 250-257	pGX9 207	ФСБ	30 мин до DMAb/ЭП	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1
2. 14	413-418, 266-273	pGX9 207	Хондроитиназа ABC	30 мин до DMAb/ЭП	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1
3. 14	425-430, 282-289	pGX9 207	Хондроитиназа ABC	Комбинированная доставка DMAb с ферментом, задержка ЭП 1 мин	1/ТА, левый участок	CELL., 3P	30	0,1	0,1

Пример 12.

Комбинированный препарат хондроитиназы с пДНК приводит к усиленной экспрессии флуоресцентного белка (INO-16-188).

Следующим последовательным шагом было подтверждение достоверности наблюдений с флуоресцентной репортерной плазмидой.

Для визуализации экспрессии репортерного гена хондроитиназу (2,5 ед./мл), ФСБ (контроль) и пДНК (pGX9902) доставляли в виде одиночной инъекции в левую и правую скелетную мышцу мышей путем электропорации (табл. 15). Рассечение задних конечностей проводилось через 72 ч после обработки. Интенсивность флуоресценции в обработанных мышцах мыши измеряли с помощью визуализатора (система FluorChem M, ProteinSimple) и количественно определяли AlphaView SA.

В соответствии с предыдущими данными комбинированный препарат хондроитиназы ABC и пДНК приводит к усиленной экспрессии генов по сравнению с ФСБ контролем. Никаких существенных различий в экспрессии генов не было видно между 3-й группой (комбинированный препарат) и группой 2 (стандартная предварительная обработка 30 мин).

Визуализация экспрессии генов с использованием репортерной плазмиды подтверждает, что комбинированный препарат фермента и пДНК в одной инъекции имеет преимущество в мышинной модели.

Таблица 15

Детали эксперимента для примера 12

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	фермент или ФСБ	Временная точка введения фермента или комбинированной доставки	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 3	151-153	pGX9902	ФСБ	30 мин до DMAb/ЭП	1/ТА, левый и правый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
2. 3	154-156	pGX9902	Хондроитиназа ABC	30 мин до DMAb/ЭП	1/ТА, левый и правый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1
3. 14	160-162	pGX9202	Хондроитиназа ABC	Фермент/пДНК КоП, ЭП с задержкой в 1 мин	1/ТА, левый участок	CELL., ЗР	30	0,1	0,1

Протокол INO-16-188. Мыши группы 3 получали одну инъекцию хондроитиназы ABC (2,5 ед./мл) и пДНК (pGX9902) в скелетную мышцу с левой и правой стороны за 1 мин до ЭП. Мышей контрольных групп обрабатывали после стандартного протокола: они были либо предварительно обработаны хондроитиназой, либо ФСБ за 30 мин до доставки пДНК и ЭП. Линия мышей: Balb/c. КоП = комбинированный препарат.

Пример 13.

Комбинированный препарат Cho ABC с пДНК в экспериментах на кроликах (INO-16-180).

Для оценки влияния комбинированного препарата хондроитиназы ABC/пДНК на экспрессию генов больших мышц был проведен эксперимент на скелетной мышце кролика. Кроме того, было проверено дает ли преимущество задержка электропорации в этой модели. Наконец, изучалось, влияет ли одночасовая инкубация фермента с пДНК на экспрессию гена *in vivo*.

Для этой цели 3 группам кроликов (новозеландских кроликов, 6 животных в группе, возраст 12 недель) вводили комбинированный препарат фермент/пДНК (pGX9207) в левую скелетную мышцу (две инъекции, табл. 16). ЭП немедленно проводили после доставки фермента/пДНК в группу 3. В группе 4 и 5 электропорация была задержана и проведена через 1 мин после введения фермента/пДНК. Животные группы 5 получали смесь хондроитиназы и пДНК, которую инкубировали на льду 1 ч до обработки. Животные группы 1 служили в качестве ФСБ контролей, а животных группы 2 предварительно обрабатывали в соответствии с нашим 30-минутным стандартным протоколом. Электропорацию применяли к участку инъекций в скелетной мышце с использованием устройства CELLECTRA®. Отборы крови проводились в 0, 4 и 5 сутки. Уровни IgG человека измеряли с помощью ИФА.

По измерению уровней IgG человека в сыворотке кролика, продуцирование белка было значительно увеличено у кроликов, которым вводили комбинированный препарат по сравнению с контролем (фиг. 14). Кроме того, задержка ЭП 1 мин была ассоциирована с увеличенными уровнями IgG человека в сыворотке и была показана эквивалентная экспрессия при приготовлении в виде комбинированного препарата за 1 ч до доставки с комбинированным препаратом за несколько минут до доставки.

Результаты демонстрируют способность комбинированного препарата хондроитиназы с пДНК усиливать экспрессию генов. Дальнейшее развитие этого нового протокола путем добавления задержки ЭП в 1 мин привело к увеличению экспрессии в 6,41 раза по сравнению с контролем. После инкубации комбинированного препарата фермент/пДНК в течение 1 ч были получены эквивалентные уровни экспрессии гена по сравнению с немедленной инъекцией после комбинированного приготовления.

Комбинированное приготовление фермента и пДНК улучшало продукцию белка в этом доклиническом исследовании.

Таблица 16

Детали эксперимента для примера 13

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	Фермент или ФСБ	Временная точка введения фермента или комбинированной доставки	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем на обработку (мкл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 6	25, 26, 27, 28, 29, 30	рGX9 907	ФСБ	30 мин до DMAb/ЭП	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	---	1
2. 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	рGX9 907	Хондроитиназа ABC	30 мин до DMAb/ЭП	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	2	1
3. 6	7, 8, 9, 10, 11, 12	рGX9 907	Хондроитиназа ABC	Фермент/пДНК КоП, немедленная ЭП	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	2	1
4. 6	13, 14,	рGX9 907	Хондроитиназа	Фермент/пДНК КоП, ЭП	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	2	1
	15, 16, 17, 18		ABC	с задержкой в 1 мин					
5. 6	19, 20, 21, 22, 23, 24	рGX9 907	Хондроитиназа ABC	Фермент/пДНК КоП, 1 час инкубации реагента, ЭП с задержкой в 1 мин,	2/левый квадрицепс	CELL., 5P, IM	1	2	1

Пример 14.

Комбинированное приготовление Cho ABC с пДНК - тестирование на стабильность пДНК in vitro (INO-16-252A).

Чтобы дополнительно проверить возможность комбинирования хондроитиназы и пДНК в один препарат, была оценена стабильность пДНК после комбинированного приготовления в разных условиях. Целью тестирования стабильности является предоставление информации о том, как качество продукта изменяется со временем под воздействием факторов окружающей среды, таких как температура, и для установления срока годности для будущего продукта и рекомендуемых условий хранения.

Для тестирования стабильности и качества пДНК при инкубации с хондроитиназой молекулярный вес и конформацию пДНК исследовали электрофорезом в агарозном геле. Семь образцов содержали пДНК (рGX9207, 250 нг) с хондроитиназой ABC (2,5 ед./мл, табл. 10.1). Семь дополнительных образцов служили контролем и состояли из пДНК и ФСБ. Образцы групп 1-2 были протестированы с помощью гель-электрофореза (ТАЕ, 1% агарозы, EmbiTec) после приготовления, группы 3-4, инкубировали при

комнатной температуре (КТ, которая определяется как 21°C) в течение 10 мин. Инкубацию при КТ проводили в приборе для ПЦР. Дальнейшие инкубации выполняли следующим образом: 5-6: 6°C, 120 мин, 7-8: КТ, 120 мин, 9-10: 6°C, 24 ч, 11-12: КТ, 24 ч и 13-14: 6°C, 10 мин. После гель-электрофореза гель анализировали с помощью программного обеспечения Gene Sys (без бининга (binning), EDR, 120 мс экспозиции).

Конструкция рGX9207 имеет суперспиральную конформацию и молекулярную массу 5171 п.о. Все образцы ДНК (содержащие фермент и контрольные образцы) находятся в исходной конформации с исходным весом. Не было различий между полосами и образцами соответственно (фиг. 15).

Так как дорожки для всех образцов представляют собой суперспиральную ДНК с исходной молекулярной массой, этот исходный подход к стабильности пДНК указывает на то, что хондроитиназа не влияет на структуру плазмиды и качество лекарственного средства соответственно.

Таблица 17

Детали эксперимента для примера 14

	Плаزمида	Фермент или ФСБ	Время инкубации	Концентрация ДНК в КоП	Концентрация фермента	Общий объем КоП в геле
1.	рGX9207	ФСБ	Нет времени инкубации	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
2.	рGX9207	СНО-АВС	Нет времени инкубации	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
3.	рGX9207	ФСБ	10 мин, КТ	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
4.	рGX9207	СНО-АВС	10 мин, КТ	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
5.	рGX9207	ФСБ	120 мин, 6°C	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
6.	рGX9207	СНО-АВС	120 мин, 6°C	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
7.	рGX9207	ФСБ	120 мин, КТ	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
8.	рGX9207	СНО-АВС	120 мин, КТ	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
9.	рGX9207	ФСБ	24 часа, 6°C	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
10.	рGX9207	СНО-АВС	24 часа, 6°C	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
11.	рGX9207	ФСБ	24 часа, КТ	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
12.	рGX9207	СНО-АВС	24 часа, КТ	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
13.	рGX9207	ФСБ	10 мин, 6°C	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл
14.	рGX9207	СНО-АВС	10 мин, 6°C	500 нг/10мкл	2,5 ед./мл	5 мкл

Пример 15.

Комбинированное приготовление Cho ABC с пДНК - исследование стабильности пДНК in vivo (INO-16-237).

Было исследовано, может ли комбинированный препарат хондроитиназы с пДНК быть приготовлен за 24 ч и меньше до доставки in vivo. Поэтому был проверен эффект комбинированных препаратов сделанных за 10, 120 мин или 24 ч до доставки на экспрессию генов у мышей.

Комбинированные препараты фермента (2,5 ед./мл) и пДНК (рGX9207, 0,1 мг) готовили за 10 мин, 120 мин и за 24 ч до введения препарата (внутримышечно) и электропорации (с 1 мин задержкой, табл. 11.1). В качестве контролей две группы мышей получали предварительную обработку либо хонд-

роитиназой (группа 2), либо ФСБ (группа 1) на протяжении 30 мин. Кровь собирали в сутки 0, 3, 6 и уровни hIgG в сыворотке определяли с помощью ИФА.

Никакого снижения экспрессии генов у мышей не происходило, когда комбинированные препараты фермент/пДНК хранили в течение 24 ч.

Эти данные демонстрируют, что реагенты, содержащие как хондроитиназу ABC, так и пДНК, могут храниться в течение как минимум 24 ч. См. фиг. 16.

Таблица 18

Детали эксперимента для примера 15

№ группы	№ ушной бирки животного	Плазмида	фермент	Время инкубации	Количество инъекций на участок/Местонахождение	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
1. 8	301-308	pGX9207	ФСБ	30 минут предварительной обработки	1/ТА, левый участок	0,1	0,1
2. 8	309-316	pGX9207	СНО ABC	30 минут предварительной обработки	1/ТА, левый участок	0,1	0,1
3. 8	325-332	pGX9207	СНО ABC	10 мин, на льду; КоП, 1 мин задержки ЭП	1/ТА, левый участок	0,1	0,1
4. 8	333-340	pGX9207	СНО ABC	120 мин, на льду; КоП, 1 мин задержки ЭП	1/ТА, левый участок	0,1	0,1
5. 8	341, 342, 343, 345, 346, 347, 348, 349	pGX9207	СНО ABC	24 часа, на льду КоП, 1 мин задержки ЭП	1/ТА, левый участок	0,1	0,1

Пример 16.

Способы для примеров 17 и 18.

Обработка гиалуронидазой на системной экспрессии моноклонального антитела.

Девять морских свинок были разделены на две группы из 3 самок морских свинок Хартли (возраст 6 недель) и были иммунизированы pGX9203, ДНК-плазмидой, кодирующей человеческое антитело (DMAb), реактивным к вирусу Денге, тогда как контрольная группа получала только ФСБ.

Мышцы ног экспериментальной группы 1 (см. таблицы ниже) предварительно обрабатывали 0,2 мл гиалуронидазы ((0,4 ед./мл), очищенной из семенников быка) на 6 отдельных участках за 3 ч до доставки pGX9203. Доставка pGX 9203 выполнялась путем инъекции 0,33 мг плазмиды в 200 мкл SSC внутримышечно на участках, которые получали предварительную обработку гиалуронидазой (группа 1) или без предварительной обработки (группа 2), и электропорацию проводили сразу после инъекции. Электропорация была применена к участкам инъекции с использованием электрода CELLECTRA®-3P (5 мм) (Inovio Pharmaceuticals, Inc.).

Параметры были следующими:

количество импульсов = 2 серии из 2 импульсов (2×2),

сила тока = 0,1 А,

максимальное напряжение = 200 В,

длительность импульса электропорации = 52 мс,

интервалы, разделяющие импульсы = 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

В сутки 0, 7, 10, 14, 17, 21 и 24 у морских свинок отбирали кровь (250 мкл) и уровни IgG лямбда человека (DMAb DVSF-1) измеряли в сыворотке с помощью ИФА.

Для анализа гуморальных ответов против hIgG был выполнен ИФА против стандартного белка hIgG каппа.

Таблица 19

Номер группы (№/группа)	Плазмида	№ ушной бирки животного	Кол-во участков для инъекции/Местополо- жение/Г/х	Устройство для ЭП и способ введения	Объем инъекции на обработку (мл)	Доза ДНК на участок (мг)	Общая доза ДНК/плазмида (мг)
* 1/3	pGX9203	793, 793, 794	6/квадриц. и ТА мышцы	Удлиненный ЗР	0,2	0,33	2
2/3	PGX9203	795, 796, 797	6/квадриц. и ТА мышцы	Удлиненный ЗР	0,2	0,33	2
3/3	ФСБ	798, 799, 800	Н/Д	Н/Д	0,1	0	0

* Группа 1 была обработана 0,2 гиалуронидазой (0,4) Unites/ml) в квадрицепс и боковую ТА за 3 ч до доставки DMAb, Sigma: H4272-30MG № партии SLBM1476V.

Таблица 20

Код	Название	№ партии R&D	Дата изготовления
PGX9203	DVSF-1 в pVAX	D150408A	8 августа, 2015

Отчет о степени экспрессии кодируемого ДНК моноклонального антитела в сыворотке морских свинок, обработанных pGX9203 (pDVSF-1). Предварительная обработка участка доставки в мышцу гиалуронидазой значительно повышает системные уровни hIgG в сыворотке. См. фиг. 17 и 18. Добавление предварительной обработки гиалуронидазой (ГИА) ножной мышцы морских свинок к схеме иммунизации dNAb плюс ЭП повышает экспрессию hIgG в сыворотке. На фиг. 17 продемонстрировано, что в пиковый момент времени (сутки 14) в группе 1, предварительно обработанной ГИА, наблюдалось 18-кратное увеличение экспрессии hIgG в сыворотке (среднее значение 1,700 нг/мл) по сравнению с группой 2 (среднее значение 92 нг/мл). Гуморальный ответ хозяина, полученный против hIgG лямбда, был минимальным как в группе 1 (титр связывания 16,66) так и в группе 2 (титр связывания 216,66), при детектировании на 28-е сутки. Предварительную обработку мышцы гиалуронидазой можно использовать для усиления экспрессии DMAb в сыворотке.

Пример 17.

Обработка мышц гиалуронидазой до доставки пДНК вакцины.

Две группы из 4 самцов морских свинок Хартли (возраст 10 недель) были иммунизированы pGX2013, ДНК-плазмидой, кодирующей NP PR8 вируса гриппа, тогда как контрольная группа получала только ФСБ. Левую ТА мышцу экспериментальной группы 1 (см. табл. 19) предварительно обрабатывали приблизительно 0,2 мл гиалуронидазы ((около 0,4 ед./мл), очищенной из семенников быка) за 2 ч до доставки вакцины. Иммунизации выполнялись в сутки 1 и 15. Доставку вакцины осуществляли путем инъекции около 20 мкг плазмиды в около 200 мкл SSC внутримышечно в ТА и электропорацию проводили сразу после инъекции. Электропорацию применяли к участку инъекции с использованием электрода CELLECTRA®-3P (электроды 5 мм) (Inovio Pharmaceuticals, Inc.).

Параметры были следующими:

количество импульсов = 2 серии из 2 импульсов (2×2),

сила тока = 0,1 А,

максимальное напряжение = 200 В,

длительность импульса электропорации = 52 миллисекунды и

интервал, разделяющий импульсы = 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

Через 14 суток после первой и 7 суток после второй иммунизации у морских свинок отбирали кровь (около 3 мл) и измеряли антигенспецифические клеточные ответы в собранных популяциях МКПК с помощью ИФНу ELISpot, в котором использовались перекрывающиеся пептиды, покрывающие антиген вируса гриппа NP PR8. Анализ проводили в соответствии с модифицированным протоколом ELISpot.

Вкратце, используемый протокол ELISpot является следующим: отбирают 3 мл периферической крови и немедленно переносят в пробирки ЭДТА⁺ (лавандовый колпачок) на лед. Кровь разбавляли 1:1 сбалансированным раствором солей. Кровь медленно наносили на 4,5 мл градиент плотности фикола в пробирке объемом 15 мл. Клетки центрифугировали при 2000 об/мин, 30 мин, при комнатной температуре, без тормоза. Взвешенное кольцо собирали и разбавляли в R10 до 15 мл. Затем клетки осаждали путем

центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Клетки дважды промывали и пропускали через другой фильтр с размером пор 70 мкм, подсчитывали и разбавляли до 1×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл в среде RPMI с 10% (об./об.) ФБС и 2× антибиотиком-антимикотиком. Жизнеспособность определяли окрашиванием трипановым синим. Лунки двух 96-луночных Millipore IP планшетов (Millipore, Билерика, Массачусетс) были покрыты 100 мкл раствора анти-ИФН-гамма антител (5 мкг/мл в ФБС, pH 7,4, X-D11 (сток - 1,78 мг/мл) в течение 24 ч при 4°C. Неспецифическое связывание блокировали с помощью 200 мкл блокирующего буфера 2 ч при комнатной температуре. После блокировки и промывки 1×10^5 спленоцитов в 100 мкл RPMI смешивали с 50 мкл стимулятора в трипликатах. После инкубации в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C в течение 18 ч клетки удаляли путем промывки и добавляли 100 мкл биотинилированного вторичного анти-ИФН-гамма антитела (2 мкг/мл, N-G3) в блокирующем буфере в каждую лунку. После 2-часовой инкубации и промывки стрептавидин конъюгированный с щелочной фосфатазой (SEL002, R&D Systems Inc., Минеаполис, Миннесота) разбавляли 1:100 в блокирующем буфере, и лунки инкубировали с 100 мкл в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки лунки инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре с 100 мкл реагента для обнаружения BCIP/NBT (SEL002, R&D Systems). Используемый пул NP-пептидов представляет собой пул белков нуклеокапсида вируса гриппа (вирус гриппа А (А/Пуэрто-Рико/8.34 (H1N1)), который был разделен на пулы около 40 15-тимеров. Каждый пул пептидов NP (1-3) разводили 1 в 66 в морской свинке R10, 30 мкл в 2 мл. Пятнообразующие единицы (ПОЕ) были подсчитаны и проанализированы анализаторами ImmunoSpot (Cellular Technology Ltd. в Шейкер Хайте, Огайо).

Вычисляли ПОЕ на миллион спленоцитов для каждой отдельной морской свинки и среднее значение $\pm$ СОС каждой группы мышей. Статистическую разницу между парой иммунизированных групп оценивали с использованием двухстороннего непарного t-теста, который генерировал определенное значение Р. Значения Р<0,05 свидетельствовали о значимой разнице.

Для анализа гуморальных реакций отбирали фракцию плазмы из препаратов цельной крови. Был проведен ИФА против NP-антигена вируса гриппа с определением титров связывания.

Таблица 21

Детали эксперимента для примера 2

Номер Группы (№/ группа)	№ ушной бирки животного	Плазмида	№ участка (-ов) инъекции/ Местоположение/ Tx	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мкл)	ДНК-доза/ плазмида
* 1. 4	190, 191, 192, 150	pGX2013	Левая TA мышца	Удлиненный ЗР	200	20 мкг
2. 4	798 **, 799, 176, 469	pGX2013	Левая TA мышца	Удлиненный ЗР	200	20 мкг
3. 3	187, 188, 189	ФСБ	Левая TA мышца	Удлиненный ЗР	200	0

* Обработано приблизительно 0,2 мл гиалуронидазы (около 0,4 единиц/мкл) в ТА мышцах за 2 ч до доставки вакцины.

Таблица 22

Детали плазмиды для примера 2

Код	Название	№ партии R&D
pGX2013	NP вируса гриппа	D141202B

На фиг. 19 продемонстрированы ответы ИФН-гамма в МКПК после стимуляции перекрывающимися пептидными пулами, покрывающими длину антигена гриппа NP PR8, обнаруженные с помощью ELISpot-анализа через 14 суток после первого (первичного) или 7 суток после второй иммунизации (бустерной). Титры связывания IgG плазмы против антигена гриппа NP (IMR-274) определяли с помощью ИФА, и они продемонстрированы на фиг. 20.

Этот пример демонстрирует, что добавление предварительной обработки гиалуронидазой (ГИА) ТА мышцы к схеме иммунизации пДНК плюс ЭП повышает вызванный иммунный ответ хозяина. На фиг. 19 продемонстрировано, что в группе pNP-вакцины, предварительно обработанной ГИА (около 9 22 ПОЕ/миллион), было около 3,5-кратное увеличение пятен на миллион ИФН-гамма по сравнению с не обработанной группой pNP-вакцины (около 258 ПОЕ/миллион); эти ответы измерялись через 14 суток

после первичной иммунизации. Это увеличение было около 3-кратным через 7 суток после бустерной дозы (около 3012 против около 1032 ПОЕ/миллион). На фиг. 20 продемонстрировано, что гуморальный ответ также был увеличен в предварительно обработанной ГИА группе рNP-вакцины по сравнению с группой рNP-вакцины, предварительно не обработанной ГИА.

Пример 18.

ДНК-доставка моноспецифических и биспецифических моноклональных антител, нацеленных на *Pseudomonas aeruginosa*, защищает мышей от летальной пневмонии.

Оппортунистический бактериальный патоген *Pseudomonas aeruginosa* часто обладает множественной лекарственной устойчивостью и ассоциируется с плохими клиническими результатами. Растущая резистентность к лекарственным средствам и отсутствие в разработке антибиотиков с новым механизмом действия требуют альтернативных антимикробных стратегий, включая патоген-специфические моноклональные антитела (mAbs). MAb, нацеленные на секреторный белок *P. aeruginosa* III типа PcrV (V2L2-MD) и экзополисахарид Psl (EPS), каждое из которых обладает сильной индивидуальной и синергической комбинированной защитной активностью в доклинических моделях инфекции, являются компонентами биспецифического клинического антитела-кандидата 1-1. ДНК-доставка таких mAb может иметь значительные преимущества в клинических применениях. Было исследовано использование этих последовательностей ДНК mAb для определения возможности альтернативной стратегии доставки mAb посредством доставки плазмидной ДНК (DMAb) посредством электропорации, которая была разработана для экспрессии как тяжелых, так и легких цепей антител полноразмерного IgG1 человека *in vivo*.

Участки внутримышечной инъекции (IM) состояли из обеих передней большеберцовой мышцы (tibialis anterior - TA) и правой двуглавой мышцы бедра (biceps femoris). Инъекции вводились параллельно мускулатуре. За 1 ч до электропорации гиалуронидазу доставляли BM инъекциями в 8 ед. в 30 мкл на участок. 100 мкг в 30 мкл каждого DMAb доставляли BM инъекциями в точности во все три участка, в которые ранее вводили гиалуронидазу, затем сразу проводили электропорацию. Мышам вводили интраназально с *P. aeruginosa* через 5 суток после процедуры электропорации. Уровень экспрессии DMAb IgG *in vivo* оценивали до заражения.

Последовательности тяжелых и легких цепей моноспецифических анти-PcrV V2L2-MD и биспецифических антител 1-1 клонировали в плазмиду рGX001, в результате чего получали DMAb-V2L2-MD и DMAb-антитело 1-2. Экспрессия каждого кандидата была подтверждена в клетках HEK293T до внутримышечной инъекции с последующей электропорацией (IM-EP) у мышей BALB/c. Экспрессия антитела *in vivo* контролировалась до 7 суток после IM-EP, также как и функциональная активность экспрессированных mAb (анти-PcrV анти-цитотоксическая активность). DMAb-V2L2MD и DMAb-антитело 1-2 также оценивали в модели острой пневмонии при инфекции *P. aeruginosa*.

Концентрации антител в сыворотке как у животных, получавших DMAb-V2L2-MD, так и у DMAb-антитело 1-2 на 7-е сутки после IM-EP, коррелировали с измеренной анти-цитотоксической активностью *ex vivo*, указывая на то, что как V2L2-MD, так и антитело 1-1 были экспрессированы и были функциональны. Кроме того, в мышинной модели острой инфекции легких *P. aeruginosa*, как DMAb-V2L2MD, так и DMAb-антитело 1-2 проявляли значительную защитную активность *in vivo* по сравнению с контрольным IgG DMAb (90 и 100% выживаемость против 0% соответственно; $P < 0,0001$).

Было продемонстрировано, что DMAb-V2L2-MD и DMAb-антитело 1-2 *in vivo* предотвращают летальность в мышинной модели инфекции легких. Кроме того, полученные результаты демонстрируют, что ДНК-доставка полноразмерных mAb IgG может быть осуществимой платформенной стратегией для предотвращения серьезных бактериальных инфекций и, возможно, адаптируемой для профилактики против других инфекционных агентов, для которых были идентифицированы и охарактеризованы эффективные mAb.

Пример 19.

Эффект снижения дозы, связанный с включением гиалуронидазы в рецептуру вакцины.

Чтобы определить, имеет ли комбинированный препарат пДНК-вакцины с гиалуронидазой эффект снижения дозы на вызванный иммунный ответ хозяина, в общей сложности 12 групп мышей BALB/c (6 на группу) обрабатывали дозами от 10 до 0,125 мкг рGX2013 (пДНК, кодирующий нуклеопротеин вируса гриппа (NP)). Группы 1-6 получали рGX2013, приготовленную в комбинации с гиалуронидазой (200 ед./мл), а группы 7-12 только с буфером SSC. Группа 13 получила только SSC (без вакцины). Подробная информация представлена в табл. 19. Иммунизацию проводили в сутки 0. Доставка вакцины осуществлялась путем инъекции 30 мкл препарата внутримышечно (ТА мышца ноги) и электропорация выполнялась немедленно или через 60 секунд после инъекции в группах без ГИА и с ГИА, соответственно. Электропорацию применяли к участку инъекции с использованием устройства CELLECTRA®-3P (электрод 3 мм) (Inovio Pharmaceuticals, Inc.).

Параметры были следующими:

количество импульсов = 2 серии из 2 импульсов (2×2),

сила тока = 0,1 А,

максимальное напряжение = 200 В,

длительность импульса электропорации = 52 мс,
интервалы, разделяющие импульсы = 0,2 с между импульсами и 3 с между каждой серией импульсов.

На 7 и 14 сутки у мышей отбирали кровь и сыворотку. Гуморальные ответы были обнаружены с использованием ИФА против рекомбинантного антигена нуклеопротеина вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1). Измеренные титры связывания были отложены на графике.

На 14 сутки мышей умерщвляли и вырезали селезенку. Антигенспецифические клеточные ответы на H2d-ограниченные эпитопы NP55-69 (класс II) и NP147-155 (класс I) нуклеопротеина вируса гриппа A/PR8/34 (H1N1) измеряли ИФН γ ELISpot. Пятнообразующие единицы (ПОЕ) были подсчитаны и проанализированы анализаторами ImmunoSpot (Cellular Technology Ltd. в Шейкер Хайте, Огайо). ПОЕ на миллион спленоцитов для каждой отдельной мыши и среднее значение $\pm$ СОС каждой группы мышей вычисляли и откладывали на графике. Статистическую разницу между парой иммунизированных групп оценивали с использованием двустороннего непарного t-теста, который генерировал определенное значение P. Значения P<0,05 свидетельствовали о значимой разнице.

Таблица 23

Номер Группы (№/группа)	№ ушной бирки животного	Плазмиды	№ участка (-ов) инъекции/Местополо- жение/Tx	Устройство для ЭП и Способ Введения	Введение Объем (мл)	Доза ДНК/плазмиды (мкг)
1.* 6	301, 302, 303, 304, 305, 306	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	10
2.* 6	307 308 309, 310 311 312	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	5
3.* 6	313 314 315, 316 317 318	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	1
4.* 6	319 320 321, 322 323 324	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0,5
5.* 6	325,326,327, 328,329,330	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0,25
6.* 6	331 332 333, 334 335 336	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0,125
7. 6	337,338,339, 340,341,342	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	10
8. 6	343 344 345, 346 347 348	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	5
9. 6	349 350 351, 352 353 354	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	1
10, 6	355 356 357, 358 359 360	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0,5
11. 6	361 362 363, 364 365 366	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0,25
12. 6	367 368 369, 370 371 372	pGX2013	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0,125
13. 6 (отрицат ельный контроль для ELISPOT)	373 374 375 376 377 378	нет	1/левая ТА	CELLECTRA- 3P	30	0

* Получали 200 ед./мл гиалуронидазы (Intrapharma), приготовленной в комбинации с пДНК.

Таблица 24

Детали плазмиды для примера 4

Код	Название	№ партии R&D
pGX2013	NP вируса гриппа	D160926A

ELISpot ИФН-γ-ответы в популяциях спленоцитов были посчитаны после стимуляции с помощью пептидными эпитопами PR8 нуклеопротеинов NP55 (CD4⁺ Т-клеток) и NP147 (CD8⁺ Т-клеток) (фиг. 27). Титры связывания IgG против рекомбинантного антигена нуклеопротеинов PR8 определяли с помощью ИФА (фиг. 28).

Продemonстрирован аддитивный эффект на иммунный ответ хозяина, вызванный у мышей BALB/c комбинированным препаратом пДНК-вакцины с гиалуронидазой. Здесь продemonстрирован эффект снижения дозы этой стратегии доставки.

Группы мышей BALB/c иммунизировали 0,125-10 мкг pNP-вакцины, доставленной с гиалуронидазой или без нее. На фиг. 27 продemonстрированы эквивалентные клеточные иммунные ответы в группах, иммунизированных дозами pNP выше 0,5 мкг, однако в более низких дозах наблюдалось значительное снижение ответов CD8⁺ Т-клеток на NP147 в дозах 0,25 и 0,125 мкг и ответов CD4⁺ Т-клеток на NP55 при 0,125 мкг в группах, иммунизированных без гиалуронидазы. Эффект уменьшения дозы комбинированным препаратом с гиалуронидазой также наблюдался для гуморальных ответов на pNP-вакцину на 14-е сутки (фиг. 28). Кроме того, на 7-е сутки после иммунизации авторы изобретения мы могли обнаружить значительные анти-NP-антигенсвязывающие титры в сыворотке мышей, получавших более сильные дозы pNP с гиалуронидазой, но не у мышей без гиалуронидазы.

Эффект уменьшения дозы связан с включением гиалуронидазы в состав вакцины для пДНК. Кроме того, этот комбинированный препарат может быть связан с ускоренным иммунным ответом при более высоких дозах. См. также фиг. 42.

Пример 20.

Материалы и способы для примеров 21-24.

Конструирование и экспрессия *in vitro* ДНК-кодированного моноклонального антитела. Конструкции моноклональных антител, кодируемые плазмидной ДНК (DMAb), были сконструированы так, как описано ранее 14, 15. pMERS генерировали с использованием синтетических олигонуклеотидов с несколькими модификациями, кодирующими легкие (V_L) и тяжелые (V_H) цепи для полноразмерного моноклонального антитела против MERS гликопротеина оболочки, и конечная последовательность была клонирована в экспрессионную систему под управлением промотора CMV человека. Полученные модифицированные и улучшенные иммуногены были подвергнуты оптимизации кодонов и РНК с последующим клонированием в вектор экспрессии pVax1 GenScript (Piscataway, Нью Джерси) с последующим крупномасштабным производством этих конструкций. Гены V_H и V_L были вставлены между участками рестрикции BamH1 и Xho1. Для подтверждения экспрессии DMAb *in vitro* клетки эмбриональной почки 293T человека (ATCC) трансфицировали 3 мкг на 1×10⁶ клеток pMERS с использованием трансфекционного реагента Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Через 48 ч культуральные супернатанты собирали и измеряли уровни MERS-CoV-связывающих антител и уровни hIgG с помощью ИФА (описано ниже).

Животные. Самки BALB/c и Crl:Nu-Foxn1nu мыши (возраст 7-8 недель) были приобретены у Charles River Laboratories (Уилмингтон, Массачусетс). Самки новозеландских белых кроликов (возраст 10-12 недель, от 2 до 2,5 кг) были приобретены у Charles River Laboratories. Макаки резус весом от 2,35 до 4,20 кг были приобретены у WWP, Inc. (Майами, Флорида) и помещены в карантин на 33 суток до начала исследования. Мышей содержали в группах, а кроликов и макак-резус содержали поодиночке с доступом к пище и воде *ad libitum* (свободным). Все животные были размещены и за ними ухаживали в BTS Research (Сан-Диего, Калифорния) в соответствии со стандартами Комитета по институциональному уходу за и использованию животных (IACUC).

Внутримышечная доставка пДНК. Очищенную плазмидную ДНК готовили в физиологическом растворе с цитратом натрия (SSC) для последующего введения в организм животных. Для предварительной обработки животные получали внутримышечную предварительную инъекцию 200 ед./мл гиалуронидазы, очищенной из семенников быка (Sigma) в 1× DPBS (ThermoFisher, Массачусетс). Мыши получали 30 мкл в ТА мышцы, кролики и макаки резус получали 1 мл в квадрицепс. Через 30 мин плазмидную ДНК инъекцировали в тот же участок, после чего проводили немедленную ВМ обработку электропорацией. Доставка пДНК в ТА мышцу мышей проводилась с помощью CELLECTRA® 3P, а CELLECTRA® 5P была использована для обработки кроликов и макак резус.

ИФА для количественного определения IgG человека. 96-луночные аналитические планшеты (Thermo Scientific™ Nunc™) покрывали 100 мкл/луночку 10 мкг/мл козьего анти-huIgG Fc-фрагмент-антитела (Bethyl, Техас) в 1× DPBS (ThermoFischer, Массачусетс) в течение ночи при 4°C. На следующие сутки планшеты промывали 0,2% (об./об.) TWEEN в 1× ФСБ промывочном буфере и блокировали 10% (об./об.) FBS в 1× DPBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки разбавляли в

1% (об./об.) FBS в 0,2% (об./об.) TWEEN-1× ФСБ и 100 мкл этой смеси добавляли к аналитическому планшету после еще одной стадии промывки. Кроме того, стандартные разбавления очищенной человеческой легкой цепи каппа (Bethyl, Техас) готовили в виде серийных разведений 1:2, начиная с 500 нг/мл в буфере для разбавления, и добавляли в дубликатах к каждому аналитическому планшету. Образцы и стандарт инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки планшеты инкубировали с 1:10 000 разведением козьего антитела против легкой цепи каппа IgG человека конъюгированного с HRP (Bethyl, Техас) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для детекции 100 мкл/лунку раствора субстрата SureBlue (KPL, Мэрилэнд) добавляли к промытым планшетам. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку раствора TMB Stop (KPL, Мэрилэнд) через 6 мин к аналитическим планшетам. ОП измеряли при 450 нм. Экспрессия уровня сыворотки была интерполирована из стандартной кривой с использованием подгонки сигмоидальной четырехпараметрической логистической кривой для логарифма концентрации.

Антигенсвязывающий ИФА. Аналитические планшеты покрывали 100 мкл/лунку 1 мкг/мл белка MER-CoV Spike S1 (SinoBiological, Китай) в 1× DPBS (ThermoFisher, Массачусетс) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 1× PBS-буфером с 0,05% TWEEN. Добавляли 250 мкл/лунку 3% (мас./об.) БСА в 1× ФСБ с 0,05% TWEEN и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки разбавляли в 1% (мас./об.) БСА в 1× ФСБ с 0,05% TWEEN. После промывки аналитические планшеты заполняли 100 мкл/лунку 1% буфера БСА ФСБ/TWEEN. Для связывания антигена 50 мкл серийных разведений реципрокных разведений сыворотки 1:3 проводили с предварительно разбавленными образцами сыворотки на аналитических планшетах. Планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После промывки добавляли 100 мкл 1:10000 разведенного козьего антитела против тяжелой и легкой цепей IgG человека абсорбированного у обезьян (bethyl, Техас) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для проявления использовался стоп-раствор SureBlue/TMB (KPL, Мэрилэнд) и измерялась ОП при 450 нм.

ADA ИФА. Аналитические планшеты покрывали в течение ночи при 4°C 100 мкл/лунку 0,3 мкг/мл MERS DMAb, очищенного из супернатанта *in vitro* трансфицированной клеточной культуры. Планшеты промывали 1× ФСБ 0,05% TWEEN промывочным буфером и добавляли 250 мкл/лунку 3% буфера для блокирования БСА/ФСБ/TWEEN и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки предварительно разбавляли 1:25 в 1% буфере для разведения БСА/ФСБ/TWEEN. После промывки аналитических планшетов добавляли 100 мкл/лунку предварительно разбавленных образцов и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для обнаружения ответов ADA у макак резус добавляли 100 мкл/лунку 1:10000 козьего антитела против легкой цепи лямбда человека конъюгированного с HRP (Bethyl, Техас) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. До этого была подтверждена достаточная перекрестная реактивность этого детектирующего антитела к IgG макака-резус и низкая перекрестная реактивность по отношению к белку pMERS покрытия (данные не представлены). Для обнаружения ADA в образцах мыши козьего антитела против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой (Sigma) для кроличьих козьих антител против IgG кролика (Sigma), разводили 1:10000. SureBlue/TMB Stop раствор использовались для проявления планшета и значения ОП регистрировались при 450 нм.

Пример 21.

Дизайн, *in vitro* и *in vivo* характеристика DMAb и стратегии улучшения доставки DMAb определяются как ДНК-плазмиды, кодирующие легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина (Ig) моноклонального антитела. Конкретно, указанные кассеты ДНК содержат кДНК для кодирующих последовательностей переменных легких (V_L) и тяжелых (V_H) цепей Ig полноразмерных антител mAb, которые были оптимизированы для экспрессии и клонированы в вектор экспрессии для млекопитающих pVax1. Для эффективного разделения тяжелой и легкой цепей, чтобы обеспечить образование полноразмерного антитела из одной открытой рамки считывания, в дизайн были включены участок расщепления фурином и 2A-самоперерабатывающий пептид (фиг. 29a).

Для этих исследований оптимизации доставки была выбрана конструкция плазмидной ДНК (pMERS), которая кодирует mAb против коронавируса (CoV) ближневосточного респираторного синдрома (MERS). pMERS генерировали с использованием синтетических олигонуклеотидов с несколькими модификациями, кодирующих легкие (V_L) и тяжелые (V_H) цепи для полноразмерного моноклонального антитела против гликопротеина оболочки MERS, конечная последовательность была клонирована в экспрессионную систему под управлением промотора CMV человека. Лидерные последовательности легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина были включены для улучшения экспрессии. У полученных модифицированных и усиленных иммуногенов были оптимизированы кодоны и РНК, и они были клонированы в вектор экспрессии pVax1 (фиг. 29a).

Производство mAb из трансфицированных pMERS клеток было первоначально подтверждено *in vitro*. Человеческие клетки 293T трансфицировали pMERS или пустой плазмидой pVax. Уровни секретируемого антитела количественно определяли в супернатанте через 48 ч после трансфекции с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), фиг. 29b. Чтобы подтвердить получение функциональных антител,

уровни связывания антител против MERS были измерены против антигена MERS-CoV с помощью ИФА в собранных супернатантах (фиг. 29с). Таким образом, данные показали, что функциональные антиген-связывающие антитела MERS-CoV секретируются из трансфицированных клеток *in vitro*.

Была исследована экспрессия *in vivo* анти-MERS DMAb после внутримышечной доставки у мыши BALB/c. Доставка доз чистой пДНК от 6,25 до 100 мкг в переднюю большеберцовую (ТА) мышцу не позволила получить уровни человеческого IgG (hIgG) в сыворотке крови выше фона (фиг. 30а). С целью повышения системных уровней hIgG в сыворотке были изучены стратегии доставки генов, которые демонстрировали ранее, усиление переноса генов *in vivo*. Предыдущие исследования DMAb продемонстрировали усиленную экспрессию с применением *in vivo* ЭП в качестве вспомогательного средства для доставки. Электропорация (ЭП) представляет собой хорошо разработанный вспомогательный метод для доставки пДНК *in vivo*, который увеличивает экспрессию генов более чем в 100 раз по сравнению с доставкой чистой пДНК без электропорации. Теория в основе ЭП заключается в том, что она увеличивает проницаемость клеточной мембраны, чтобы обеспечить эффективный проход больших молекул (например, пДНК) в клетку. При мягких электрических параметрах эффект ЭП на клетку является переходным, и клетка остается полностью функциональной. В данном случае CELLECTRA®-3P ЭП было использовано для нацеливания на ТА мышцы мыши BALB/c. Применение ЭП на участке доставки в ТА мышцы сразу после инъекции DMAb приводило к повышению уровней hIgG в сыворотке (среднее значение 670 нг/мл для 50 мкг дозы pMERS на 6-е сутки после доставки, фиг. 30b). Фармакокинетический анализ уровней hIgG в сыворотке выявил пиковую экспрессию на 6 сутки после обработки (фиг. 34). Уровни hIgG быстро снижались после 6 суток, что совпало с появлением иммунного ответа хозяина, направленного против чужеродного человеческого IgG-белка (фиг. 35).

Ранее было продемонстрировано использование гиалуронидазы (ГИА) в протоколах доставки пДНК+ЭП *in vivo* для усиления экспрессии генов. ГИА катализирует гидролиз гиалуронана в ЕСМ, обеспечивая временное повышение проницаемости тканей. Это позволяет увеличить дисперсию введенной пДНК через мышечную ткань и увеличить количество миоцитов, доступных для трансфекции. Поэтому ГИА добавляли к протоколу доставки с целью дальнейшего увеличения концентрации hIgG в сыворотке. Предварительная обработка ТА мышц 200 ед./мл ГИА за 30 мин до доставки гена с электропорацией приводила к значительно более высоким уровням (среднее значение 2160 нг/мл (100 мкг дозы pMERS на 6 сутки после доставки)) hIgG в сыворотке (фиг. 30с). Доставка pMERS с использованием предварительной обработки ГИА в отсутствие ЭП не была связана с повышением концентрации hIgG в сыворотке (данные не представлены). Проводили оценку *in vivo* продуцирования функционального антитела (связывание сыворотки с антигеном MERS CoV) с помощью ИФА. Откладывали на графике связывание реципрокного разведения сыворотки на 6-е сутки после доставки pMERS (фиг. 30d). Кроме того, изучали другие реагенты для определения того, улучшают ли они доставку гена внутрь клетки, такие как витамин D, сахара и полимеры, или обладают ли они способностью к модификации структуры ЕСМ, такие как эластаза и коллагеназа, и определяли, может ли их включение в протокол доставки DMAb значительно повысить уровни hIgG. Добавление этих реагентов в протокол доставки ЭП + pMERS не позволило значительно повысить уровни hIgG в сыворотке (фиг. 36). Кроме того, не было увеличения уровней hIgG в сыворотке при добавлении любого из этих реагентов в протокол доставки ЭП + ГИА pMERS (данные не представлены).

Поразительный эффект предварительной обработки ГИА мышцы, в которую производится доставка, на экспрессию генов наблюдался визуально при доставке репортерного гена (pRFP) в ТА мышцу мыши (фиг. 30е). Кроме того, наблюдался сильный сигнал иммунофлуоресценции при анализе экспрессии hIgG в миоцитах в месте обработки (фиг. 30f), подтверждающий продуцирование антитела мышечными клетками в месте доставки pMERS. Таким образом, представленные выше данные определяют протокол доставки DMAb, который включает в себя ЭП и ГИА, который может быть принят для усиления экспрессии функционального hIgG в мышечной модели BALB/c.

Пример 22.

Устойчивая экспрессия DMAb у иммунодефицитных мышей.

Исследования у мышей BALB/c или B6 успешно продемонстрировали экспрессию DMAb *in vivo* и важность вспомогательных средств для доставки в улучшении трансфекции тканей и, следовательно, системных уровней hIgG. Однако реакция иммунной системы хозяина на чужеродный hIgG-белок отрицательно влияла на экспрессионную кинетику (фиг. 34 и 35). Чтобы избежать отрицательного влияния иммунного ответа хозяина на экспрессию DMAb, мы исследовали РК уровней hIgG в сыворотке у иммунодефицитных "голых" (nude) мышей BALB/c. В отсутствие функциональной адаптивной иммунной системы уровни hIgG в сыворотке не падали после 6 суток, но продолжали расти и достигали плато между 21 и 35 днями (фиг. 31а). Это приводило к более высоким концентрациям сывороточного hIgG, наблюдаемого у "голых" мышей, чем у мышей BALB/c (12,5 мкг/мл против 2,2 мкг/мл пика среднего при дозе pMERS 100 мкг). Экспрессия DMAb была также продолжительной. Анализ продолжительности экспрессии выявил уровни hIgG в сыворотке между 0,77 мкг/мл (группа дозы 12,5 мкг) и 3,84 мкг/мл (группа дозы 100 мкг) через 160 суток после доставки (фиг. 31а).

Было высказано предположение, что увеличение количества трансфицированных миоцитов приве-

дет к повышению системных уровней hIgG. Таким образом, нацеливание на множество участков мышц было бы выгодным. 100 мкг на участок pMERS доставляли в 1, 2, 3 или 4 мышцы. На фиг. 31b продемонстрировано, что увеличение количества участков обработки мышечной ткани является выгодным. Доставка pMERS в левую и правую ТА мышцы и квадрицепсы (всего 4 участка) приводило к обнаружению 28,8 мкг/мл hIgG в сыворотке на 21 сутки. Доставка доз, превышающих 100 мкг, на одну ТА мышцу не смогли еще больше увеличить уровни hIgG в сыворотке. Резюмируя можно отметить, что данные в этом разделе указывает на то, что в отсутствие ответа против hIgG системные уровни моноклонального антитела, кодируемого ДНК, являются увеличенными и устойчивыми. Кроме того, нацеливание на несколько участков доставки является выгодным за счет увеличения местной дозы.

Пример 23.

Устойчивая экспрессия DMAb у иммунодефицитных мышей.

Первым шагом в процессе увеличения масштаба процесса был переход от мыши (приблизительно 20 г веса с общим объемом периферической крови 2 мл) к кролику (приблизительно 2,5 кг в весе с общим объемом периферической крови 140 мл), виду, который филогенетически ближе к приматам, чем грызуны. Кроме того, большой размер мышц квадрицепса кролика совместим с CELLECTRA®-5P, устройством для внутримышечной ЭП человека, которое в данное время используется в клинических испытаниях.

Кинетику экспрессии pMERS определяли в по сывороточному человеческому IgG у новозеландского белого кролика. Кроликов обрабатывали в общей сложности 2 мг pMERS, доставленных с помощью CELLECTRA®-5P ЭП, в предварительно обработанный ГИА квадрицепс. Сильный уровень hIgG в сыворотке достиг максимума на 6-е сутки (фиг. 37a), прежде чем быстро упасть на уровень фона на седьмые сутки. Эта быстрая потеря hIgG в сыворотке совпала с высоким уровнем антилекарственных антител (ADA), который развивался между 6 и 7 сутками (фиг. 37b). Однако была получена сильная и повторяемая системная экспрессия в этот ранний момент времени (6-е сутки) в этой модели с использованием системы доставки CELLECTRA® 5P. Затем было продемонстрировано влияние предварительной обработки гиалуронидазой места доставки в мышцу на экспрессию hIgG. Повышенные уровни сывороточного hIgG были связаны с предварительной обработкой мышц ГИА по сравнению с предварительной обработкой ФСБ (фиг. 32a), 770 против 122 нг/мл ($p < 0,0001$) на 6-е сутки соответственно (фиг. 32b). Кроме того, полученный hIgG был функциональным, как определено по связыванию антигена MERS CoV (фиг. 32c).

Электрические установки для устройства CELLECTRA® 5P IM ЭП были ранее оптимизированы для доставки и иммуногенности ДНК-вакцин, а не DMAb-плазмиды. Исследовались оптимальные электрические параметры ЭП с точки зрения напряжения для доставки DMAb в контексте предварительной обработки ГИА. Были проанализированы уровни hIgG в сыворотке, связанные с доставкой pMERS IM при 20, 35, 50 и 65 В. Чтобы осуществить этот тест ряда значений напряжения, настройки шаблона импульсов и массива 5P были перенесены в бокс BTS-12 - устройство, способное обеспечивать широкий диапазон напряжений. Настройка на 65 В была сопоставима с напряжением, подаваемым прибором CELLECTRA®-5P в квадрицепс кролика. Результаты ясно продемонстрировали значительную потерю уровней hIgG в сыворотке, связанных с уменьшением напряжения (фиг. 32d). Из-за возможности увеличения повреждения тканей и снижения переносимости обработки более высокие напряжения не исследовались.

Можно сделать вывод, что наличие сильных уровней функционального hIgG в сыворотке в ранний момент времени (6-е сутки) после доставки pMERS с помощью нашего оптимизированного протокола доставки подтвердило возможность перевода платформы DMAb на более крупных животных.

Пример 24.

Применение оптимизаций доставки DMAb для приматов отличных от человека.

С сопоставимой физиологией и иммунной системой с человеком примат отличный от человека обеспечивает исключительную модель для изучения потенциала адаптации кандидатного лекарственного препарата антитела в клинику. Применяя оптимизацию доставки DMAb, очерченную на моделях животных меньшего размера, оценивали уровни hIgG в сыворотке макак резус (*Macaca mulatto*). pMERS доставляли с CELLECTRA® 5P ЭП в предварительно обработанные ГИА квадрицепсы 5 макак-резус. Системные уровни hIgG были обнаружены в сыворотке всех NHP (приматы отличные от человека) (фиг. 33a). Уровень hIgG в сыворотке достиг максимума между днями 11 и 21 с диапазоном от 1,30 до 4,97 мкг/мл. Чтобы подтвердить получение функциональных антител, связывание сывороточного антитела с антигеном MERS CoV было подтверждено с помощью ИФА. Значения связывания антигена MERS отображали сопоставимый кинетический профиль с уровнями hIgG в сыворотке (фиг. 33b), а связывание реципрокного разведения сыворотки для каждого макака резус было отложено на графике на 17-е сутки (фиг. 33c). Вместе эти результаты подтвердили получение высоких уровней антител против MERS-CoV человека в NHP.

Чтобы определить, повлияло ли появление ответа ADA на чужеродное hIgG на фармакокинетику экспрессии DMAb в NHP, было проанализировано связывание сывороточного антитела с кодированным

в pMERS очищенным белком hIgG с помощью ИФА. Был обнаружен ответ ADA на hIgG в других экспериментальных моделях животных (фиг. 35 и 37b). Во всех NHP обнаружили появление антител против DMAb (фиг. 33d), однако в четырех из пяти NHP эти ADA появлялись с задержкой по сравнению с предыдущими наблюдениями у других животных. Величина ADA обратно коррелировала с уровнями hIgG в сыворотке (Спирман $k=-0,5811$ ($p=0,0072$), фиг. 33e). Это говорит о том, что с большой вероятностью иммунный ответ хозяина против "несвоих" человеческих IgG отрицательно повлиял на уровни экспрессии DMAb у макак-резус.

Таким образом, очерчена разработка протокола доставки, который может быть применен для значительного улучшения системной экспрессии моноклональных антител на основе ДНК, доставляемых в мышцу в доклинических моделях малых и больших животных. Как показано в данном случае, совместное использование ЭП и гиалуронидазы в участке доставки позволяет достичь системных уровней hIgG в сыворотке в диапазоне мкг/мл у приматов отличных от человека.

Пример 25.

Комбинированный препарат гиалуронидазы с пДНК у кроликов и макак-резус.

Данные демонстрируют, что комбинированный препарат пДНК/гиалуронидазы (ГИА) может быть доставлен в мышцу кролика без потери экспрессии по сравнению со стандартным протоколом предварительной обработки ГИА. См. фиг. 38. Задержка ЭП в 60 с после инъекции пДНК/ГИА связана с увеличением экспрессии DMAb. См. фиг. 39.

Данные также демонстрируют, что комбинированный препарат пДНК/ГИА может быть доставлен в мышцу NHP без потери экспрессии по сравнению со стандартным протоколом предварительной обработки ГИА. Задержка ЭП в 60 с после инъекции пДНК/ГИА связана с увеличением экспрессии DMAb. См. фиг. 40.

Пример 26.

Оптимизация задержки ЭП.

Эксперименты проводились для оптимизации задержки ЭП после приготовления комбинированного препарата. Данные демонстрируют, что 20-секундная задержка ЭП после инъекции комбинированного препарата может быть оптимальной. См. фиг. 41. Соответственно, значительно усилена экспрессия генов при включении временной задержки между доставкой лекарственного средства и ЭП по сравнению с предварительной обработкой тканей с помощью протоколов ГИА. Эквивалентные уровни экспрессии генов наблюдались без временной задержки по сравнению с предварительной обработкой тканей по протоколам ГИА.

Пример 27.

Способствование иммунному ответу на опухолевый антиген с помощью препарата ДНК-вакцины ГИА.

Было высказано предположение, что включение ГИА в состав вакцины повысит иммунный ответ хозяина, вызванный вакциной, кодирующей связанный с опухолью аутоантиген. Результаты эксперимента продемонстрированы на фиг. 43.

Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидны для специалистов в данной области техники. Такие изменения и модификации, включая, без ограничения, те, которые связаны с химическими структурами, заместителями, производными, промежуточными соединениями, синтезами, композициями, рецептурами или способами применения данного изобретения, могут быть сделаны без отхода от его сущности и объема.

По соображениям полноты различные аспекты данного изобретения изложены в следующих пронумерованных пунктах:

Пункт 1. Способ доставки агента субъекту, причем способ содержит введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы, в количестве, достаточном для деградации протеогликана хондроитинсульфата (CSPG); а также введение указанного агента указанному субъекту.

Пункт 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что CSPG выбран из группы, состоящей из агтрекана (CSPG1), версикана (CSPG2), нейрокана (CSPG3), CSPG4 (ассоциированного с меланомой, хондроитинсульфат протеогликана, NG2), CSPG5, SMC3 (CSPG6, белок структурной поддержки хромосом номер три(3)), бревикана (CSPG7), CD44 (CSPG8, кластер дифференцировки 44), фосфакана и их комбинации.

Пункт 3. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий:

введение субъекту полипептида хондроитиназы или полинуклеотида, кодирующего полипептид хондроитиназы; а также

введение указанному субъекту агента.

Пункт 4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанный агент выбран из группы, состоящей из полинуклеотида, полипептида и малой молекулы.

Пункт 5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанный агент содержит полинуклеотид.

Пункт 6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует моноклональное антитело.

Пункт 7. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанный агент содержит полипептид.

Пункт 8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит моноклональное антитело.

Пункт 9. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело экспрессируется *in vivo*.

Пункт 10. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы и указанное моноклональное антитело кодируются одним и тем же полинуклеотидом или отдельными полинуклеотидами.

Пункт 11. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, и указанный полинуклеотид, кодирующий указанное моноклональное антитело, содержатся в одном и том же векторе или отдельных векторах.

Пункт 12. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, вводят субъекту перед введением указанного агента.

Пункт 13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, вводят субъекту по меньшей мере за от около 15 мин до около 24 ч до введения указанного агента.

Пункт 14. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, и указанный агент вводят субъекту одновременно.

Пункт 15. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, и агент вводят субъекту подкожно или внутримышечно.

Пункт 16. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полипептид хондроитиназы, кодируемый полинуклеотидом, гидролизует CSPG и приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса субъекта.

Пункт 17. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, дополнительно включающий введение полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, в количестве, достаточном для деградации гликозаминогликана.

Пункт 18. Способ по п.17, отличающийся тем, что гликозаминогликан содержит гиалуронан.

Пункт 19. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, вводят субъекту перед введением указанного агента.

Пункт 20. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, вводят субъекту по меньшей мере за от 15 мин до около 24 ч до введения указанного агента.

Пункт 21. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный агент вводят субъекту одновременно.

Пункт 22. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный агент вводят субъекту подкожно или внутримышечно.

Пункт 23. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанную гиалуронидазу вводят одновременно с указанной хондроитиназой.

Пункт 24. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный агент вводят указанному субъекту посредством электропорации.

Пункт 25. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, и указанный агент готовят в виде комбинированного препарата перед введением.

Пункт 26. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, указанный полипептид гиалуронидазы или полинуклеотид, кодирующий полипептид гиалуронидазы, и указанный агент готовят в виде комбинированного препарата перед введением.

Пункт 27. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный полипептид хондроитиназы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид хондроитиназы, готовят в виде комбинированного препарата перед введением.

Пункт 28. Способ доставки агента субъекту, причем указанный способ включает: введение субъекту полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы, в количестве, достаточном для деградации гликозаминогликана; а также введение указанного агента указанному субъекту.

Пункт 29. Способ по п.28, отличающийся тем, что гликозаминогликан содержит гиалуронан.

Пункт 30. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий:

введение субъекту полипептида гиалуронидазы или полинуклеотида, кодирующего полипептид гиалуронидазы; а также

введение указанному субъекту агента.

Пункт 31. Способ по любому из пп.28-30, отличающийся тем, что указанный агент выбран из группы, состоящей из полинуклеотида, полипептида и малой молекулы.

Пункт 32. Способ по п.31, отличающийся тем, что указанный агент содержит полинуклеотид.

Пункт 33. Способ по п.32, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид кодирует моноклональное антитело.

Пункт 34. Способ по п.31, отличающийся тем, что указанный агент содержит полипептид.

Пункт 35. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит моноклональное антитело.

Пункт 36. Способ по п.33, отличающийся тем, что указанное моноклональное антитело экспрессируется *in vivo*.

Пункт 37. Способ по п.33, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы и указанное моноклональное антитело кодируются одним и тем же полинуклеотидом или отдельными полинуклеотидами.

Пункт 38. Способ по п.33, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный полинуклеотид, кодирующий указанное моноклональное антитело, содержатся в одном и том же векторе или отдельных векторах.

Пункт 39. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, вводят субъекту перед введением указанного агента.

Пункт 40. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, вводят субъекту по меньшей мере за от около 15 мин до около 24 ч до введения указанного агента.

Пункт 41. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, вводят субъекту за один час до введения указанного агента.

Пункт 42. Способ по любому из пп.28-38, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный агент вводят субъекту одновременно.

Пункт 43. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный агент вводят субъекту подкожно или внутримышечно.

Пункт 44. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полипептид гиалуронидазы, кодируемый полинуклеотидом, гидролизует гиалуронан и приводит к дезорганизации внеклеточного матрикса субъекта.

Пункт 45. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, отличающийся тем, что указанный агент вводят указанному субъекту посредством электропорации.

Пункт 46. Способ по п.28 или п.30, отличающийся тем, что указанный полипептид гиалуронидазы или указанный полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид гиалуронидазы, и указанный агент готовят как комбинированный препарат перед введением.

Пункт 47. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий электропорацию.

Понятно, что приведенное выше подробное описание и сопровождающие примеры являются просто иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничений объема данного изобретения, которое определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ повышения экспрессии человеческого иммуноглобулина изотипа G (hIgG), кодируемого ДНК-плазмидой, в субъекте, причем указанный способ включает:

введение субъекту ДНК-плазмиды и хондроитиназы, где указанная хондроитиназа представляет собой хондроитиназу АС или хондроитиназу АВС; и

после введения ДНК-плазмиды и хондроитиназы осуществление электропорации в месте введения ДНК-плазмиды,

где указанный hIgG экспрессируется в указанном субъекте.

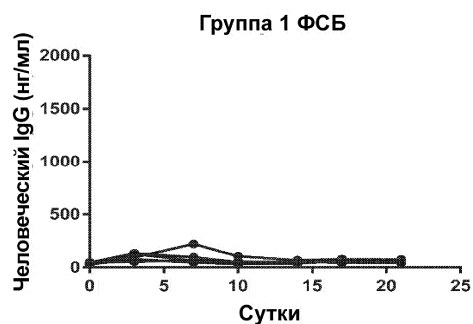
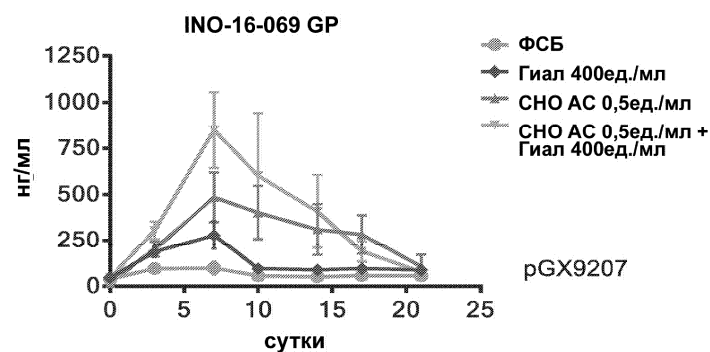
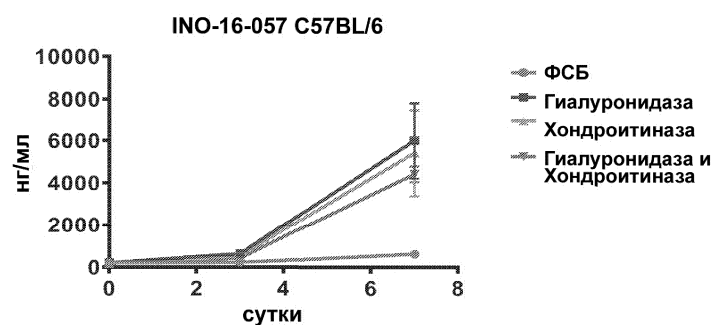
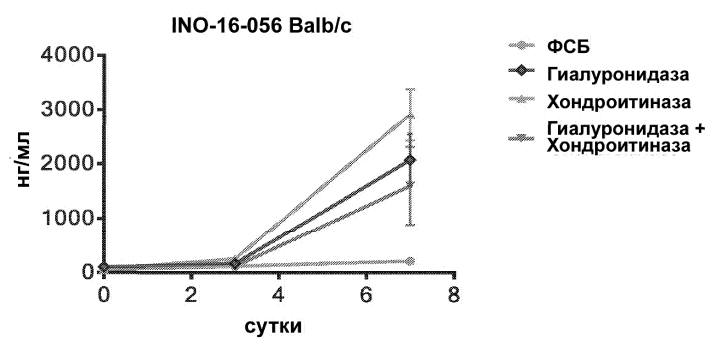
2. Способ по п.1, где хондроитиназу вводят субъекту перед введением указанной ДНК-плазмиды.

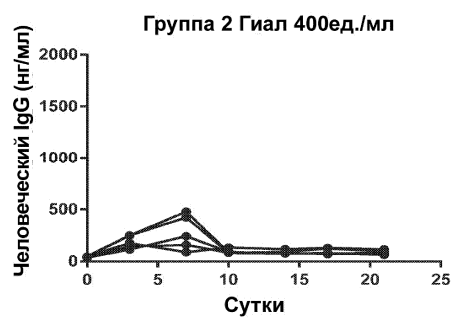
3. Способ по п.2, где хондроитиназу вводят субъекту по меньшей мере за от около 15 мин до около 24 ч до введения указанной ДНК-плазмиды.

4. Способ по любому из пп.1-3, где хондроитиназу и ДНК-плазмиду вводят субъекту одновременно.

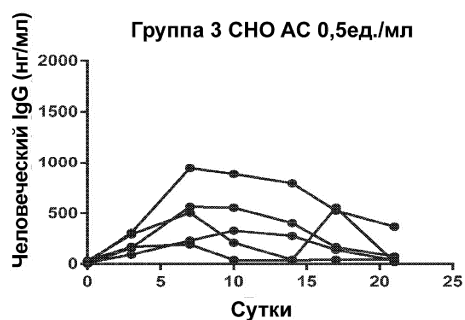
5. Способ по любому из вышеперечисленных пунктов, где хондроитиназу и ДНК-плазмиду вводят

субъекту подкожно или внутримышечно.

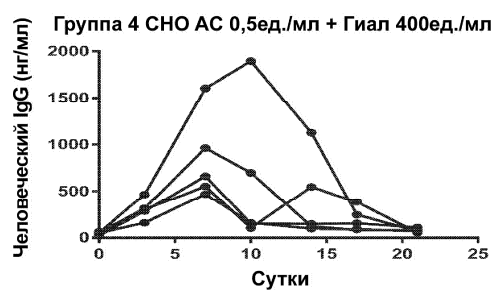




Фиг. 4В

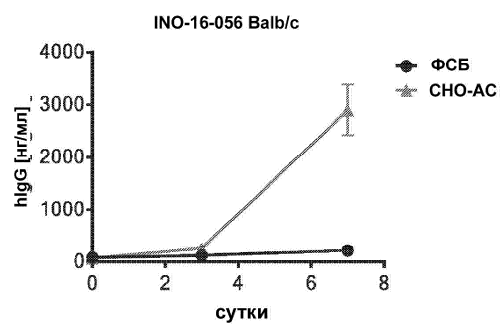


Фиг. 4С



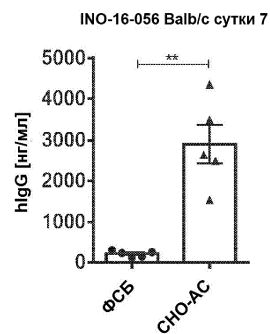
Фиг. 4D

a

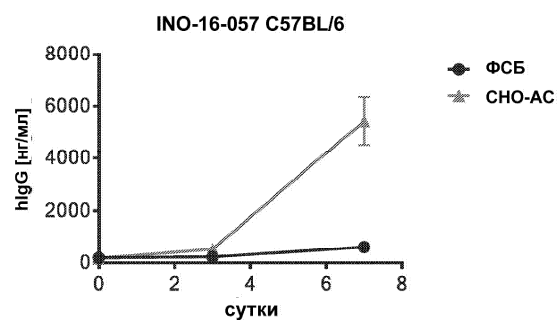


Фиг. 5

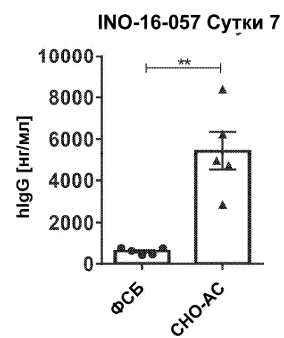
b



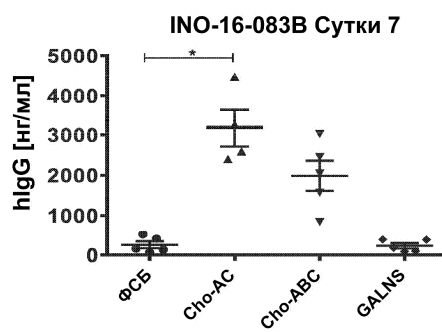
a



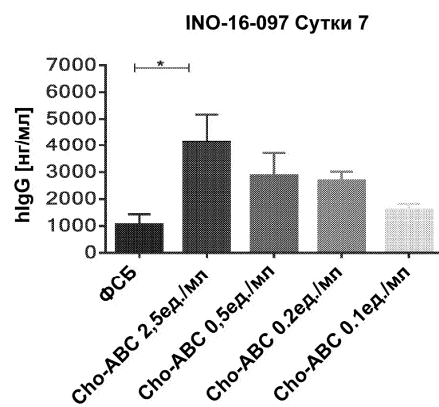
b



Фиг. 6



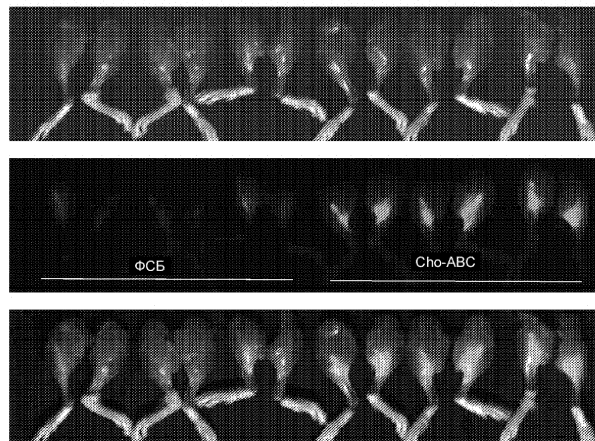
Фиг. 7



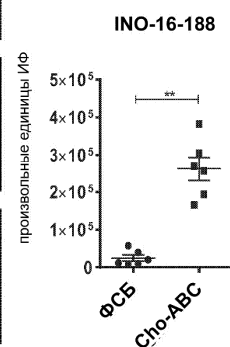
Фиг. 8

a

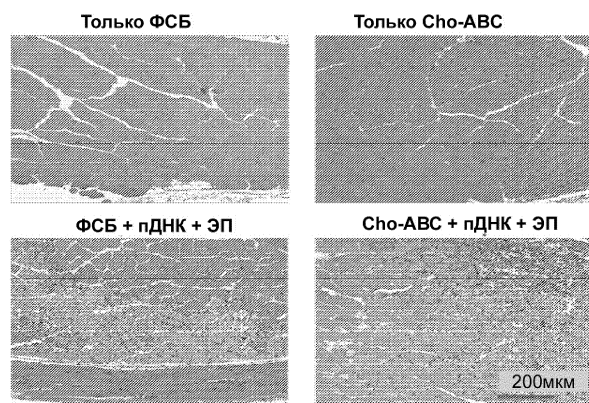
INO-16-188



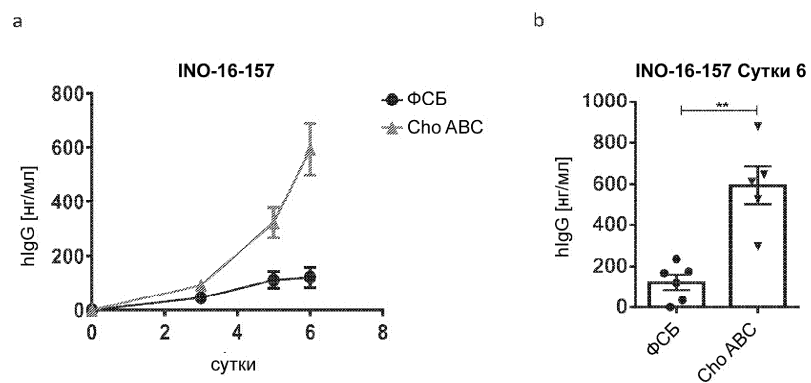
b



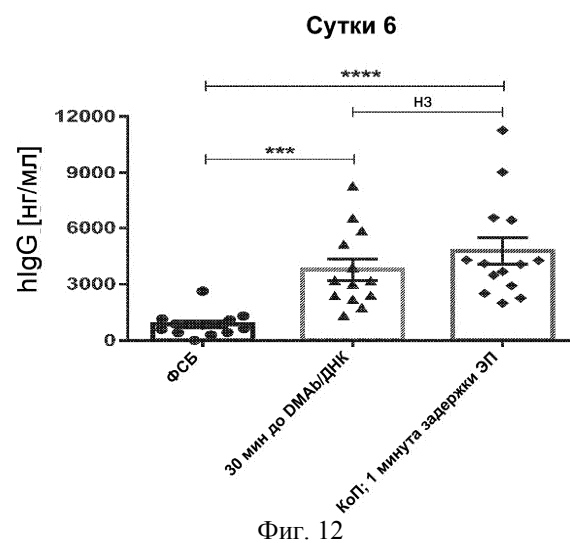
Фиг. 9



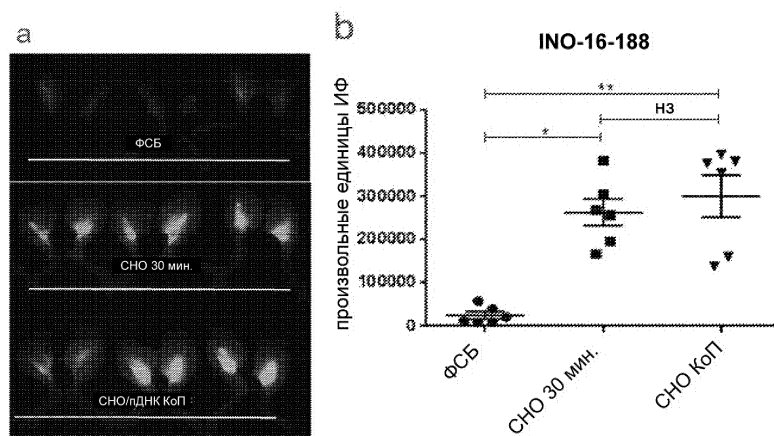
Фиг. 10



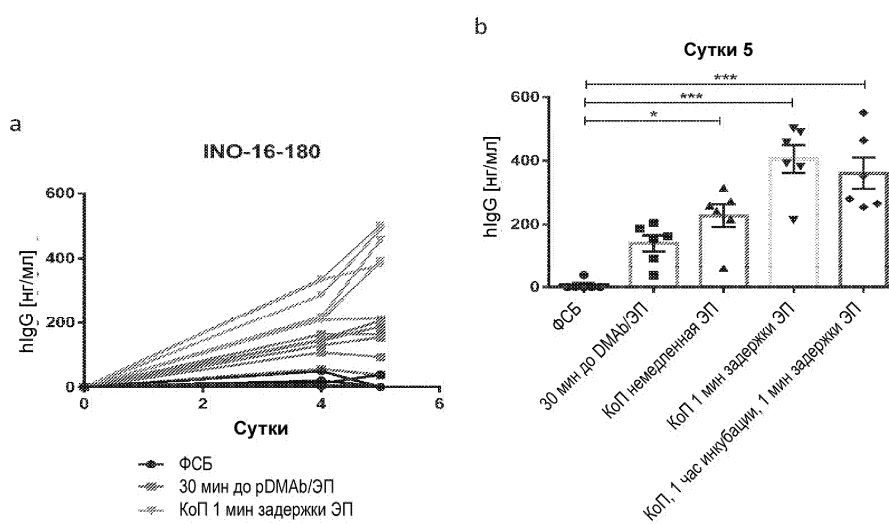
Фиг. 11



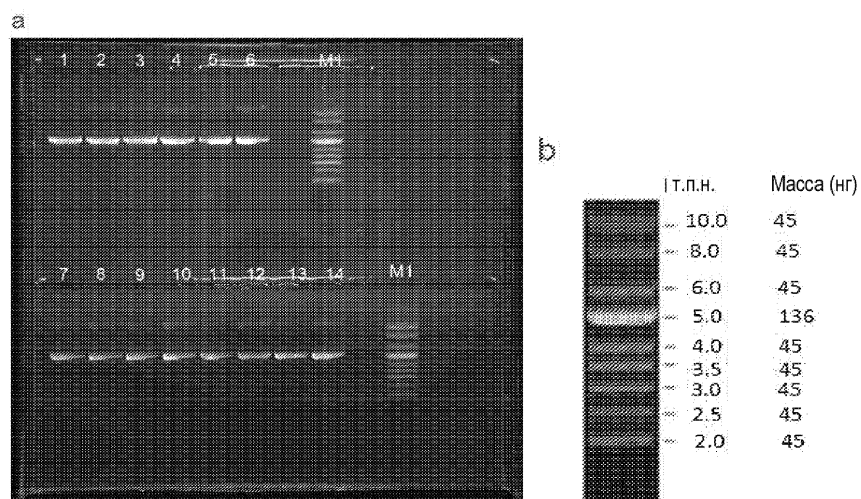
Фиг. 12



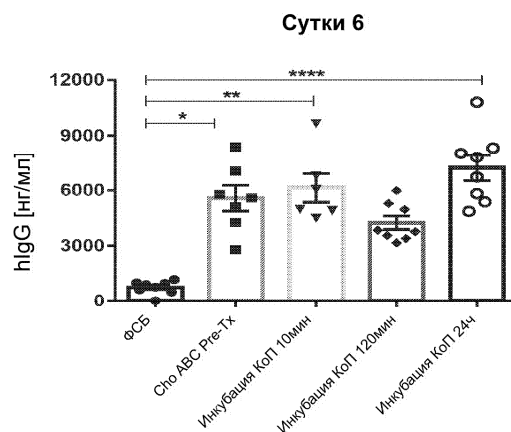
Фиг. 13



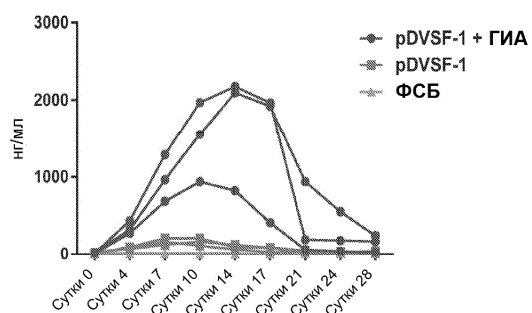
Фиг. 14



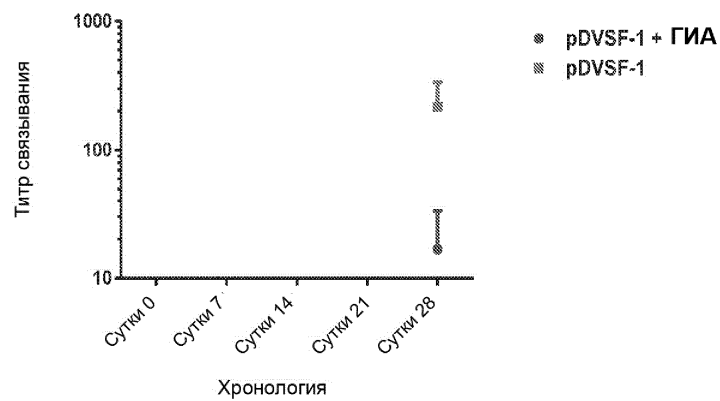
Фиг. 15



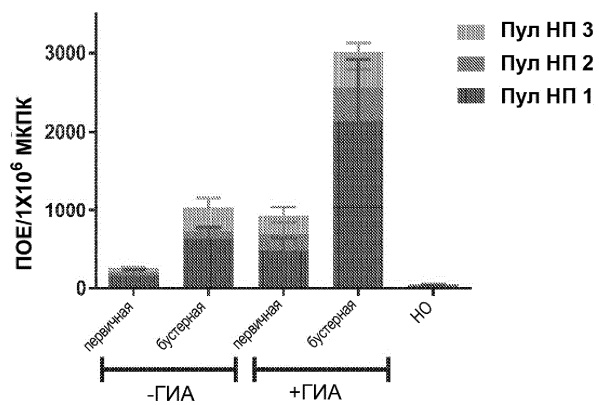
Фиг. 16



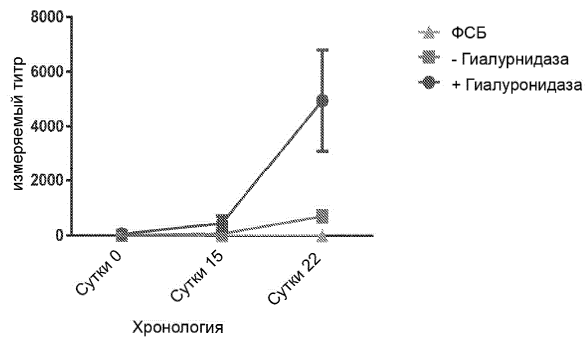
Фиг. 17



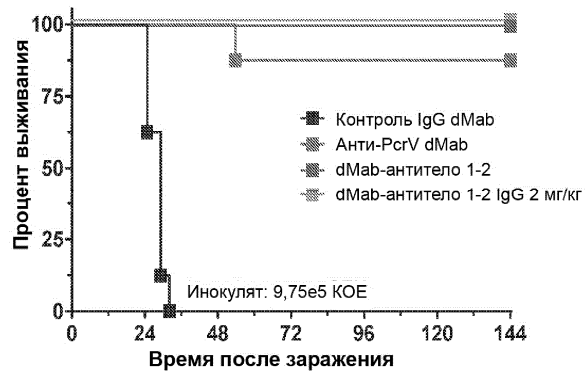
Фиг. 18



Фиг. 19

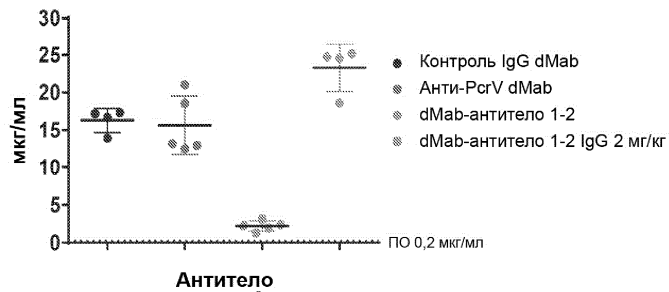


Фиг. 20

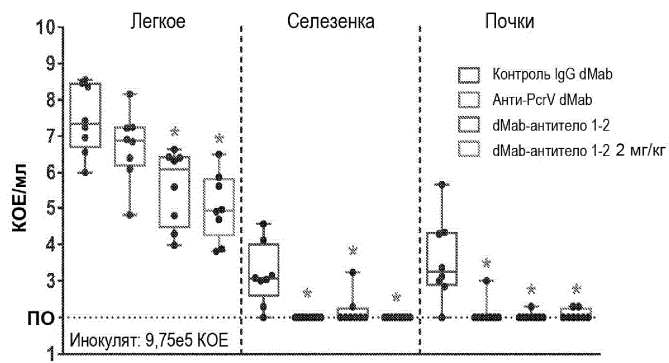


Фиг. 21

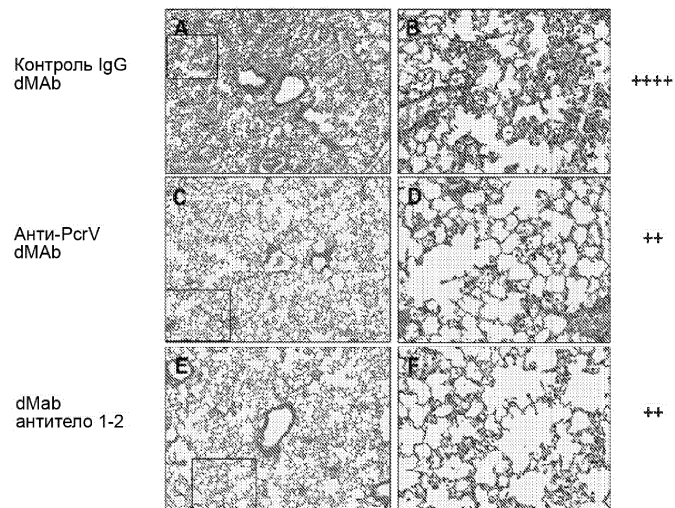
Количественное определение в сыворотке dMab IgG



Фиг. 22

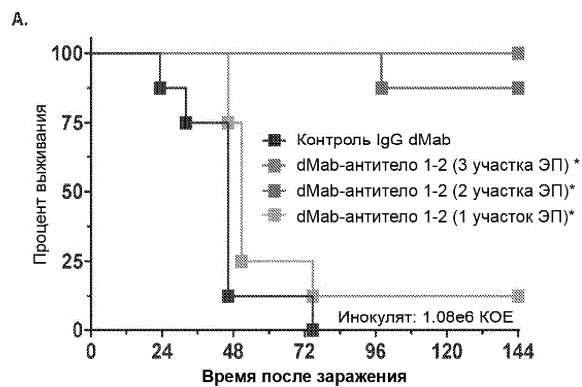


Фиг. 23

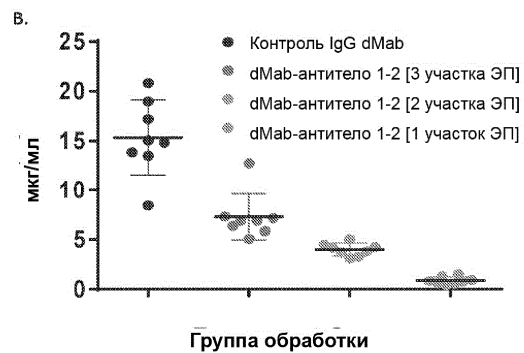


Фиг. 24

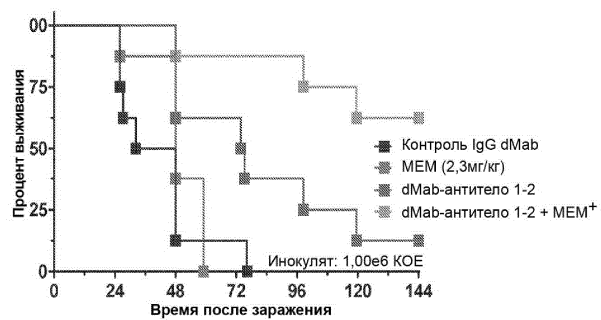
Модель пневмонии с использованием *P. aeruginosa*



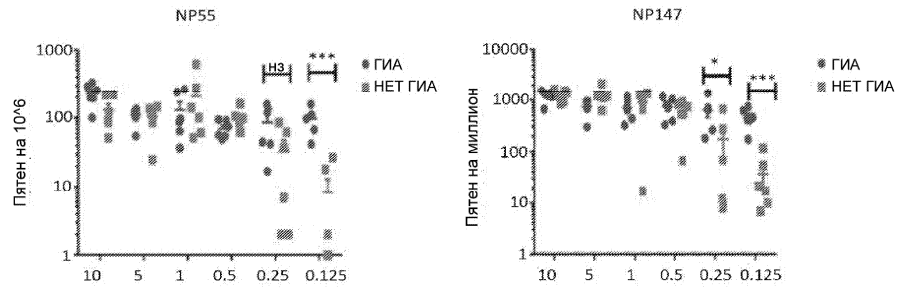
Определение количества dMAb IgG в сыворотке



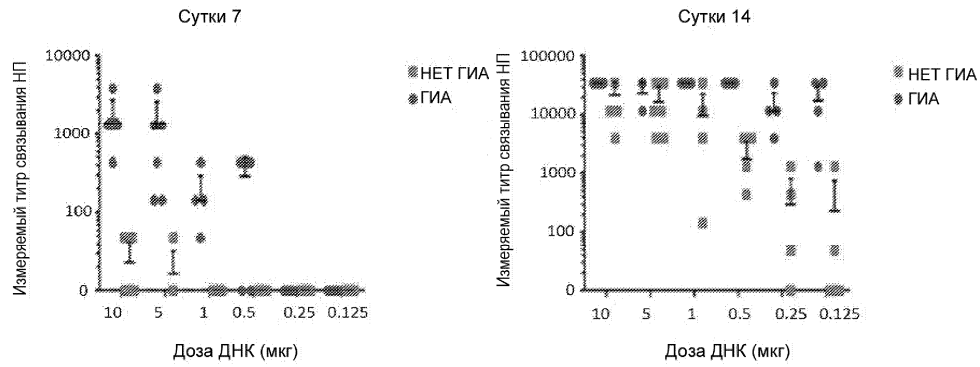
Фиг. 25



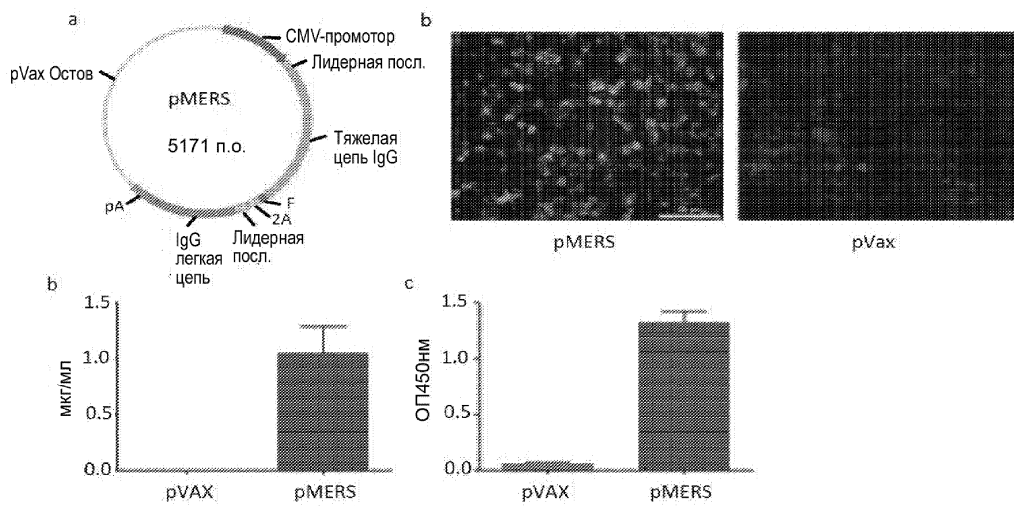
Фиг. 26



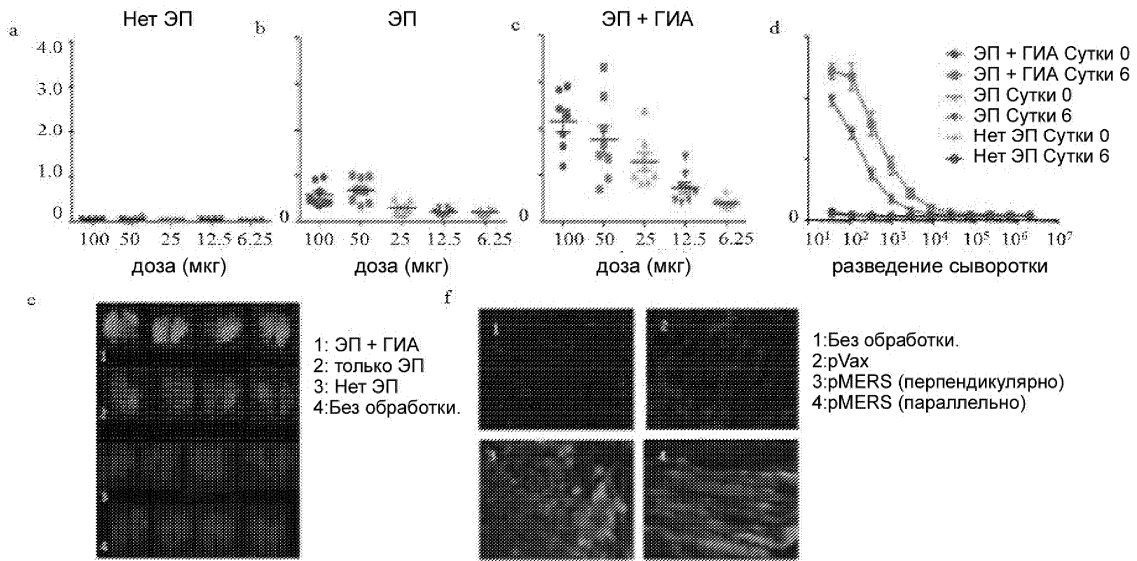
Фиг. 27



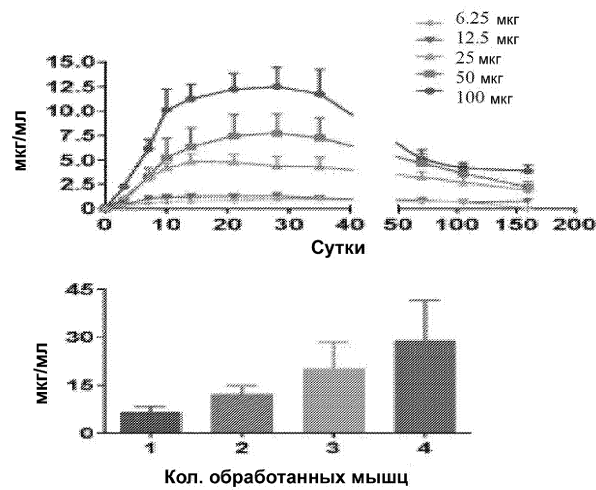
Фиг. 28



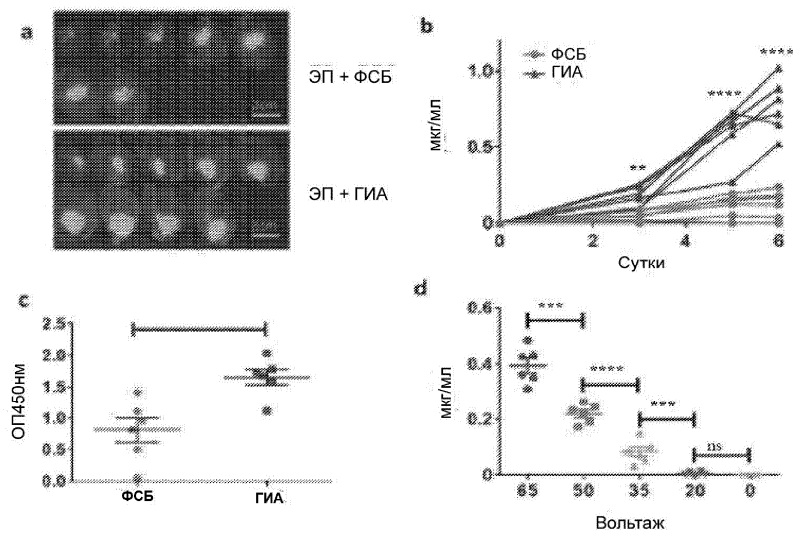
Фиг. 29



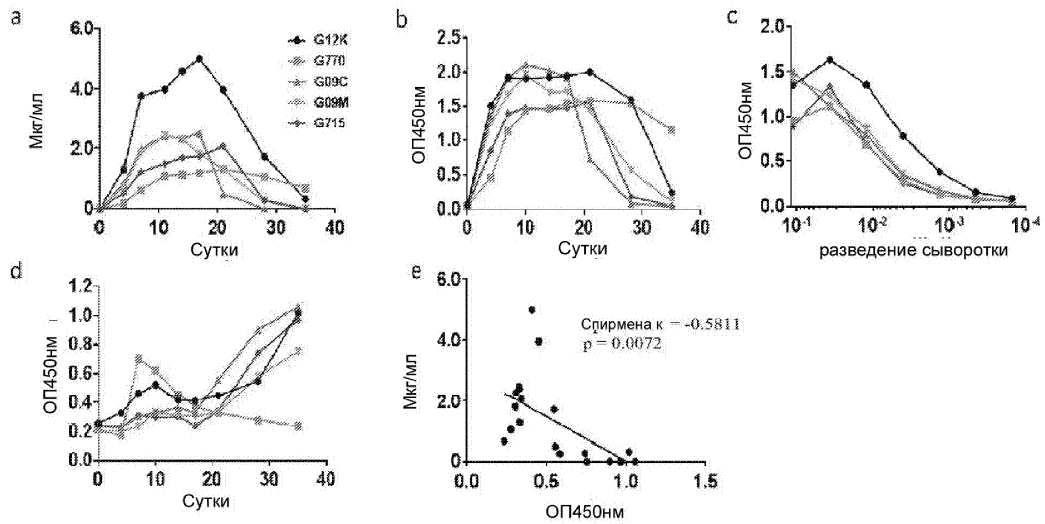
Фиг. 30



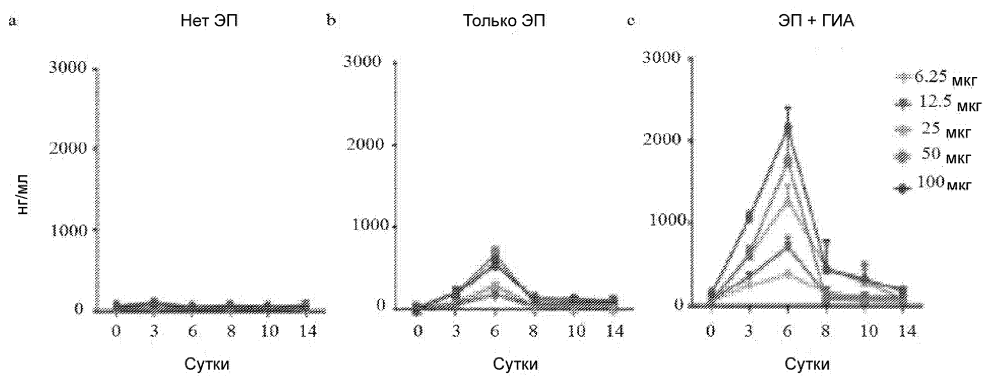
Фиг. 31



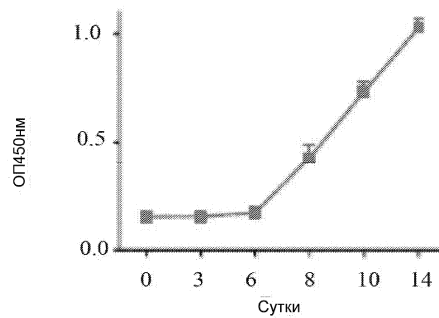
Фиг. 32



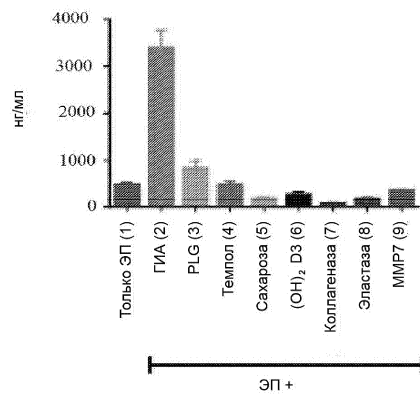
Фиг. 33



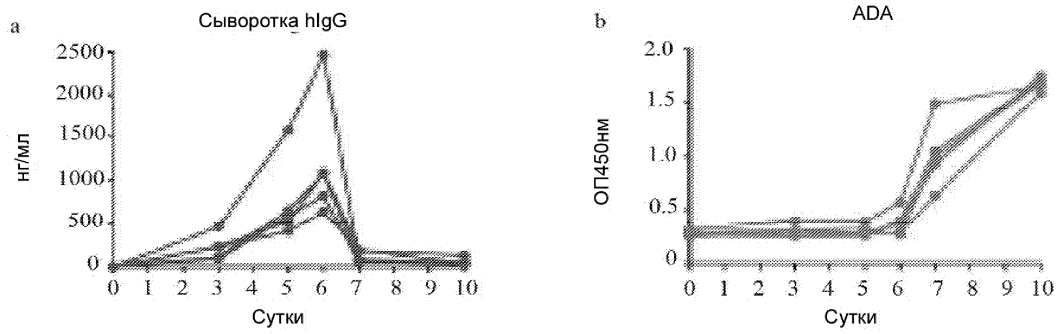
Фиг. 34



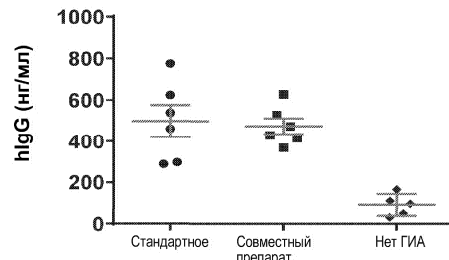
Фиг. 35



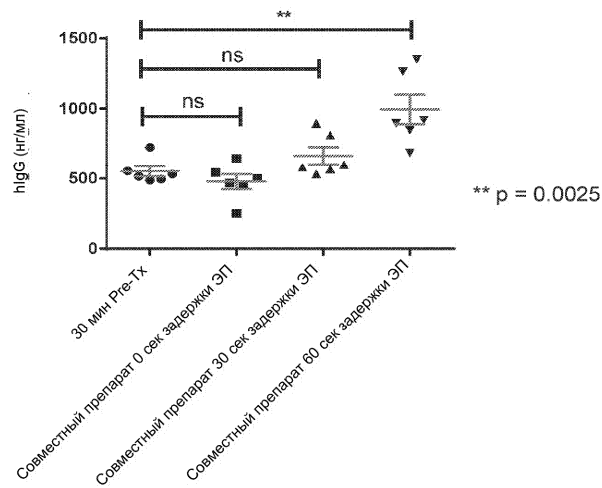
Фиг. 36



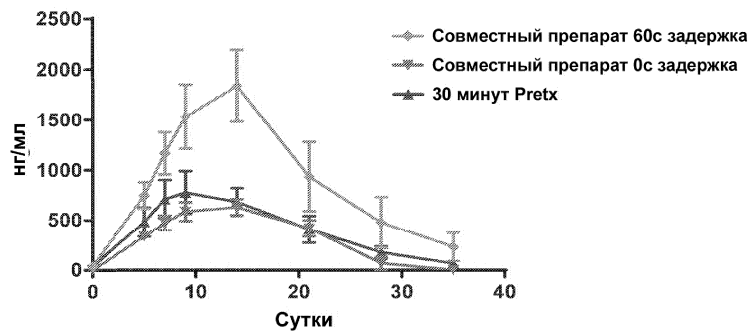
Фиг. 37



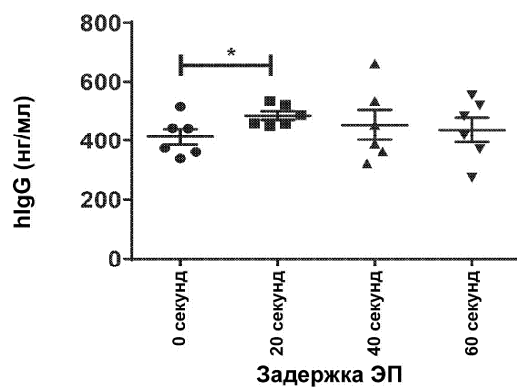
Фиг. 38



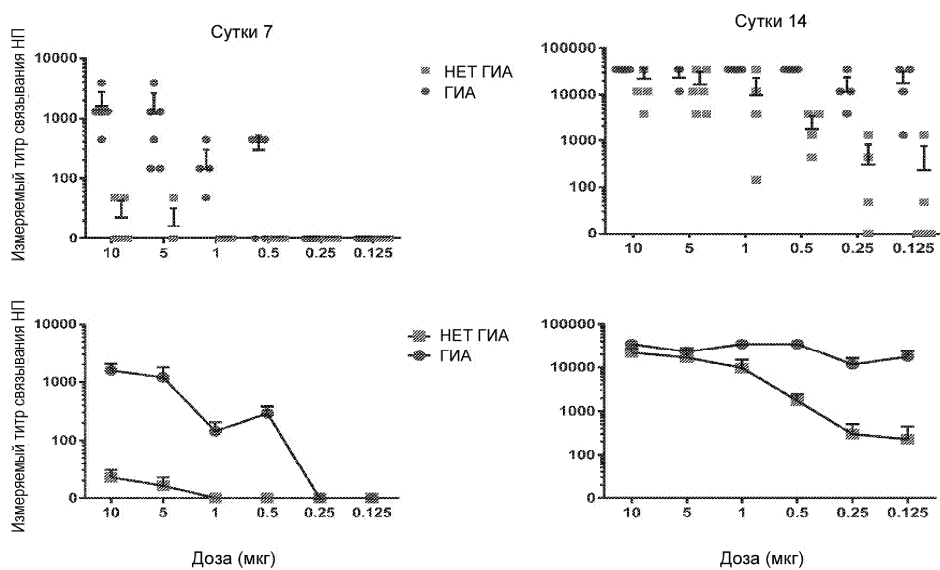
Фиг. 39



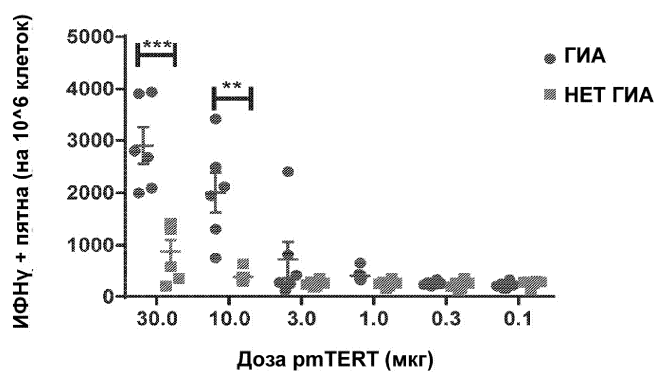
Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42



Фиг. 43

