

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043388**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.22

(21) Номер заявки
201591673

(22) Дата подачи заявки
2014.03.13

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(54) ИММУНОПРОТЕКТИВНЫЕ ПЕРВИЧНЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И СПОСОБЫ

(31) 13/826,285

(32) 2013.03.14

(33) US

(43) 2016.01.29

(86) PCT/US2014/025941

(87) WO 2014/160157 2014.10.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ АДМИНИСТРЕЙТОРС ОФ ДЗЕ
ТЪЮЛЕЙН ЭДЬЮКЕЙШНЛ ФАНД;
АУТОИММЬОН ТЕКНОЛОДЖИЗ,
ЭлЭлСи (US)**

(56) US-A1-20050058983
US-A1-20100226912

TOMCHUCK et al.: Mesenchymal stem cells as a novel vaccine platform. Front Cell Infect Microbiol. November 2012. Vol. 16. No. 2, pp 1-8. Especially page 3, Col. 2, para 2; page 4, Col. 1, para 2; page 4, Col. 2, para 1; page 6, Col. 2, para 4; page 3, Col. 2, para 3; page 4, Col. 1, para 1; page 3, Col. 1, para 3; page 4, Col. 2, para 2; page 5, Col. 1, para 1, page 5, Col. 2, para 1

US-A1-20080014205

(72) Изобретатель:
**Гарри Роберт Ф., Бранко Луис М.,
Баннелл Брюс А., Уилсон Рассел Б.,
Хопкинс Сэмюел Э. (US)**

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

(57) В изобретении описаны иммунопротективные первичные мезенхимальные стволовые клетки (IP-MSC), которые эписомально экспрессируют множество иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на патоген (например, инфекционный вид вируса, бактерии или паразита) или токсин, описаны в настоящем документе. IP-MSC экспрессируют два или более (например, от 2 до приблизительно 100) иммунореактивных полипептидов (например, полноразмерных антител, одноцепочечных вариабельных фрагментов антител (ScFV), фрагментов антител Fab или F(ab)₂, диател, триотел и т.п.) и, необязательно, один или несколько других иммуномодулирующих полипептидов, например цитокин, такой как интерлейкин (например, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9 и IL-12), интерферон (например, IFN α , IFN β или IFN ω) и т.п., которые могут усиливать эффективность иммунореактивных полипептидов.

043388 B1

043388 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Это изобретение относится к мезенхимальным стволовым клеткам. Более конкретно, это изобретение относится к первичным мезенхимальным стволовым клеткам (MSC) для доставки полипептидов, которые являются иммунореактивными против патологических агентов, таких как патогены и токсины, так же как к способам получения таких MSC и использования таких MSC против патологических агентов.

Включение списка последовательностей

Информация о биологических последовательностях для этой заявки включена в текстовом файле ASCII, имеющем наименование файла "TU-491-SEQ.txt", созданном 11 марта 2013 г., и имеющем 12954 байт, содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Предпосылки изобретения

Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) представляют собой уникальные мультипотентные клетки-предшественники, которые в настоящее время используют в качестве векторов для генотерапии для множества состояний, включая злокачественные опухоли и аутоиммунные заболевания. Хотя MSC преимущественно известны по противовоспалительным свойствам в ходе аллогенной трансплантации MSC, существует доказательство, что MSC могут фактически стимулировать приобретенный иммунитет в конкретных условиях. MSC идентифицированы в широком множестве тканей, включая костный мозг, жировую ткань, плаценту и пуповинную кровь. Жировая ткань является одним из наиболее богатых известных источников MSC.

MSC успешно трансплантировали аллогенным хозяевам во множестве клинических и доклинических условий. Эти донорные MSC часто стимулируют иммунотолерантность, включая ингибирование реакции трансплантат против хозяина (GvHD), которая может развиваться после трансплантации клеток или ткани от несовпадающего по главному комплексу гистосовместимости (MHC) донора. Уменьшенные симптомы GvHD после переноса MSC обусловлены непосредственным ингибированием посредством MSC пролиферации Т- и В-клеток, цитотоксичности покоящихся клеток естественных киллеров и созревания дендритных клеток (DC). По меньшей мере в одном исследовании опубликовано получение антител против трансплантированных аллогенных MSC. Тем не менее, способность предотвращать GvHD также позволяет предполагать, что MSC, экспрессирующие чужеродный антиген, могут иметь преимущество над другими типами клеток (т.е., DC) в ходе клеточной вакцинации в избирательной индукции иммунных ответов только на чужеродный антиген(ы), экспрессированные MSC, а не специфически на донорные MSC.

Применение модифицированных MSC также исследовали *in vivo* для улучшения иммуномодулирующих свойств MSC. MSC, трансдуцированные для сверхпродукции IL-10, суппрессируют индуцированный коллагеном артрит в модели на мышах (Choi et al., 2008). Кроме того, MSC, экспрессирующие глюкогоноподобный пептид-1, трансплантированные в модели болезни Альцгеймера на мышах, приводили к уменьшению накопления А-бета в головном мозге (Klinge et al., 2011). В модели остеопении на мышах, мыши после введения трансдуцированных MSC, обладающих стабильной сверхэкспрессией морфогенетического белка кости, обладали увеличенной плотностью кости (Kumar et al., 2010). В модели повреждения спинного мозга на крысах крысы после лечения MSC, стабильно сверхэкспрессирующие нейротрофический фактор головного мозга, обладали лучшим общим ответом, чем крысы после введения только MSC (Sasaki et al., 2009). Наконец, в модели обструкции выходного отверстия мочевого пузыря на крысах крысы после введения трансдуцированных MSC с стабильной сверхэкспрессией фактора роста гепатоцитов обладали уменьшенным накоплением коллагена в мочевом пузыре (Song et al., 2012). Эти исследования указывают на то, что модифицированные MSC являются полезным и осуществимым носителем для экспрессии и доставки белка для нацеливания на различные заболевания и ткани.

MSC исследовали в качестве носителя для доставки противораковых лекарственных средств из-за присущей им тенденции к хоумингу в микроокружении опухолей, и подробный обзор приведен в (Loebinger and Janes, 2010). MSC использовали также для стимуляции апоптоза опухолевых клеток посредством экспрессии IFN α или IFN γ (Li et al., 2006; Ren et al., 2008). Кроме того, недавно MSC использовали для предотвращения и ингибирования образования опухолей и метастазирования. В исследовании Wei et al., исследовали применение иммортализованных вирусом папилломы человека (HPV) MSC, экспрессирующих белки E6/E7 HPV, в сочетании с вакциной модифицированного слитого белка E7 в модели опухоли на мышах, где вводили клетки метастазирующей фибросаркомы (Wei et al., 2011). Эта группа обнаружила, что только для мышей, иммунизированных как экспрессирующими E7 MSC, так и вакциной модифицированного белка E7, показано уменьшение роста опухолей и специфический для E7 ответ антител. Мыши после введения либо MSC, либо белковой вакцины отдельно, не были способны вызывать ответ против E7 или ингибировать рост опухоли при метастазирующей саркоме. Хотя ранее определили, что эти иммортализованные MSC не являются опухолевыми, они персистируют у мышей дольше 21 суток, в отличие от первичных MSC (т.е. не иммортализованных), которые поддаются детекции только очень короткое время после введения (Gao et al., 2001; Abraham et al., 2004; Ohtaki et al., 2008; Prockop, 2009). Таким образом, могут присутствовать непредвиденные долгосрочные исходы (т.е., вытеснение эндогенных MSC и изменение иммуномодулирующих способностей, которые не оценивают в этом ис-

следовании) при использовании иммортализованных MSC, даже если доказано, что они являются не злокачественными. В других исследованиях показано, что иммортализованные MSC могут становиться опухолеродными, и таким образом, их необходимо тщательно исследовать, чтобы определить, являются ли они действительно безопасными для использования.

Трансплантированные первичные неиммортализованные MSC персистируют не более нескольких суток *in vivo* (Gao et al., 2001; Abraham et al., 2004; Ohtaki et al., 2008; Prockop, 2009).

В то время как MSC в первую очередь известны их иммуносупрессивными свойствами, в нескольких опубликованных сообщениях показано также напрямую, что MSC стимулируют приобретенный иммунитет. В совместных культурах MSC усиливали пролиферацию В-клеток, экспрессию IL-6 и образование секреторирующих IgG плазматических клеток *in vitro*; эти В-клеточные ответы можно было далее усиливать с помощью MSC в комбинации с агонистом TLR (липополисахаридом или ДНК CpG). MSC, сенсibilизированные токсоидом столбняка, стимулировали пролиферацию и экспрессию цитокинов (IL-4, IL-10, IFN γ) в линии специфических для токсоида столбняка CD4 Т-клеток. Подобным образом, MSC, культивированные в низких соотношениях (1:100) с лимфоцитами в присутствии антигена, улучшали пролиферацию лимфоцитов и формирование подгруппы CD4 Th17, которая являлась частично зависимой от IL-6 и TGF β . Обнаружено также, что MSC экспрессируют MHC-I и перекрестно представляют антиген для размножения CD8 Т-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

Обнаружено также, что иммунорегуляция MSC является зависимой от внешних сигналов. В присутствии воспалительных цитокинов или симуляторов терапия MSC, которая ранее являлась супрессирующей, может становиться иммуностимулирующей.

Например, MSC, обработанные молекулами специфического ассоциированного с патогенами молекулярного профиля (PAMP), могут становиться либо противовоспалительными, либо провоспалительными, в зависимости от PAMP, которыми их обрабатывают *in vitro*. В ходе индуцированного коллагеном артрита, в условиях воспалительного заболевания, трансплантация аллогенных MSC, по сообщениям, усиливала иммунные ответы Th1 и секрецию IL-6, что имитировали *in vitro* посредством прямой стимуляции MSC TNF α . Введение MSC также, по сообщениям, обостряло заболевание индуцированным коллагеном артритом и усиливало секрецию спленоцитами IL-6 и IL-17. Предварительная обработка MSC IFN γ (в среднем диапазоне), по сообщениям, приводит к повышающей регуляции экспрессии MHC-I и II и улучшает способности фагоцитоза и презентации антигена, таким образом, стимулируя пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток и образование противоопухолевых CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).

Вакцины часто являются эффективными и экономически эффективными средствами предотвращения инфекционного заболевания. Для вакцин показан поддающийся трансформации потенциал уничтожения одного из изнуряющих заболеваний, оспы, в то же время предоставляя возможность контроля других заболеваний, включая дифтерию, полиомиелит и краснуху, которые ранее вызывали широко распространенные заболеваемость и смертность. Разработка вакцин включает в себя тестирование ослабленного или инактивированного варианта патогена или идентификацию компонента патогена (т.е., субъединицы, токсоида и вирусоподобных частиц вакцины), который вызывает иммунный ответ, который защищает реципиентов от заболевания, когда они подвергаются воздействию действительного патогена. В идеале, одиночная вакцина может являться способной нацеливаться на все основные патогены человека (многосторонней), вызывать сильный защитный иммунитет к этим патогенам без индукции нежелательных побочных эффектов, и все еще являться вполне недорогой для производства на дозу. В случае продуцируемых вирусами или клетками-хозяевами белков, вероятно доказано, что получение вакцины, включающее в себя человеческий посттрансляционный процессинг, имитирующее природную инфекцию, обладает преимуществами перед бактериальными или другими системами экспрессии.

Общепринятыми способами вакцинации к настоящему времени не удалось обеспечить защиту против HIV, туберкулеза, малярии и многих других заболеваний, включая Денге, герпес и даже вирусную инфекцию верхних дыхательных путей. Причины, по которым общепринятые способы вакцинации не являлись успешными, являются сложными и изменчивыми. Например, HIV интегрирует функциональные провирусные геномы в ДНК клеток-хозяев, таким образом, формируя латентность или персистенцию. После формирования латентности/персистенции, не является возможным уничтожение HIV, даже с помощью высоко активной противоретровирусной терапии.

Более новые альтернативные способы иммунизации включают в себя как ДНК-вакцины, так и клеточные вакцины. ДНК-вакцины включают в себя трансфекцию клеток в участке вакцинации ткани кодирующей антиген плазмидой, которая позволяет местным клеткам (т.е. миоцитам) продуцировать вакцинный антиген *in situ*. В клеточных вакцинах используют прямой перенос предварительно сенсibilизированных или трансфицированных антигенпредставляющих клеток хозяина (например, дендритных клеток, DC), экспрессирующих или представляющих вакцинный антиген. Преимуществом этих способов является то, что вакцинные антигены продуцируются *in vivo* и являются легко доступными для иммунологического процессинга. Несмотря на многочисленные сообщения об успешном доклиническом тестировании, оба таких способа обладают распространенными скрытыми проблемами. Исследования ДНК-вакцинации у человека показывают плохую эффективность, связанную с врожденными различиями между мышью и

человеком (Cavanaugh et al., 2011; Wang et al., 2011). Для способов вакцинации DC показан ограниченный клинический успех для терапевтических вакцинаций против злокачественных опухолей, и они обладают высокой стоимостью получения из-за необходимости индивидуальной адаптации (Bhargava et al., 2012; Palucka and Banchereau, 2012).

Дополнительным ограничением современной технологии вакцин является время, затрачиваемое на разработку вакцины против данного патогена. Это является особенно проблематичным в случае воздействия вновь возникающих патогенов и преднамеренно или случайно высвобождаемых патогенов и токсинов, где необходимы средства для быстрой защиты против таких возникающих патогенов и биологических угроз. Способы и эпизомально трансфицированные MSC, описанные в настоящем документе, направлены на эти нужды.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к иммунопротективным первичным мезенхимальным стволовым клеткам (IP-MSC), которые эпизомально экспрессируют множество иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на патоген (например, инфекционный вид вируса, бактерии или паразита) или токсин, так же как к способам получения и применения IP-MSC. IP-MSC являются трансфицированными одним или несколькими эпизомальными векторами, кодирующими два или более (например, от 2 до приблизительно 100) поддающихся экспрессии иммунореактивных полипептидов (например, полноразмерных антител, одноцепочечных вариабельных фрагментов антител (ScFV), фрагментов антител Fab или F(ab')₂, диател, триотел и т.п.). Необязательно, IP-MSC может экспрессировать один или несколько других иммуномодулирующих полипептидов, например, цитокин, такой как интерлейкин (например, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, и IL-12), интерферон (например, IFN α , IFN β или IFN ω) и т.п., которые могут усиливать эффективность антигенсвязывающих полипептидов для нейтрализации патогена или токсина. Каждый иммунореактивный полипептид содержит аминокислотную последовательность антигенсвязывающей области от или из нейтрализующего антитела (например, нативного антитела от подвергнутого воздействию субъекта), специфического для антигена, продуцируемого патогеном, или специфического для токсина, или содержит аминокислотную последовательность варианта антигенсвязывающей области, включающую в себя одну или несколько замен (например, консервативных замен) в его аминокислотной последовательности, и предпочтительно, разделяющую по меньшей мере приблизительно 50% идентичность последовательности (например, по меньшей мере приблизительно 60, 70, 80, 90, или 95% идентичность последовательности) с нативной антигенсвязывающей областью. Каждый пептид антигенсвязывающей области или его вариант аранжирован и ориентирован для специфического связывания и нейтрализации патогена или токсина.

В некоторых вариантах осуществления IP-MSC экспрессируют, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 иммунореактивных полипептидов, или вплоть до до приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на патоген или токсин. Например, каждый иммунореактивный полипептид может быть специфически нацелен и связывать белок или его фрагмент из патогенного организма, или токсин (например, рицин, абрин, токсин сибирской язвы, токсин ботулизма), который может быть получен посредством организма *in situ* или может находиться в химически выделенной или очищенной форме.

IP-MSC можно использовать для получения пассивного иммунитета против или для лечения инфекции патогеном или воздействия токсина (например, посредством нейтрализации). IP-MSC можно предоставлять в фармацевтически приемлемом носителе (например, буфере, таком как фосфатно-солевой буфер, или любом другом забуференном материале, пригодном для поддержания жизнеспособных трансфицированных первичных MSC) для использования в качестве фармацевтической композиции для лечения или предотвращения инфекционного заболевания, вызванного патогеном, или для облегчения вредных эффектов токсина. В некоторых вариантах осуществления IP-MSC содержат происходящие из костного мозга MSC, в то время как в некоторых других вариантах осуществления IP-MSC содержат жировые клетки MSC, клетки MSC плаценты или клетки MSC пуповинной крови.

IP-MSC, описанные в настоящем документе, являются особенно полезными для временной пассивной защиты против патогенов и токсинов, по меньшей мере, частичной, поскольку первичные MSC являются гипои иммуногенными клетками, на которые, как правило, не нацеливается иммунная система. Таким образом, IP-MSC являются переносимыми подвергаемым лечению субъектом, что позволяет клеткам выживать в течение достаточного времени для экспрессии, продукции и высвобождения иммунореактивных полипептидов для связывания и нейтрализации патогенного организма или токсина, воздействию которых субъект подвергался или может подвергаться. Кроме того, первичные MSC, как правило, обладают ограниченной продолжительностью жизни в организме, таким образом, уменьшая потенциал нежелательных долговременных побочных эффектов лечения MSC (например, канцерогенности), которые могут являться проблемой для иммортализованных MSC.

Следующие варианты осуществления настоящего изобретения 1-35 представлены для дополнительной иллюстрации объема и различных аспектов изобретения. Эти варианты осуществления представлены в качестве неограничивающих иллюстраций IP-MSC и способов, описанных в настоящем документе.

Вариант осуществления 1 относится к иммунопротективным первичным мезенхимальным стволовым клеткам (IP-MSC), эписомально экспрессирующим множество иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на патоген или токсин. IP-MSC являются трансфицированными одним или несколькими эписомальными векторами, кодирующими иммунореактивные полипептиды. Каждый иммунореактивный полипептид содержит аминокислотную последовательность из антигенсвязывающей области нейтрализующего антитела, специфического для антигена, продуцируемого патогеном, или специфического для токсина, или аминокислотную последовательность варианта последовательности антигенсвязывающей области, содержащего одну или несколько замен в его аминокислотной последовательности и разделяющего по меньшей мере приблизительно 50% идентичность последовательности с последовательностью антигенсвязывающей области; и последовательность антигенсвязывающей области или ее вариант аранжирован и ориентирован для специфического связывания и нейтрализации патогена или токсина; и где эписомальный вектор, необязательно, содержит индуцируемый ген апоптоза.

Вариант осуществления 2 относится к IP-MSC из варианта осуществления 1, где IP-MSC эписомально экспрессируют от 2 до приблизительно 100 иммунореактивных полипептидов.

Вариант осуществления 3 относится к IP-MSC из варианта осуществления 1 или 2, где IP-MSC также экспрессируют один или несколько других иммуномодулирующих средств.

Вариант осуществления 4 относится к IP-MSC из варианта осуществления 3, где одно или несколько иммуномодулирующих средств выбраны из интерлейкинов и интерферонов.

Вариант осуществления 5 относится к IP-MSC из варианта осуществления 3, где одно или несколько иммуномодулирующих средств выбраны из L-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IFN α , IFN β и IFN ω .

Вариант осуществления 6 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-5, где каждый иммунореактивный полипептид выбран из полноразмерного антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (ScFV), одновалентного антигенсвязывающего фрагмента антитела (Fab), двухвалентного антигенсвязывающего фрагмента антитела (F(ab')₂), диатела и триотела.

Вариант осуществления 7 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-6, где один или несколько из иммунореактивных полипептидов содержит аминокислотную последовательность варианта антигенсвязывающей области, и где замены в аминокислотной последовательности варианта содержат консервативные замены.

Вариант осуществления 8 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-7, где один или несколько из иммунореактивных полипептидов содержит аминокислотную последовательность варианта антигенсвязывающей области, и где аминокислотная последовательность варианта разделяет по меньшей мере приблизительно 80% идентичность последовательности с последовательностью антигенсвязывающей области.

Вариант осуществления 9 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой вирусный патоген.

Вариант осуществления 10 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой бактериальный патоген.

Вариант осуществления 11 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой одноклеточный паразитический патоген.

Вариант осуществления 12 содержит IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой многоклеточный паразитический патоген.

Вариант осуществления 13 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой вирусный патоген, выбранный из группы, состоящей из аденовируса; вируса папилломы; гепаднавируса; парвовируса; поксвируса; вируса Эпштейна-Барр; цитомегаловируса (CMV); вируса простого герпеса; розеоовируса; вируса ветряной оспы; филовируса; парамиксовируса; ортомиксовируса; рабдовируса; аренавируса; коронавируса; энтеровируса человека; вируса гепатита А; риновируса человека; вируса полиомиелита; ретровируса; ротавируса; флавивируса; гепацивируса; и вируса краснухи.

Вариант осуществления 14 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой бактериальный патоген из рода, выбранного из группы, состоящей из

Bacillus; Bordetella; Borrelia; Brucella; Burkholderia; Campylobacter; Chlamydia, Chlamydophila; Clostridium; Corynebacterium; Enterococcus; Escherichia; Francisella; Haemophilus; Helicobacter; Legionella; Leptospira; Listeria; Mycobacterium; Mycoplasma; Neisseria; Pseudomonas; Rickettsia; Salmonella; Shigella; Staphylococcus; Streptococcus; Treponema; Vibrio; и Yersinia.

Вариант осуществления 15 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где патоген представляет собой паразитический патоген, выбранный из группы, состоящей из

Acanthamoeba; *Anisakis*; *Ascaris lumbricoides*; *Balantidium coli*; *Cestoda* (ленточного червя); клещей *Trombicula irritans*; *Cochliomyia hominivorax*; *Entamoeba histolytica*; *Fasciola hepatica*; *Giardia lamblia*; кривоголовки; *Leishmania*; *Linguatula serrata*, печеночного сосальщика; лоя лоя; *Paragonimus* (легочного сосальщика); острицы; *Plasmodium falciparum*; *Schistosoma*; *Strongyloides stercoralis*; солитера; *Toxoplasma gondii*; *Trypanosoma*; власоглава; и *Wuchereria bancrofti*.

Вариант осуществления 16 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-8, где антигенный полипептид выбран из группы, состоящей из: гемагглютинина 1 (HA1) гриппа; гемагглютинина 2 (HA2) гриппа; нейраминидазы (NA) гриппа; гликопротеина 1 (gp1) вируса Ласса (LASV); гликопротеина 2 (gp2) LASV; ассоциированного с нуклеокапсидом белка (NP) LASV; белка L LASV; белка Z LASV; белка S вируса SARS; GP2 вируса Эбола; белка слияния 1 (F1) вируса кори; трансмембранного белка (TM) HIV-1; гликопротеина 41 (gp41) HIV-1; гликопротеина 120 (gp120) HIV-1; гликопротеина 1 оболочки (E1) вируса гепатита С (HCV); гликопротеина 2 оболочки (E2) HCV; белка нуклеокапсида (p22) HCV; гликопротеина оболочки (E) вируса лихорадки западного Нила (WNV); гликопротеина оболочки (E) вируса японского энцефалита (JEV); гликопротеина оболочки (E) вируса желтой лихорадки (YFV); гликопротеина оболочки (E) вируса клещевого энцефалита (TBEV); гликопротеина оболочки 1 (E1) вируса гепатита G (HGV); белка слияния (F) респираторно-синцитиального вируса (RSV); белка gD вируса простого герпеса 1 (HSV-1); белка gG HSV-1; белка gD HSV-2; белка gG HSV-2; корового белка вируса гепатита В (HBV); гликопротеина 125 (gp125) вируса Эпштейна-Барр (EBV); бактериального фактора сборки белка наружной мембраны BamA; бактериального белка модуля сборки и транслокации TamA; бактериального белка ассоциированного с транспортом полипептидов белкового домена; бактериального поверхностного антигена D15; защитного белка сибирской язвы; летального фактора сибирской язвы; отечного фактора сибирской язвы; S1Da *Salmonella typhii*; S1Db *Salmonella typhii*; токсина холеры; белка теплового шока холеры; антигена S *Clostridium botulinum*; ботулинического токсина; F1 *Yersina pestis*; антигена V *Yersina pestis*; YopH *Yersina pestis*; YopM *Yersina pestis*; YopD *Yersina pestis*; фактора активации плазмидогена (Pla) *Yersina pestis*; белка циркумспорозита (CSP) *Plasmodium*; поверхностного белка спорозита (SSP2/TRAP) *Plasmodium*; антигена 1 печеночной стадии (LSA1) *Plasmodium*; экспортируемого белка 1 (EXP 1) *Plasmodium*; связывающего эритроциты антигена 175 (EBA-175) *Plasmodium*; богатого цистеином защитного антигена (cyRPA) *Plasmodium*; белка теплового шока 70 (hsp70) *Plasmodium*; Sm29 *Schistosoma*; и белка передачи сигнала 14-3-3 *Schistosoma*.

Вариант осуществления 17 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-16, где IP-MSC получены из происходящих из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток. Вариант осуществления 18 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-16, где IP-MSC получены из происходящих из жировой ткани мезенхимальных стволовых клеток.

Вариант осуществления 19 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-18 для лечения инфекции патогена или токсичности из-за воздействия токсина.

Вариант осуществления 20 относится к IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-18 для предотвращения инфекции патогена или для предотвращения токсичности из-за воздействия токсина.

Вариант осуществления 21 относится к фармацевтической композиции для лечения инфекции, вызванной патогеном, или для лечения воздействия токсина, содержащей IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20 в фармацевтически приемлемом носителе.

Вариант осуществления 22 относится к фармацевтической композиции для предотвращения инфекции, вызванной патогеном, или для облегчения эффектов воздействия токсина, содержащей IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20 в фармацевтически приемлемом носителе.

Вариант осуществления 23 относится к применению IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20 для предотвращения инфекции, вызванной патогеном, или для предотвращения токсичности из-за воздействия токсина.

Вариант осуществления 24 относится к применению IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20 для лечения текущей инфекции, вызванной патогеном, или для облегчения эффектов воздействия токсина.

Вариант осуществления 25 относится к применению IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20 для изготовления фармацевтической композиции для лечения инфекции, вызванной патогеном, или для облегчения эффектов воздействия токсина.

Вариант осуществления 26 относится к применению IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20 для изготовления фармацевтической композиции для предотвращения инфекции, вызванной патогеном, или для предотвращения токсичности из-за воздействия токсина.

Вариант осуществления 27 относится к способу лечения инфекции, вызванной патогеном, или лечения воздействия токсина, включающему в себя введение субъекту терапевтически эффективной дозы

IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20.

Вариант осуществления 28 относится к способу предотвращения инфекции, вызванной патогеном, или предотвращения токсичности из-за воздействия токсина, включающему в себя введение субъекту профилактической дозы IP-MSC из любого из вариантов осуществления 1-20.

Вариант осуществления 29 относится к способу лечения или предотвращения вспышки заболевания, вызванного патогеном, или облегчения воздействия токсина, включающему в себя стадию введения иммунопротективных первичных мезенхимальных стволовых клеток (IP-MSC) субъекту, подвергнутого воздействию или подверженному риску воздействия патогена или токсина; где IP-MSC являются трансфицированными одним или несколькими эписомальными векторами, кодирующими по меньшей мере два иммунореактивных полипептида, специфически нацеленных на патоген или токсин, где каждый иммунореактивный полипептид содержит антигенсвязывающую область нейтрализующего антитела, специфического для патогена или токсина, или кодирующими вариант антигенсвязывающей области, где вариант включает в себя одну или несколько замен в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей области и разделяет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с антигенсвязывающей областью нейтрализующего антитела.

Вариант осуществления 30 относится к способу из варианта осуществления 29, включающему в себя дополнительную стадию трансфекции первичных мезенхимальных стволовых клеток одним или несколькими эписомальными векторами, кодирующими по меньшей мере два иммунореактивных полипептида.

Вариант осуществления 31 относится к способу из варианта осуществления 30, включающему в себя дополнительную стадию идентификации нейтрализующих антител против патогена или токсина из одного или нескольких образцов крови, полученных от одного или нескольких переживших патогенное заболевание или воздействие токсина, перед трансфекцией первичных MSC.

Вариант осуществления 32 относится к способу из любого из вариантов осуществления 29-31, включающему в себя дополнительную стадию получения одного или нескольких эписомальных векторов, кодирующих поддающиеся экспрессии аминокислотные последовательности по меньшей мере двух или более иммунореактивных полипептидов, перед трансфекцией первичных MSC.

Вариант осуществления 33 относится к способу из любого из вариантов осуществления 29-32, где IP-MSC выбраны из любого из пп.1-20.

Вариант осуществления 34 относится к способу получения профилактических или терапевтических мезенхимальных стволовых клеток для лечения или предотвращения вспышки заболевания, вызванного патогеном, или для облегчения воздействия токсина, включающему в себя стадию трансфекции первичных мезенхимальных стволовых клеток одним или несколькими эписомальными векторами, кодирующими по меньшей мере два иммунореактивных полипептида, содержащих аминокислоты из антигенсвязывающей области нейтрализующего антитела, специфического для патогена или токсина, или кодирующими вариант последовательности антигенсвязывающей области, для получения иммунопротективных первичных мезенхимальных стволовых клеток (IP-MSC), экспрессирующих иммунореактивные полипептиды; где вариант включает одну или несколько замен в аминокислотной последовательности из антигенсвязывающей области и разделяет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с последовательностью антигенсвязывающей области нейтрализующего антитела.

Вариант осуществления 35 относится к способу из варианта осуществления 34, включающему в себя дополнительную стадию идентификации нейтрализующих антител против патогена или токсина из образцов крови, полученных от одного или нескольких переживших патогенное заболевание или воздействие токсина, перед трансфекцией первичных MSC.

Вариант осуществления 36 относится к способу из варианта осуществления 34 или варианта осуществления 35, включающему в себя дополнительную стадию получения одного или нескольких эписомальных векторов, кодирующих поддающиеся экспрессии аминокислотные последовательности по меньшей мере двух или более иммунореактивных полипептидов, перед трансфекцией первичных MSC.

Вариант осуществления 37 относится к способу из любого из вариантов осуществления 34-36, где IP-MSC выбраны из любого из вариантов осуществления 1-20.

Вариант осуществления 38 относится к эписомальному вектору, кодирующему поддающуюся экспрессии аминокислотную последовательность иммунопротективного полипептида; где каждый иммунореактивный полипептид содержит аминокислотную последовательность из антигенсвязывающей области нейтрализующего антитела, специфического для антигена, продуцируемого патогеном, или специфического для токсина, или аминокислотную последовательность варианта последовательности антигенсвязывающей области, содержащего одну или несколько замен в его аминокислотной последовательности и разделяющего по меньшей мере приблизительно 50% идентичность последовательности с последовательностью антигенсвязывающей области; где последовательность антигенсвязывающей области или ее вариант аранжирована для специфического связывания и нейтрализации патогена или токсина; и где эписомальный вектор, необязательно, включает индуцируемый ген апоптоза.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схематическая иллюстрация полноразмерного антитела IgG, ScFV, тандемного диатела и триотела.

На фиг. 2 схематически проиллюстрирован эписомальный вектор для трансфекции первичных MSC, как описано в настоящем документе (панель А); и бицистронный вектор, используемый для трансфекции MSC из жировой ткани человека для экспрессии MAb человека против LASV GP19.7E (панель В).

На фиг. 3 проиллюстрированы нуклеотидные последовательности тяжелых цепей MAb IgG человека против LASV GP10.4B (SEQ ID NO: 1) и MAb человека против LASV GP19.7E (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 4 проиллюстрированы нуклеотидные последовательности легких цепей MAb IgG человека против LASV GP10.4B (SEQ ID NO: 3) и MAb человека против LASV GP19.7E (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 5 проиллюстрированы аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей MAb IgG человека против LASV GP10.4B (HC: SEQ ID NO: 5; LC: SEQ ID NO: 7) и MAb человека против LASV GP19.7E (HC: SEQ ID NO: 6; LC: SEQ ID NO: 8).

На фиг. 6 представлен график процента выживших против суток после инфекции LASV для морских свинок, подвергнутых лечению MAb IgG человека против LASV GP10.4B и MAb человека против LASV GP19.7E, по сравнению с контрольными морскими свинками, подвергнутых обработке свободной от антител средой.

Подробное описание выбранных вариантов осуществления

Иммунопротективные первичные мезенхимальные стволовые клетки, описанные в настоящем документе, эписомально экспрессируют множество иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на представляющий интерес патоген или токсин. Каждый иммунореактивный полипептид содержит аминокислотную последовательность антигенсвязывающей области нейтрализующего антитела, специфического для антигена, продуцируемого патогеном, или специфического для токсина, или аминокислотную последовательность варианта антигенсвязывающей области, содержащего одну или несколько замен в его аминокислотной последовательности и разделяющего по меньшей мере приблизительно 50% идентичность последовательности с антигенсвязывающей областью. Антигенсвязывающая область или ее вариант аранжированы и ориентированы для специфического связывания и нейтрализации патогена или токсина, т.е., когда IP-MSС приводят в контакт с патогеном или токсином, например, когда IP-MSС вводят субъекту, и субъект подвергается воздействию патогена или токсина. Замены в варианте могут содержать или составлять консервативные замены, или, в некоторых случаях, неконсервативные замены, которые усиливают аффинность связывания или избирательность связывания варианта по сравнению с нативной антигенсвязывающей областью, или которые улучшают, усиливают или иным желательным образом действуют на одно или несколько свойств иммунореактивных полипептидов, таких как физические, химические или конформационные свойства.

IP-MSС потенциально можно использовать против любого патогена или токсина, для которого можно идентифицировать нейтрализующие антитела. IP-MSС и способы, описанные в настоящем документе, являются особенно полезными для обеспечения относительно быстро развивающегося, но кратковременного (например, вплоть до одного или двух месяцев) пассивного иммунитета против патогена или токсина. Такие патогены включают в себя вирусы, бактерии, паразиты (одноклеточные и многоклеточные паразиты), и т.п. Например, IP-MSС можно использовать в качестве защитного средства в случае преднамеренного или случайного высвобождения патогена или токсина. Кроме того, IP-MSС против конкретных патогенных вирусов (например, LASV, вируса Эбола, вируса Денге), бактерий

(*Rickettsia typhi*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia* spp.,

Vibrio cholerae, и т.п.) или паразитов (например, *Plasmodium*,

Trypanosoma, *Leishmania*, *Schistosoma* и т.п.)

можно использовать в качестве временной защиты для субъектов, путешествующих в районы, где патогены являются эндемичными, или для предотвращения инфекций, обычно приобретаемых пациентами в больницах (например, устойчивого к метициллину *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, устойчивых к ванкомицину *Enterococci*, *Streptococcus pneumoniae* и т.п.).

Фактором, вносящим важный вклад в дизайн лекарственных средств на основе MSС, является простота выделения и размножения в культуре MSС. Теоретически, одним сбором MSС из костного мозга можно получить достаточно MSС для тысяч клинических применений, благодаря присущей им способности к размножению (Newman et al., 2009). Такое размножение потенциально сильно улучшает производственные возможности GMP для использования MSС для клинических применений и снижает производственные расходы по сравнению с другими типами клеток.

Как применяют в настоящем документе, термин "иммунореактивный полипептид" и его грамматические варианты относятся к полипептиду, включающему пептид, кодирующий антигенсвязывающую область нейтрализующего антитела против представляющего интерес патогена или токсина, или вариант антигенсвязывающей области, который сохраняет специфичность для патогена или токсина, но отлича-

ется от структуры нативного антитела по присутствию одной или нескольких замен (например, консервативной замены) в аминокислотной последовательности нативной антигенсвязывающей области. Неограничивающие примеры иммунореактивных полипептидов включают в себя полноразмерные антитела (например, антитело IgG), антигенсвязывающие фрагменты таких полноразмерных антител и другие полипептиды, включающие в себя одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) таких антител, аранжированные и ориентированные для связывания с антигеном. Функциональные антигенсвязывающие фрагменты антител включают в себя полипептиды Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv, диатела и триотела.

Как применяют в настоящем документе, термин "антигенсвязывающая область" относится к участку антитела, связывающему антиген. Антигенсвязывающая область состоит из переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L), каждый из которых включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. CDR меняются по последовательности и определяют специфичность антитела для конкретного антигена. Домены V_H и V_L вместе формируют участок, который специфически связывает конкретный антиген.

Фрагменты антител Fab (антигенсвязывающие фрагменты) представляют собой иммунореактивные полипептиды, содержащие одновалентные антигенсвязывающие домены антитела, состоящие из полипептида, состоящего из переменной области тяжелой цепи (V_H) и части константной области 1 тяжелой цепи (C_{H1}), и полипептида, состоящего из переменной области легкой цепи (V_L) и части константной области легкой цепи (C_L), в которой части C_L и C_{H1} связаны вместе, предпочтительно, дисульфидной связью между остатками Cys.

Фрагмент антитела F_v представляет собой димер, содержащий домены V_H и V_L.

Фрагмент F(ab')₂ состоит из двух полипептидов типа Fab, связанных вместе посредством дисульфидного мостика между их частями C_{H1}.

ScFV ("одноцепочечный переменный фрагмент" или "одноцепочечное антитело") представляет собой иммунореактивный полипептид, содержащий пептиды V_L и V_H, соединенные вместе посредством гибкого, как правило, гидрофильного связывающего пептида достаточной длины (как правило, длиной приблизительно 15 аминокислот), чтобы позволить ассоциацию V_L и V_H в антигенсвязывающей конфигурации. Одним из распространенных гибких связывающих пептидов является (Gly₄Ser)₃. Необязательно, ассоциацию V_H и V_L можно стабилизировать посредством одной или нескольких межмолекулярных дисульфидных связей.

Как применяют в настоящем документе и как является общеизвестным в данной области, термин "диатело" относится к иммунореактивному полипептиду, содержащему

либо (а) два ScFV, связанные вместе посредством короткого пептида или связи между двумя ScFV (например, между частями V_L) с формированием короткого димерного ScFV,

либо (б) комплекс, содержащий два подобных ScFV полипептида, в которых связывающий пептид является слишком коротким, чтобы позволять прямое взаимодействие между V_L и V_H одной и той же полипептидной цепи, так что две такие молекулы вынуждены вступать в межмолекулярную ассоциацию в форме димера. Два антигенсвязывающих домена диатела могут являться специфическими для одного и того же антигена или двух различных антигенов.

Как применяют в настоящем документе и как является общеизвестным в данной области, термин "триотело" относится к иммунореактивному полипептиду, содержащему три подобных ScFV антигенсвязывающих домена. Структурно, триотело представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей, связанных вместе посредством дисульфидного мостика, в котором первый полипептид содержит ScFV, связанный с дополнительным доменом V_L через полипептидную цепь C_L, и второй полипептид содержит ScFV, связанный с дополнительным доменом V_H через полипептидную цепь C_{H1}. Дисульфидный мостик формируется между остатком Cys в C_L и остатком Cys в C_{H1}, так что дополнительный V_L первого полипептида вступает в ассоциацию с дополнительным V_H второго полипептида в антигенсвязывающей конфигурации, так что триотело в целом включает три антигенсвязывающих домена. Три антигенсвязывающих домена триотела могут являться специфическими для одного и того же антигена или для двух или трех различных антигенов.

На фиг. 1 схематически проиллюстрировано полноразмерное антитело IgG, ScFV, диатело тандемного типа и триотело, как обсуждают выше.

Применение терминов "a" и "an" и "the" и сходных объектов ссылки в контексте описываемого изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует рассматривать как покрывающее как единственное, так и множественное число, если в настоящем документе не указано иначе или явно не противоречит контексту. Термины "включающий", "имеющий", "включающий в себя" и "содержащий" следует рассматривать как неограничивающие термины (т.е., означающие "включающий в себя, но без ограничения"), если не указано иначе. Ссылка на диапазон значений в настоящем документе предназначена просто, чтобы служить в качестве способа сокращения индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если не указано иначе в настоящем документе, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы на него была приведена индивидуальная ссылка в настоящем документе. Все способы, описанные в настоящем документе, можно осуществлять в любом

пригодном порядке, если в настоящем документе не указано иначе или иным образом явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров, или иллюстративных выражений (например, "такой как"), представленных в настоящем документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не устанавливает ограничения на объем изобретения, если в формуле изобретения не заявлено иначе. Никакое выражение в описании не следует рассматривать как указывающее на любой не заявленный в формуле изобретения элемент как на необходимый для практического осуществления изобретения.

Предпочтительно иммунопротективные полипептиды разделяют по меньшей мере приблизительно 50% идентичность последовательности с антигенсвязывающей областью природного (нативного) антигена (например, по меньшей мере приблизительно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, или 99% идентичность последовательности с антигенсвязывающей областью природного антигена). Как применяют в настоящем документе, термины "природное антигено", "нативное антигено" и их грамматические варианты относятся к антигену, специфическому для представляющего интерес патогена или токсина, которое идентифицировано из образца крови субъекта, подвергнутого воздействию патогена или токсина.

Неограничивающие примеры вирусных патогенов, на которые можно нацеливать иммунопротективные полипептиды, продуцируемые IP-MSC, описанными в настоящем документе, включают в себя: аденовирусы; вирусы папилломы; гепаднавирусы (например, гепатит В); парвовирусы; поксвирусы (например, вирус натуральной оспы, вирус осповакцины); вирус Эпштейна-Барр; цитомегаловирус (CMV); вирусы простого герпеса; розеоновирусы; вирус ветряной оспы; филовирусы (например, вирус Эбола и вирус марбургской болезни); парамиксовирусы (например, вирус кори, вирус свинки, вирус Нипах, вирус Хендра, респираторно-синцитиальный вирус (RSV) человека, вирусы парагриппа, вирус болезни Ньюкасла, и метапневмовирус человека); ортомиксовирусы (например, вирусы гриппа А, гриппа В и гриппа С); рабдовирусы (например, лиссавирус, известный также как вирус бешенства); аренавирусы (например, вирус Ласса); коронавирусы (вирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS)); энтеровирусы человека; вирус гепатита А; риновирусы человека; вирус полиомиелита; ретровирусы (например, вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1)); ротавирусы; флавивирусы, (например, вирус лихорадки западного Нила, вирус Денге, вирус желтой лихорадки); гепацивирусы (например, вирус гепатита С); и вирус краснухи.

Неограничивающие примеры бактериальных патогенов, на которые можно нацеливать иммунопротективные полипептиды, продуцируемые IP-MSC, описанные в настоящем документе, включают в себя любые виды патогенных бактерий из рода, выбранного из

Bacillus; Bordetella; Borrelia; Brucella; Burkholderia; Campylobacter; Chlamydia, Chlamydomphila; Clostridium; Corynebacterium; Enterococcus; Escherichia; Francisella; Haemophilus; Helicobacter; Legionella; Leptospira; Listeria; Mycobacterium; Mycoplasma; Neisseria; Pseudomonas; Rickettsia; Salmonella; Shigella; Staphylococcus; Streptococcus; Treponema; Vibrio; и Yersinia.

Неограничивающие примеры паразитических патогенов, на которые можно нацеливать иммунопротективные полипептиды, продуцируемые IP-MSC, описанными в настоящем документе, включают в себя одноклеточных и многоклеточных паразитов, таких как

Acanthamoeba; Anisakis; Ascaris lumbricoides; Balantidium coli; Cestoda (ленточный червь); клещи Trombicula irritans; Cochlomyia hominivorax; Entamoeba histolytica; Fasciola hepatica; Giardia lamblia; кривоголовка; Leishmania; Linguatula serrata; печеночный сосальщик; лоя лоя; Paragonimus (легочный сосальщик); острица; Plasmodium falciparum; Schistosoma; Strongyloides stercoralis, солитер, Toxoplasma gondii; Trypanosoma; власоглав; и Wuchereria bancrofti.

Неограничивающие примеры вирусных антигенов, на которые можно нацеливать иммунопротективные полипептиды, продуцируемые IP-MSC, описанными в настоящем документе, включают в себя: полипептиды вируса гриппа, такие как гемагглютинин 1 (HA1), гемагглютинин 2 (HA2), и нейраминидаза (NA); полипептиды вируса Ласса (LASV), такие как гликопротеин 1 (gp1) LASV, гликопротеин 2 (gp2) LASV, ассоциированный с нуклеокапсидом белок (NP) LASV, белок L LASV и белок Z LASV; полипептиды вируса SARS, такие как белок S вируса SARS; полипептиды вируса Эбола, такие как GP2 вируса Эбола; полипептиды вируса кори, такие как белок слияния 1 (F1) вируса кори; полипептиды HIV-1, такие как трансмембранный белок (TM) HIV, гликопротеин 41 (gp41) HIV, гликопротеин 120 (gp120) HIV; полипептиды вируса гепатита С (HCV), такие как гликопротеин 1 оболочки (E1) HCV, гликопротеин 2 обо-

лочки (E2) HCV, белок нуклеокапсида (p22) HCV; полипептиды вируса лихорадки западного Нила (WNV), такие как гликопротеин оболочки (E) WNV; полипептиды вируса японского энцефалита (JEV), такие как гликопротеин оболочки (E) JEV; полипептиды вируса желтой лихорадки (YFV), такие как гликопротеин оболочки (E) YFV (E); полипептиды вируса клещевого энцефалита (TBEV), такие как гликопротеин оболочки (E) TBEV; полипептиды вируса гепатита G (HGV), такие как гликопротеин 1 оболочки (E1) HGV; полипептиды респираторно-синцитиального вируса (RSV), такие как белок слияния (F) RSV; полипептиды вируса простого герпеса (HSV), такие как белок gD HSV-1, белок gG HSV-1, белок gD HSV-2 и белок gG HSV-2; полипептиды вируса гепатита В (HBV), такие как коровый белок HBV; и полипептиды вируса Эпштейна-Барр (EBV), такие как гликопротеин 125 (gp125) EBV.

Неограничивающие примеры бактериальных антигенов, на которые можно нацеливать иммунопротективные полипептиды, продуцируемые IP-MSC, описанными в настоящем документе, включают в себя: бактериальный фактор сборки белка наружной мембраны BamA; бактериальный белок модуля сборки и транслокации TamA; белок ассоциированного с транспортом полипептидов белкового домена; бактериальный поверхностный антиген D15 из широкого множества видов бактерий; полипептиды *Bacillus anthracis*, такие как защитный белок сибирской язвы, летальный фактор сибирской язвы и отечный фактор сибирской язвы; полипептиды *Salmonella typhi*, такие как S1Da и S1Db; полипептиды *Vibrio cholerae*, такие как токсин холеры и белок теплового шока холеры; полипептиды *Clostridium botulinum*, такие как антиген S и ботулинический токсин; и полипептиды *Yersinia pestis*, такие как F1, антиген V, YopH, YopM, YopD и фактор активации плазминогена (Pla).

Неограничивающие примеры паразитических антигенов, на которые можно нацеливать иммунопротективные полипептиды, продуцируемые IP-MSC, описанными в настоящем документе, включают в себя: полипептиды возбудителя малярии (*Plasmodium*), такие как белок циркумспорозита (CSP), поверхностный белок спорозита (SSP2/TRAP), антиген 1 печеночной стадии (LSA1), экспортируемый белок 1 (EXP 1), связывающий эритроциты антиген 175 (EBA-175), богатый цистеином защитный антиген (сyRPA) и белок теплового шока 70 (hsp70) *Plasmodium*; и полипептиды *Schistosoma*, такие как Sm29 и белок передачи сигнала 14-3-3.

Предпочтительно IP-MSC вводят парентерально (например, внутривенной, подкожной, или внутримышечной инъекцией или инфузией). IP-MSC можно составлять в форме раствора, суспензии или эмульсии в ассоциации с фармацевтически приемлемым носителем (например, стерильной водой, солевым раствором, раствором декстрозы, фосфатно-солевым буфером и сходными материалами, пригодными для введения живых стволовых клеток). Необязательно, добавки, поддерживающие изотоничность (например, маннит) или химическую стабильность (например, консерванты), можно включать в носитель.

Как применяют в настоящем документе, "терапевтически эффективная доза" представляет собой количество (например, количество IP-MSC), такое, что при введении, IP-MSC приводят к уменьшению или прекращению уже присутствующих симптомов заболевания (например, от приблизительно одной сотни тысяч до приблизительно одной сотни миллионов клеток). Дозу и количество доз (например, однократной или множественных доз), вводимые субъекту, можно менять в зависимости от множества факторов, включая способ введения, состояние и характеристики пациента (пол, возраст, масса тела, состояние здоровья, рост), степень симптомов, сопутствующее лечение, частоту обработок и желательный эффект, идентичность и количество антигенных полипептидов, экспрессируемых IP-MSC, и т.п. Коррекция установленных режимов дозирования и манипуляция с ними, так же как способы *in vitro* и *in vivo* определения терапевтической эффективности IP-MSC для индивидуума, находятся полностью в компетенции специалиста в области медицины.

"Профилактическая доза" представляет собой количество (например, количество IP-MSC), такое, что при введении, MSC предотвращают инфекцию патогена, из которого происходит полипептид, экспрессируемый IP-MSC (например, от приблизительно одной сотни тысяч до приблизительно одной сотни миллионов клеток). Дозу и количество доз (например, однократной или множественных доз), вводимые субъекту, можно менять в зависимости от множества факторов, включая способ введения, состояние и характеристики пациента (пол, возраст, масса тела, состояние здоровья, рост), степень симптомов, сопутствующее лечение, частоту обработок и желательный эффект, идентичность и количество антигенных полипептидов, экспрессируемых IP-MSC, и т.п. Коррекция установленных режимов дозирования и манипуляция с ними, так же как способы *in vitro* и *in vivo* определения профилактической эффективности IP-MSC для индивидуума, находятся полностью в компетенции специалиста в области медицины.

Как применяют в настоящем документе, термин "эписомально трансфицированный" и его грамматические варианты относятся к не интегрирующей трансфекции экзогенной эписомальной ДНК (например, плазмидой или другим эписомальным вектором) для получения клеток с неизменной хромосомной ДНК, в которых полипептид, кодируемый ДНК, экспрессируется в эписоме внутри MSC, т.е., без геномной интеграции экзогенной ДНК. Как применяют в настоящем документе, термин "эписома" и его грамматические варианты относятся к замкнутым кольцевым молекулам ДНК, которые реплицируются в ядре, и предназначен для включения экзогенных плазмид, введенных в MSC. Предпочтительно первичные MSC трансфицируют плазмидой, которая кодирует антигенный полипептид, и предпочтительно,

кодирует также регуляторные элементы (например, промотор) для облегчения эписомальной экспрессии антигенного полипептида. Необязательно, MSC также можно эписомально трансфицировать геном индуцируемого апоптоза для индукции гибели клеток (апоптоза) при активации подходящим сигналом (например, с использованием контролируемой тетрациклином активации транскрипции, обозначаемой также как "Тет-вкл. и Тет-выкл", в которой тетрациклин или доксицилин используют для включения транскрипции апоптотического гена), так что IP-MSС можно уничтожать у субъекта, если желательно или необходимо (например, если развиваются нежелательные побочные эффекты). Термин "эписомальный вектор" относится к экспрессирующему вектору, содержащему плазмиду или другую кольцевую ДНК, кодирующую антигенный полипептид.

Первичные MSC можно эписомально трансфицировать любым пригодным способом. Например, первичные MSC можно трансфицировать плазмидой, кодирующей антигенный полипептид с использованием электропорации, липофекции и т.п. Электропорация является предпочтительным способом трансфекции, в отличие от других способов трансфекции с использованием катионных липидов (т.е. липофекции) поскольку могут присутствовать остаточные липиды после трансфекции, которые могут быть не полностью удалены при обработке MSC для доставки, и могут приводить к непредвиденным побочным эффектам.

Неограничивающие примеры эписомальных векторов, пригодных для использования в качестве неинтегрирующих векторов для трансфекции эукариотических клеток (например, первичных MSC), включают в себя векторы на основе вируса обезьян 40, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, векторы на основе вируса папилломы, векторы на основе вируса ВК и т.п., которые хорошо известны в области молекулярной генетики.

В настоящем документе описан также способ лечения или предотвращения патогенного заболевания или облегчения воздействия токсина с использованием IP-MSС, описанных в настоящем документе. Один из вариантов осуществления способа включает в себя стадии: необязательно, идентификации нейтрализующих антител против патогена или токсина, идентифицированных из образца крови от одного или нескольких переживших патогенное заболевание или воздействие токсина; трансфекции первичных мезенхимальных стволовых клеток одним или несколькими эписомальными векторами, кодирующими по меньшей мере два иммунореактивных полипептида, содержащих антигенсвязывающую область нейтрализующего антитела, специфического для патогена или токсина (например, антитела, идентифицированного на стадии (а)), или кодирующими вариант антигенсвязывающей области, для получения IP-MSС, экспрессирующих иммунореактивные полипептиды; и введения IP-MSС субъекту, подверженного воздействию или подверженного риску воздействия патогена или токсина. Вариант, если его используют, включает одну или несколько замен в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей области, предпочтительно, разделяет по меньшей мере 50% идентичность последовательности с антигенсвязывающей областью нейтрализующего антитела.

Отбор и дизайн антител и иммунных молекул

Усовершенствованные способы транспорта иммунных молекул от переживших воздействие патогенных агентов или токсинов

Выделение и криоконсервация мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из образцов крови должны сохранять целостность настолько многих В-клеток, насколько это практично, для обеспечения в конечном счете выделения и характеристики часто встречающихся и редких специфичностей. В качестве подтверждения концепции, выздоравливающих пациентов с лихорадкой Ласса (LF) в центрах клинических исследований Западной Африки (Kenema Government Hospital, Sierra Leone и Irrua Specialist Teaching Hospital, Nigeria) идентифицируют с использованием современной иммунодиагностики на основе рекомбинантных белков. Цельную кровь отбирают при полностью информированном согласии, и PBMC выделяют в специально отведенных и полностью оборудованных помещениях для культивирования клеток. PBMC подвергают криоконсервации с использованием разработанных буферов (RPMI/20%FBSΔ/10%DMSO) и способов (скорость охлаждения приблизительно $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до конечной температуры приблизительно -80°C , $>5 \times 10^6$ клеток/флакон), с которыми получают высоко жизнеспособные культуры клеток после размораживания. Образцы быстро транспортируют в США в одобренных IATA криогенных контейнерах для дальнейшей переработки. Количество и процент В-клеток перед криоконсервацией оценивают на месте количественной проточной цитометрией (с помощью высокопортового цитометра BD ACCURIC6), посредством определения общего количества PBMC, и конкретно, В-клеток ($\text{CD}19^{+}$, $\text{CD}20^{+}$), Т-клеток ($\text{CD}3^{+}$, $\text{CD} 4^{+}$, $\text{CD} 8^{+}$), NK-клеток ($\text{CD}16^{+}$, $\text{CD}56^{+}$) и моноцитов ($\text{CD}14^{+}$, $\text{CD}16^{+}$), для каждой процедуры выделения. Процедуру повторяют после размораживания для определения доли потерь PBMC и подгрупп клеток. Сходные способы можно использовать для идентификации других антител, например, антител против гриппа, продуцированных PBMC от субъектов с документированными недавними инфекциями. Когда это целесообразно, как при гриппе, криоконсервацию можно обходить, позволяя выделение В-клеток из свежееотобранной крови.

Способы быстрого определения микробиома у индексированных пациентов, выздоравливающих после воздействия патогена или токсина

Чтобы продемонстрировать, что платформу доставки генов MSC можно быстро привести в действие в качестве барьера для группы высокого риска (участники военных действий, служб экстренного реагирования и т.д.) против высоко трансмиссивного заболевания, новый патоген, идентифицированный в Сьерра-Леоне или Нигерии, используют в качестве модели. Это близко воспроизводит или имитирует сценарий для пациента, доступного через приблизительно 2-3 недели после воздействия патогена или токсина (например, известного или неизвестного происхождения), так же как для преднамеренно распространенных или случайно распространенных патогенов или токсинов.

Метагеномика микроорганизмов, несмещенная характеристика нуклеиновых кислот микроорганизмов, может быстро идентифицировать инфекционные патогены у пациентов, выздоравливающих после неизвестных биологических угроз. Микроорганизмы, присутствующие в клинических образцах, как правило, идентифицируют посредством культивирования или посредством направленных молекулярных способов, таких как PCR или связывание антигена. Культивирование занимает много времени, и многие микроорганизмы просто невозможно культивировать *in vitro*. Направленные способы обладают также недостатками, поскольку они требуют заведомого знания организма. Приблизительно 30% считываний для микроорганизмов в образцах для лихорадки неясного происхождения (FUO) из Сьерра-Леоне и Нигерии не имеют совпадений в базе данных GENBANK. Технология, описанная в настоящем документе, является чувствительной (т.е., способной к детекции низкокопийного патогена в разнообразной смеси эндогенных микроорганизмов) и масштабируемой (т.е., способной к быстрому исследованию больших количеств образцов от пациентов). Улучшенные молекулярные способы конструирования библиотек для секвенирования Illumina разработаны с использованием субнанограммовых количеств РНК. Современные способы конструирования библиотек масштабированы, так что сотни образцов можно перерабатывать параллельно. Разработан биоинформатический информационный канал, по которому можно быстро идентифицировать все микроорганизмы, присутствующие в массивах данных секвенирования нового поколения. При наличии этих способов, полный геном собирают для неизвестного вируса в течение приблизительно 2 суток, и для неизвестной бактерии в течение приблизительно 4 суток.

Компьютерные программы для определения вирулентных детерминант патогена (например, гликопротеинов для вхождения вируса или токсинов). Вирулентные факторы относятся к белкам (т.е., продуктам генов), которые позволяют микроорганизму развиваться у человека и усиливают его потенциал для вызова заболевания. Разработан биоинформатический и компьютерный информационный канал, по которому можно быстро идентифицировать вирулентные факторы ранее неизвестных организмов из больших метагеномных наборов данных, который задействует несколько публично доступных баз данных вирулентных факторов (MvirDB, Tox-Prot, SCORPION, вирулентные факторы PRINTS, VFDB, TVFac, Islander, ARGO и подгруппа VIDA) и позволяет быструю (в пределах нескольких часов) идентификацию вирулентных факторов для вновь включенных данных геномной последовательности. Проводят эксперименты для подтверждения способности программы правильно идентифицировать вирулентные факторы, на которые можно нацеливать защитные антитела.

Защитные антитела

В-клетки обогащают посредством истощения не относящихся к В клеток из PBMC с использованием сепаратора MACS (Miltenyi Biotec) и магнитных бусин, покрытых, например, α CD2, CD4, CD11b, CD16, CD36, α IgE, CD235a и т.п. Антигенспецифические циркулирующие В-клетки памяти, которые связываются с мечеными флуорохромом рекомбинантными вирулентными детерминантами (например, GP LASV или гемагглютинином вируса гриппа, HA) сортируют посредством проточной цитометрии и депонируют непосредственно в 96-луночных планшетах при плотности отдельных клеток. РНК выделяют из отдельных клеток (Norgen Biotek, Qiagen) и подвергают обратной транскрипции в кДНК, с последующей амплификацией тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Разработанные на заказ олигонуклеотиды позволяют прямое клонирование генов тяжелых и легких цепей в запатентованные векторы для экспрессии полностью человеческих моноклональных антител (CHOLCelect™, Патент США US 8076102, Luis M Branco et al., полное содержание которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки) или реконструирование в форме одноцепочечных антител, диател или триотел для быстрой экспрессии и очистки из культур *E. coli*. ELISA для связывания с вирулентными детерминантами (GP или HA) или анализы нейтрализации патогена (на основе псевдочастиц) используют для быстрой идентификации потенциально защитных антител. Антитела с желательными свойствами клонируют в поликлональный экспрессирующий вектор, описанный в настоящем документе, и тестируют в качестве отдельных специфичностей в анализах нейтрализации живого вируса для верификации активности в более подходящей биологической системе *in vitro*.

Способы избегания формирования химерных неправильно отсортированных антител

Для обеспечения разработки наиболее широко применимой, защитной и устойчивой к ускользающим мутантам платформы осуществляют дизайн олигоклонального антитела. С этой целью каждое антитело, проявляющее нейтрализующие свойства желательным образом, тестируют в форме полноразмер-

ных и одноцепочечных (ScFV) вариантов. Многие ScFV сохраняют свойства исходных полноразмерных IgG благодаря точному представлению критических антигенсвязывающих CDR. Альтернативно, комбинации диател и триотел можно включать в платформы экспрессирующих векторов для терапевтического применения. Этот способ олигоклональных IgG/ScFV может предотвращать формирование неподходящим образом смешанных тяжелых и легких цепей, когда более одного антитела экспрессируют в отдельной MSC. В некоторых вариантах осуществления, желательного уровня терапевтической активности достигают посредством интеграции нескольких ScFV и одного полноразмерного антитела, для которого можно идентифицировать эффекторные функции, или которое теряет активность при переводе в одноцепочечный вариант.

Отбор и дизайн конструкций нуклеиновой кислоты

Дизайн вектора для обеспечения достаточных уровней и длительности экспрессии для защиты против заражения. Многокопийную, неинфекционную, не интегрирующую, кольцевую эписому используют для экспрессии защитных полностью человеческих одноцепочечных фрагментов антител, полноразмерных IgG или других иммунореактивных полипептидов против множества (потенциально сотен) бактериальных, вирусных, грибковых или паразитических белков или белковых токсинов одновременно (см. фиг. 1, на которой проиллюстрированы иммуномодуляторы типа IgG, ScFV, диатела и триотела). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, эписома основана на компонентах, полученных из экспрессирующей кассеты ядерного антигена 1 (EBNA1) и точки начала репликации OriP вируса Эпштейна-Барр (EBV). Это предпочтительно является единственными компонентами EBV, которые используют, так что вирусы не реплицируются или не собираются. Эта система приводит к стабильной внехромосомной персистенции и длительной эктопической экспрессии гена в мезенхимальных стволовых клетках. В способах, описанных в настоящем документе, ScFV или другие иммунореактивные полипептиды эффективно экспрессируют в MSC и секретируют из MSC в защитных количествах. Полноразмерное нейтрализующее LASV антитело в hADMSC экспрессировали в качестве подтверждения концепции. Способность основанных на EBV эписом вводить и поддерживать очень большие фрагменты геномной ДНК человека (>300 т.п.о.) в клетках человека является другим значительным преимуществом способов, описанных в настоящем документе. Этот признак позволяет клонирование десятков экспрессирующих элементов в вектор, способный к репликации в бактериях, поддающийся крупномасштабной очистке, трансфекции в hMSC и репликации в форме эписомальной плазмиды. Целевые уровни экспрессии иммунореактивных полипептидов (например, ScFV) составляют приблизительно 10 пг/клетку/сутки для каждого иммунореактивного полипептида, с предпочтительными уровнями экспрессии 5 пг/клетку/сутки. Инфузией приблизительно 1×10^{11} MSC с производительностью 10 пг/клетку/сутки для каждого иммунореактивного полипептида получают приблизительно 1 грамм растворимого полипептида в сутки, эквивалент уровня 15 мг/мл в кровотоке взрослого массой 75 кг, что является пригодным уровнем терапевтического дозирования. Промоторы и другие регуляторные элементы используют для управления экспрессией каждого типа иммуномодулирующих молекул.

Несколько сообщений в литературе указывают на неклассический характер экспрессии с хорошо охарактеризованных промоторов в MSC. Промотор главного немедленного раннего гена цитомегаловируса человека (CMV-MIE) является одним из наиболее сильных известных промоторов, и главным элементом в получении продуцирующих множество грамм на литр рекомбинантного белкового лекарственного средства стабильных линий клеток млекопитающих. CMV-MIE, однако, относительно плохо транскрибируется в MSC. В отличие от этого, для промоторов EF1A, UBC и CAGG показаны высокие уровни экспрессии в MSC без очевидных признаков выключения промотора. Эписомальные векторы, используемые в способах, описанных в настоящем документе, могут включать любые такие промоторы. На фиг. 2, панель А, представлена схематическая иллюстрация репрезентативного и неограничивающего примера эписомального вектора pEBV для MSC. Экспрессирующие векторы без маркеров селекции с антибиотиком также представлены для размножения плазмид в E.coli. Характер репликации эписомальной плазмиды предотвращает ее линеаризацию рестрикционной эндонуклеазой, нарушающую открытую рамку считывания гена устойчивости к антибиотику. Таким образом, можно предположить, что генетические перестройки могут приводить к экспрессии гена устойчивости к антибиотику, потенциально вызывая опосредованные нежелательной устойчивостью к антибиотику побочные эффекты у человека в избранных случаях.

Этот сценарий можно предотвращать заменой генов устойчивости к антибиотику на метаболические селективные маркеры для роста и размножения плазмид в штаммах E.coli, если необходимо или желательно.

Дизайн регуляторных элементов для целевых уровней экспрессии индивидуальных терапевтических молекул и выключения

Регуляторные элементы в векторе используют для обеспечения желательных секретируемых уровней и уровней в сыворотке каждой представляющей интерес иммуномодулирующей молекулы. Экспрессия полноразмерных антител, ScFV, или других иммунореактивных полипептидов получает преимущество от сильных промоторов (например, CMV, EF1A, CAGG и т.д.) для достижения терапевтических

уровней в сыворотке в течение менее чем одних суток после введения MSC. Другие иммуномодулирующие молекулы, такие как цитокины, часто экспрессируют и секретируют на низких уровнях и временно посредством MSC. Для обеспечения требуемой гибкости различных уровней и временных интервалов экспрессии такими генами управляют со слабых базальных промоторов (т.е. ТК), или посредством контролируемой индукции с промотора Tet вкл./выкл. Система промоторов Tet получает преимущество от использования безвредных аналогов антибиотика, таких как ангидротетрациклин, который активирует промотор Tet в концентрациях на 2 log ниже концентрации тетрациклина, не приводит к нарушению регуляции кишечной флоры, не приводит к устойчивости к поликетидным антибиотикам и не проявляет активности антибиотика. Ангидротетрациклин является полностью растворимым в воде, и его можно вводить в питьевых рационах для стимуляции активации выбранных генов в трансфицированных MSC. Потенциальную токсичность ангидротетрациклина, первого продукта распада тетрациклина в организме человека, можно обойти введением других аналогов, таких как доксицилин, одобренный FDA аналог тетрациклина, который также активирует систему промоторов Tet вкл./выкл. Эту систему предпочтительно используют в дизайне предохранительного "аварийного отключения" посредством точной регуляции индуцируемой экспрессии сильного проапоптозного проапоптозного гена (например, Bax) для инициации направленного апоптоза трансфицированных MSC в случае нежелательных побочных эффектов, или когда достигают желательной терапевтической конечной точки. Недавние усовершенствования в системе Tet-вкл. привели к намного улучшенной репрессии подтекания промотора и способности отвечать на Dox в концентрациях вплоть до 100 раз более низкой, чем в исходной системе Tet (Tet-On Advanced™, Tet-On 3 G™). Маркеры селекции с лекарственным средством не используют для сохранения стабильности вектора в трансфицированных MSC: векторы на основе EBV, которые, как известно, реплицируются и сохраняются в дочерних клетках в соотношении 90-92% на клеточный цикл.

Исследования безопасности/иммуногенности вектора

Поскольку эписомы не продуцируют реплицирующиеся вирусы, и клетки, в которых они экспрессируются, не продуцируют молекул МНС в каких-либо значительных количествах, эписомы не приводят к вызванному вектором иммунитету, который может предотвращать последующее использование платформы у индивидуума. Это можно подтвердить разработкой чувствительного анализа для детекции иммунных ответов (ELISA антител и анализы на основе Т-клеток) на компоненты, полученные из экспрессирующей кассеты ядерного антигена 1 вируса Эпштейна-Барр (EBV), и на фон MSC (типирование HLA). Проводят генетические исследования для исследования частоты интеграции EBV в хромосому клетки-хозяина (FISH, Саузерн-блоттинг, qPCR) и для измерения временного характера репликации вектора. Сообщают, что векторы EBV сохраняют приблизительно 90-92% репликации на клеточный цикл в отсутствие селективного маркера. Уменьшающаяся частота репликации вносит вклад в вывод вектора из системы хозяина. Компартиментализацию инъектированных MSC оценивают у нечеловекообразных приматов (NHP) посредством отслеживания флуоресцентно меченных клеток, предварительно нагруженных проникающими через мембрану клеток красителями (зеленым CMFDA, оранжевым CMTRM), которые после эстерификации не могут больше пересекать липидный бислой и становятся высоко флуоресцентными. Такие измерения проводят на свежеприготовленных срезах тканей (лимфатические узлы, печень, селезенка, мышцы, головной мозг, поджелудочная железа, почка, кишечник, сердце, легкое, глаз, ткани репродуктивных органов самцов и самок) или посредством сканирования всего тела. Дополнительные срезы тканей перерабатывают для выделения ДНК и РНК для анализа последовательностей вектора и соответствующих транскриптов. Дизайн олигонуклеотидов, специфических для каждого иммунореактивного полипептида, цитокина и выключающего транскрипта, позволяет оценку индивидуальной экспрессии гена во всех тканях. Некоторые промоторы более активно транскрибируются в некоторых тканях, чем другие, что требует оценки как предпочтительной локализации MSC в периферических тканях после инъекции, так и заселения MSC и соответствующей транскрипционной активности рекомбинантных генов. С этой целью можно включать две искусственные нуклеиновые кислоты - метки "штрих-кодов", одну специфическую для управляемых Tet вкл./выкл. транскриптов РНК, и другую для эписомальной векторной ДНК. Эти метки позволяют быструю идентификацию самых уникальных последовательностей среди фона генома и транскриптома NHP и человека (см. фиг. 2).

Выбор и дизайн способа доставки

MSC в качестве носителей для временной доставки терапевтических молекул

MSC поддаются крупномасштабной электропорации, с вплоть до 90% эффективностью. MaxCyte, Inc. (Gaithersburg, MD) продает на рынке систему крупномасштабной трансфекции "MaxCyte® VLX™, компактное, простое в использовании устройство, специально разработанное для временной трансфекции в необычайно большом объеме в стерильном, закрытом окружении для трансфекции. С использованием технологии проточной электропорации, в MAXCYTE VLX можно трансфицировать вплоть до приблизительно 2×10^{11} клеток менее, чем приблизительно за 30 мин, с высокой жизнеспособностью клеток и эффективностью трансфекции в стерильном, закрытом окружении для трансфекции. Эту соответствующую cGMP систему можно использовать для быстрой продукции рекомбинантных белков, от лабораторного масштаба до пилотных испытаний и коммерческого производства с cGMP". MSC можно выращи-

вать в средах химически определенного состава (CD), в окружении для крупномасштабного культивирования клеток. Недавние усовершенствования в биотехнологической инженерии привели к быстрой разработке составов CD, поддерживающих крупномасштабное размножение MSC без потери плюрипотентных характеристик и с сохранением генетической стабильности. Происходящие из жировой ткани MSC можно легко получать при процедурах липосакции, со средним получением от процедуры приблизительно 1×10^8 MSC, таким образом, обеспечивая достаточное количество для размножения *ex vivo* перед помещением в банк (приблизительно 25 удвоений, $>3 \times 10^{15}$ клеток) с оставшимися продолжительностью жизни и количеством удвоений (приблизительно 25), достаточными для обеспечения экспрессии и доставки терапевтических молекул *in vivo* в течение нескольких недель после инфузии. Для MSC обычно показывают скорости удвоения в диапазоне 48-72 ч, таким образом, потенциально обеспечивающие продолжительность жизни *in vivo* в диапазоне 50-75 суток. Скорость оборота MSC после инфузии можно оценивать посредством измерения циркулирующих уровней трансгенных продуктов и посредством детекции последовательностей EBV посредством qPCR в крови, назальных аспиратах и моче у человека. По существу полного уничтожения MSC после желательного терапевтического промежутка времени можно достигать индукцией самоуничтожения посредством контролируемой индуцируемой экспрессии проапоптотических генов, встроенных в экспрессирующий вектор. Можно оценивать также уровни циркулирующих происходящих из MSC иммунореактивных полипептидов или других иммуномодуляторов после инъекции и индуцированные вектором аутоиммунитет или ответы GVHD у NHP. У человека можно измерять дополнительные маркеры, ассоциированные с аутоиммунными или аллогенными иммунными ответами, такие как биомаркеры повреждения печени (ALT, AST), маркеры функции печени (ALB, BIL, GGT, ALP и т.д.) и почек (BUN, CRE, мочевины, электролиты и т.д.).

Выделение, характеристика и помещение в банк MSC для терапевтического применения

Отсутствие экспрессии антигенов лимфогематопоэтической линии отличает MSC от гематопоэтических клеток, эндотелиальных клеток, предшественников эндотелиальных клеток, моноцитов, В-клеток и эритробластов. Первичные MSC не являются иммортализованными и таким образом, подвержены "пределу Хейфлика" приблизительно 50 делений для первичных клеток. Тем не менее, способность размножения является аномальной, где одна клетка способна продуцировать вплоть до приблизительно 10^{15} дочерних клеток. Кроме того, MSC обладают низкой изменчивостью от партии к партии. Клеточные банки размеров, обеспечивающих возможность для быстрой защиты миллионов подверженных риску индивидуумов, можно получать пулированием больших количеств подвергнутых предварительному скринингу происходящих из жировой ткани доноров MSC:

100 доноров при 1×10^8 клеток/донора $\times 25$ поколений *ex vivo* = приблизительно 3×10^{17} клеток;

при приблизительно 1×10^{11} клеток/инфузии = приблизительно 3 млн доз.

Два способа можно использовать для получения терапевтических банков MSC:

(1) выделение, размножение, тестирование, помещение в банк, с последующей трансфекцией, выделением и введением и

(2) выделение, размножение, тестирование, трансфекция, помещение в банк для получения готовых для введения клеток после размораживания и короткого восстановления.

Для характеристики, исходный банк клеток можно тестировать на стерильность, микоплазму, проводить тестирование занесенных агентов *in vitro* и *in vivo*, тестирование ретровирусов, идентичности клеток, электронную микроскопию и ряд специфических для вирусов анализов PCR (FDA требует 14 в нормативных документах 1993 и 1997, и этот список пополнен на несколько дополнительных рекомендованных вирусов, в основном, вирусов полиомы). При потенциальном начальном использовании сыровотки в условиях первичного культивирования, тестирование можно проводить для панели бычьих вирусов 9CFR. Если клетки приводят в контакт со свинными продуктами в ходе обычных манипуляций, также предпочтительно проводят тестирование на свинные вирусы.

Фармакокинетика/фармакодинамика (PK/PD)

Одним из ограничений использования MSC для репарации ткани являлась неспособность клеток к постоянной колонизации органов после размножения *ex vivo* и повторной инъекции лицу, от которого они произошли. MSC циркулируют в течение ограниченного периода времени (например, нескольких недель или месяцев), независимо от того, инъекционаны ли совпадающим или несовпадающим по MHC индивидуумам. Этот конкретный недостаток в разработке универсальной платформы доставки генов во взрослых MSC является преимуществом в способах, описанных в настоящем документе. Фармакокинетический (PK) профиль каждого трансгена, экспрессированного в трансфицированных MSC, можно оценивать у NHP для каждой разработанной сконструированной платформы вектора для доставки. Одно исследование PK однократной дозы желательно проводить на яванских макаках, с трансфицированными MSC, введенными IV. В таком исследовании каждой из 2 самцов и 2 самок обезьян внутривенно (*i.v.*) вводят высокую дозу (приблизительно 10^{11} клеток), промежуточную дозу (приблизительно 10^8 клеток) и низкую дозу (приблизительно 10^5 клеток) MSC. Конечные точки, подлежащие оценке, включают в себя: наблюдение у клетки, массу тела, количественную оценку потребления пищи, офтальмологию, электрокардиограмму, клиническую патологию (например, гематологию, химические реакции, свертывание,

анализ мочи); иммунологию (например, иммуноглобулины и периферические лейкоциты, такие как В-клетки, Т-клетки и моноциты); иммуногенность; макропатологию (например, некропсию и массу выбренных органов); гистопатологию; связывание с тканями; и фармакокинетику. Концентрации в сыворотке каждого рекомбинантного антитела можно мониторировать в течение 9 недель с помощью количественного ELISA сэндвич-типа, в котором используют специфические для антитела реагенты для связывания и детекции (меченные HRP анти-id) на сутки 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 и 63. Анализы ПК можно проводить независимыми от модели способами с использованием программного обеспечения WINNONLIN (Pharsight Corp.). Фамакокинетические параметры для каждого антитела можно выражать как максимальную концентрацию в сыворотке ($C_{\text{макс}}$), нормализованную по дозе концентрацию в сыворотке ($C_{\text{макс}}/D$), площадь под кривой зависимости концентрации от времени, от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), нормализованную по дозе площадь под кривой зависимости концентрации от времени, от времени 0 до бесконечности ($AUC_{0-\infty}/D$), общее выведение из организма (CL), объем распределения в стационарном состоянии (V_{ss}), кажущийся объем распределения в терминальной фазе (V_z), время полужизни в терминальной фазе элиминации ($t_{1/2, \text{термин}}$) и среднее время удержания (MRT). Периферическую циркуляцию и компартментализацию инъецированных MSC можно оценивать у NHP посредством отслеживания флуоресцентно меченных клеток, предварительно нагруженных проникающими через мембрану клеток красителями CMFDA или CMTMR, как описано выше, на свежеприготовленных срезах тканей или посредством сканирования всего тела. Последовательности векторной ДНК и транскриптов можно мониторировать посредством qPCR, как описано выше.

Возможность повторного использования

Существует обширный объем литературы, описывающей отсутствие отторжения MSC *in vivo*. Тем не менее, этот феномен можно оценивать у NHP с помощью многократных инъекций сингенных MSC, модифицированных с помощью гомологичных и гетерологичных ДНК-векторов, с последующим получением иммунологического профиля аллогенных ответов. Например, одной группе NHP можно инъецировать болус сингенных MSC, трансфицированных эписомальным вектором, экспрессирующим антитела против LASV, и другой - сходным вектором, экспрессирующим антитела против вируса гриппа. Имунный ответ на платформу MSC и на компоненты вектора можно оценивать еженедельно в течение 77 суток, в ходе которых любой иммунологический ответ должен поддаваться детекции.

Безопасность и иммуногенность у NHP после активации механизма выключения посредством введения доксицилина или других аналогов тетрациклина можно оценивать сходным образом. После режима введения доксицилина, неблагоприятные иммунологические ответы на компоненты вектора и платформу доставки MSC можно оценивать сходным образом, например, сначала полусуточно в течение первых 2 недель, затем еженедельно в течение дополнительных 77 суток. Дополнительные маркеры апоптотической гибели клеток можно отслеживать посредством разработанных анализов, таких как увеличенный уровень лактатдегидрогеназы (LDH) и каспазы в сыворотке, и фосфатидилсерина (PS) в циркулирующих MSC. Если иммунологический ответ на вектор и MSC не поддается детекции после этого 77-суточного периода, NHP можно проводить повторную инъекцию гомологичными MSC, в одной группе MSC, трансфицированными гомологичным вектором, в то время как в другой группе можно вводить гетерологичный ДНК-вектор. Гомологичные и гетерологичные векторы могут иметь один тот же фон, но с различными репертуарами рекомбинантных антител. Этим способом можно показать иммуногенность против MSC и экспрессирующего ДНК-вектора, независимо от репертуара рекомбинантных антител. Срок 77 суток для оценки иммунологических реакций против платформы MSC выбран на основании токсикокинетических исследований множественных доз с антителами человека у яванских макаков, показывающих среднее 5000-кратное уменьшение пиковых уровней в сыворотке рекомбинантного антитела, введенного при 10 мг/кг в пределах этих временных рамок. В таких исследованиях у некоторых NHP могут развиваться ответы против антител человека около 50-60 суток после первого введения, в то время как у некоторых животных может никогда не развиваться поддающийся детекции гуморальный ответ на гетерологичные IgG.

Транспорт MSC

Желательно, чтобы MSC можно было транспортировать в устройстве, позволяющем транспорт по тепловой цепи (37°C) генетически модифицированных MSC, позволяющем исключение транспорта по холодной цепи, с увеличенной емкостью для образца и технологиями мониторинга клеток, таком как устройства из MicroQ Technologies. Эти устройства поддерживают точные теплые температуры от приблизительно 24 до приблизительно 168 ч, таким образом, обеспечивая достаточное время для распределения готового к употреблению лекарственного средства в любую точку мира. Можно вводить дополнительную емкость для хранения и транспорта инкапсулированных клеток, и капсулы, способные поддерживать газообмен, по необходимости. Время, затраченное от инкапсуляции до введения, может являться причиной метаболических изменений в IP-MSC, скорости роста клеток, изменений жизнеспособности и любых дополнительных изменений продукта, которые могут влиять на производительность.

Демонстрация временного защитного иммунитета

Исследования заражения макаков после инфузии MSC, экспрессирующими защитные антитела. *Su-potolgus msaques* подвергали инфузии MSC макака, экспрессирующими одноцепочечные антитела против GP LASV, затем заражали посредством ИМ инъекции 1000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) вируса LASV (штамма Josiah) и оценивали, как описано Geisbert et al. Животных, обладающих клиническими признаками, соответствующими терминальной LF, подвергали эвтаназии. После заражения биологические образцы перерабатывали для измерения вирусности посредством анализа бляшек и RT-PCR. Вирусную РНК секвенировали для идентификации того, возникают ли специфические мутации в гене GPC после терапии у NHP. Для любого животного, погибшего от заражения, множество биологических образцов, включая ткани, кровь и другие жидкости организма, отбирали для гистопатологии, иммуногистохимии, выделения вируса и геномной детекции. Выживших макаков мониторировали по гуморальным ответам на вирусные антигены посредством проведения серий анализов Вестерн-блоттинга и ELISA для детекции доказательств какого-либо ответа антител на главные вирусные структурные белки (G1, G2, NP, Z). Сходные исследования с конструкциями MSC, экспрессирующими защитные антитела против вируса гриппа, используют для исследований заражения человека.

Следующие неограничивающие примеры представлены для иллюстрации конкретных признаков и аспектов IP-MSC и способов, описанных в настоящем документе.

Пример 1. Нейтрализующие антитела против вируса Ласса (LASV).

Приблизительно тридцать миллилитров цельной крови отбирали у взрослых, выживших после подтвержденной лихорадки Ласса (LF) из Сьерра-Леоне, не ранее чем через 8 недель после выписки из больницы и вплоть до нескольких месяцев после выздоровления. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образцов крови посредством центрифугирования в градиенте фиколла, подвергали криоконсервации и транспортировали в сухих транспортных контейнерах в Соединенные Штаты. Культуры PBMC рассеивали с низкой плотностью в 96-луночные планшеты и стимулировали R8 48 и интерлейкином-2 (IL-2) для поликлональной активации В-клеток. Супернатанты из лунок, для которых показан рост колоний после стимуляции, подвергали скринингу по связыванию IgG человека с планшетами для ELISA, покрытыми рекомбинантно экспрессированными белками LASV NP, GPC (GP1+GP2), GP1 или Z. Клоны со значительной реакционной способностью размножали, клонировали и подвергали повторному скринингу. РНК выделяли из клонов В-клеток, продуцирующих IgG, специфические для белков LASV. Гены легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC) IgG человека амплифицировали посредством RT-PCR и клонировали в векторы, экспрессирующие линейные одноцепочечные молекулы. Клетки НЕК-2 93Т совместно трансфицировали совпадающими конструкциями LC и HC для оценки экспрессии индивидуальных моноклональных антител человека (huMAb) против LASV и для очистки небольших количеств антител для исследований для предварительной характеристики *in vitro*.

Замороженные PBMC, доставленные из Сьерра-Леоне, обладали отличной жизнеспособностью и высокой частотой продуцирующих антитела В-клеток памяти. Выделено более 75 независимых клонов В-клеток против гликопротеинов от различных пациентов. Профили связывания и специфичности huMAb, специфических для компонентов GPC LASV, определяли в анализах иммунопреципитации и ELISA.

Анализ реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT) LASV

Вирус Ласса (штаммы Josiah, GA391 и 803213, для которых существуют и доступны хорошие модели на морских свинках) можно предварительно инкубировать с различными разведениями (например, от приблизительно 10 пМ до приблизительно 300 нМ) каждого MAб перед инфекцией клеток Vero или Vero E-6. Вирус можно удалять после инфекции посредством промывки дважды фосфатно-солевым буфером (PBS), и верхний слой среды для клеток с 0,5% агарозой можно добавлять к каждой культуре. Бляшки можно подсчитывать спустя приблизительно 48 ч после окрашивания нейтральным красным. Затем уровень ингибирования наносят на график против концентрации, и можно рассчитывать IC₅₀ (количество белка, необходимое для блокирования 50% проникновения).

Для двух идентифицированных huMAb против LASV, обозначенных как GP10.4B и GP19.7E, показана нейтрализация вируса *in vitro* в анализе реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT) LASV. GP19.7E являлось значительно более активным, чем 10.4B. huMAb GP10.4B и GP19.7E обладали также значительным потенциалом нейтрализации живого LASV. Нуклеотидные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) GP10.4B и GP19.7E показаны на фиг. 3 (HC) и фиг. 4 (LC). Соответствующие аминокислотные последовательности показаны на фиг. 5.

Пример 2. Получение иммунопротективных первичных MSC, экспрессирующих иммунореактивный полипептид против LASV

Происходящие из жировой ткани MSC рассеивали в 6-луночные планшеты при плотности приблизительно 1 млн клеток/лунку в модифицированной среде Игла альфа (MEM альфа), дополненной 10% FBS. На следующие сутки клетки трансфицировали либо липофектамино 2000 (Invitrogen), либо PEI (Polypius) и конструкцией pCMVintA 17HSD:huMAb 19.7E в соответствии с рекомендациями производителя: гены легкой и тяжелой цепи антитела из huMAb GP19.7E реконструировали с оптимальными последовательностями Козака и восстановленными 5'-UTR, и клонировали в бицистронный экспрессирующий век-

тор для млекопитающих (фиг. 3, панель В), в тандемной и в противоположной ориентациях. Во временно трансфицированных клетках НЕК-293Т/17 генетические конструкции с противоположной ориентацией приводили к более высоким уровням секретированных антител, чем для тандемных эквивалентов. Линию клеток NS0, экспрессирующую huMAb GP19.7E, получали посредством трансфекции конструкциями с противоположной ориентацией генов антител. Приблизительно через 48 ч после трансфекции супернатанты собирали и серийно разводили в 1×PBS/0,1% BSA/0,1% ТВИН-20 для ELISA. С использованием этого способа происходящие из жировой ткани MSC продуцировали приблизительно 60 нг/мл антитела GP19.7E, в отличие от не подающегося детекции сигнала от пустого контрольного вектора.

Пример 3. Защитный иммунитет против LASV посредством введения множества нейтрализующих антител против LASV

Для демонстрации иммунотерапевтической активности huMAb IgG против LASV, аутбредным морским свинкам инъецировали однократную дозу приблизительно 30 мг/кг и 15 мг/кг MAb GP19.7E и MAb GP10.4B, соответственно, на те же самые сутки, что и заражение LASV. LASV Josiah был адаптирован для аутбредных морских свинок с получением поголовно летальной модели посредством внутрибрюшинного (i.p.) способа. Эти аутбредные морские свинки проявляли клинические признаки заболевания, сходные с признаками, наблюдаемыми у инбредных морских свинок линии 13 и человека. Все контрольные морские свинки после инъекции свободного от антител разбавителя погибли с типичными признаками лихорадки Ласса к суткам 16 эксперимента (фиг. 6). За морскими свинками после лечения huMAb следили до 21 суток. Ни одно из этих животных после лечения huMAb не погибло или не проявило каких-либо признаков лихорадки Ласса. Эти результаты показывают, что эта комбинация специфических для гликопротеинов вируса Ласса huMAb не просто продлевала выживаемость, но обеспечивала полную защиту против летальных эффектов вируса Ласса.

Предпочтительные варианты осуществления этого изобретения описаны в настоящем документе, включая наилучший способ, известный авторам изобретения для осуществления изобретения. Варианты этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области при прочтении вышеприведенного описания. Авторы изобретения ожидают применение специалистами в данной области таких вариантов при необходимости, и авторы изобретения предусматривают практическое осуществление изобретения иным образом, чем конкретно описано в настоящем документе. Соответственно это изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, как допустимые действующим законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охвачена изобретением, если не указано иначе в настоящем документе или иным образом явно не противоречит контексту.

Список литературы

Полное содержание следующих ссылок и любых других идентифицированных ранее ссылок, конкретно не перечисленных ниже, включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Abraham, E.J., Kodama, S., Lin, J.C., Ubeda, M., Faustman, D.L., and Habener, J.F. (2004). Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in immunocompetent mice. *Am J Pathol* 164, 817-830.

Bhargava, A., Mishra, D., Banerjee, S., and Mishra, P.K. (2012). Dendritic cell engineering for tumor immunotherapy: from biology to clinical translation. *Immunotherapy* 4, 703-718.

Cavanaugh, J.S., Awi, D., Mendy, M., Hill, A.V., Whittle, H., and Mcconkey, S.J. (2011). Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PloS one* 6, e14626.

Choi, J.J., Yoo, S.A., Park, S.J., Kang, Y.J., Kim, W.U., Oh, I.H., and Cho, C.S. (2008). Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol* 153, 269-276.

Gao, J., Dennis, J.E., Muzic, R.F., Lundberg, M., and Caplan, A.I. (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169, 12-20.

Klinge, P.M., Harmening, K., Miller, M.C., Heile, A., Wallrapp, C., Geigle, P., and Brinker, T. (2011). Encapsulated native and glucagon-like peptide-1 transfected human

mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 497, 6-10.

Kumar, S., Nagy, T.R., and Ponnazhagan, S. (2010). Therapeutic potential of genetically modified adult stem cells for osteopenia. *Gene therapy* 17, 105-116.

Li, X., Lu, Y., Huang, W., Xu, H., Chen, X., Geng, Q., Fan, H., Tan, Y., Xue, G., and Jiang, X. (2006). In vitro effect of adenovirus-mediated human Gamma Interferon gene transfer into human mesenchymal stem cells for chronic myelogenous leukemia. *Hematological oncology* 24, 151-158.

Loebinger, M.R., and Janes, S.M. (2010). Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax* 65, 362-369.

Ohtaki, H., Ylostalo, J.H., Foraker, J.E., Robinson, A.P., Reger, R.L., Shioda, S., and Prockop, D.J. (2008). Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14638-14643.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer* 12, 265-277.

Prockop, D.J. (2009). Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 17, 939-946.

Sasaki, M., Radtke, C., Tan, A.M., Zhao, P., Hamada, H., Houkin, K., Honmou, O., and Kocsis, J.D. (2009). BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury. *J Neurosci* 29, 14932-14941.

Song, Y.S., Lee, H.J., Doo, S.H., Lee, S.J., Lim, I., Chang, K.-T., and Kim, S.U. (2012). Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor (HGF) inhibit collagen deposit and improve bladder function in rat model of bladder outlet obstruction. *Cell Transplantation*, -.

Wang, Y., Guo, Y., Wang, X., Huang, J., Shang, J., and Sun, S. (2011). Human serum amyloid P functions as a negative regulator of the innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Journal of immunology* 186, 2860-2870.

Wei, H.J., Wu, A.T.H., Hsu, C.H., Lin, Y.P., Cheng, W.F., Su, C.H., Chiu, W.T., Whang-Peng, J., Douglas, F.L., and Deng, W.P. (2011). The Development of a Novel Cancer Immunotherapeutic Platform Using Tumor-targeting Mesenchymal Stem Cells and a Protein Vaccine. *Molecular Therapy*.

Иммунопротективные первичные мезенхимальные стволовые клетки (IP-MSC), которые эпизодически экспрессируют множество иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на патоген (например, инфекционный вид вируса, бактерии или паразита) или токсин, описаны в настоящем

документе. IP-MSC экспрессируют два или более (например, от 2 до приблизительно 100) иммунореактивных полипептидов (например, полноразмерных антител, одноцепочечных переменных фрагментов антител (ScFV), фрагментов антител Fab или F(ab)₂, диател, триотел и т.п.) и необязательно, один или несколько других иммуномодулирующих полипептидов, например цитокин, такой как интерлейкин (например, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9 и IL-12), интерферон (например, IFN α , IFN β или IFN ω) и т.п., которые могут усиливать эффективность иммунореактивных полипептидов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммунопротективные первичные мезенхимальные стволовые клетки (IP-MSC), которые эпизодически экспрессируют множество иммунореактивных полипептидов, специфически нацеленных на вирусный патоген, где IP-MSC являются трансфицированными одним или несколькими эпизомальными векторами, кодирующими множество поддающихся экспрессии иммунореактивных полипептидов, где иммунореактивные полипептиды выбраны из полноразмерного антитела, одноцепочечного переменного фрагмента антитела (ScFV), одновалентного антигенсвязывающего фрагмента антитела (Fab), двухвалентного антигенсвязывающего фрагмента антитела (F(ab')₂), диатела и триотела; и иммунореактивные полипептиды специфически нацелены на патоген, где каждый иммунореактивный полипептид содержит аминокислотную последовательность антигенсвязывающей области нейтрализующего антитела, специфического для антигена, продуцируемого патогеном; где последовательность антигенсвязывающей области аранжирована для специфического связывания и нейтрализации патогена; где один или более эпизомальных векторов представляют собой неинфекционные, не интегрирующие кольцевые эпизомальные векторы; и где IP-MSC получены из происходящих из жировой ткани мезенхимальных стволовых клеток.

2. IP-MSC по п.1, где IP-MSC экспрессируют также одно или несколько других иммуномодулирующих средств.

3. IP-MSC по п.2, где одно или несколько других иммуномодулирующих средств выбраны из интерлейкинов и интерферонов.

4. IP-MSC по п.2, где одно или несколько иммуномодулирующих средств выбраны из IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IFN α , IFN β и IFN ω .

5. IP-MSC по любому из пп.1-4, где иммунореактивные полипептиды включают полноразмерное антитело.

6. IP-MSC по любому из пп.1-5, где патоген выбран из группы, состоящей из аденовируса; вируса папилломы; гепаднавируса; парвовируса; поксвируса; вируса Эпштейна-Барр; цитомегаловируса (CMV); вируса простого герпеса; розеоовируса; вируса ветряной оспы; филовируса; парамиксовируса; ортомиксовируса; рабдовируса; аренавируса; коронавируса; энтеровируса человека; вируса гепатита А; риновируса человека; вируса полиомиелита; ретровируса; ротавируса; флавивируса; гепацивируса и вируса краснухи.

7. IP-MSC по любому из пп.1-6, где антигенный полипептид выбран из группы, состоящей из гемагглютинаина 1 (HA1) гриппа; гемагглютинаина 2 (HA2) гриппа; нейраминидазы (NA) гриппа; гликопротеина 1 (gp1) вируса Ласса (LASV); гликопротеина 2 (gp2) LASV; ассоциированного с нуклеокапсидом белка (NP) LASV; белка L LASV; белка Z LASV; белка S вируса SARS; GP2 вируса Эбола; белка слияния 1 (F1) вируса кори; трансмембранного белка (TM) HIV-1; гликопротеина 41 (gp41) HIV-1; гликопротеина 120 (gp120) HIV-1; гликопротеина 1 оболочки (E1) вируса гепатита С (HCV); гликопротеина 2 оболочки (E2) HCV; белка нуклеокапсида (p22) HCV; гликопротеина оболочки (E) вируса лихорадки западного Нила (WNV); гликопротеина оболочки (E) вируса японского энцефалита (JEV); гликопротеина оболочки (E) вируса желтой лихорадки (YFV); гликопротеина оболочки (E) вируса клещевого энцефалита (TBEV); гликопротеина оболочки 1 (E1) вируса гепатита G (HGV); белка слияния (F) респираторно-синциального вируса (RSV); белка gD вируса простого герпеса 1 (HSV-1); белка gG HSV-1; белка gD HSV-2; белка gG HSV-2; корового белка вируса гепатита В (HBV) и гликопротеина 125 (gp125) вируса Эпштейна-Барр (EBV).

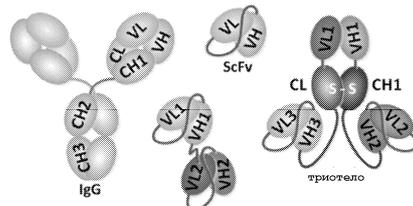
8. IP-MSC по любому из пп.1-7, где один или более эпизомальных векторов также кодируют индуцируемый ген апоптоза.

9. IP-MSC по любому из пп.1-8, где эпизомальные векторы содержат экспрессирующую кассету ядерного антигена 1 вируса Эпштейна-Барр (EBVNA1).

10. IP-MSC по п.9, где иммунореактивные полипептиды кодируются в эпизомальных векторах в противоположной ориентации генов.

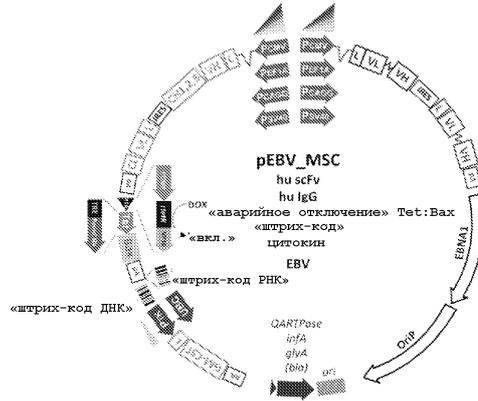
11. Фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения вирусной инфекции, где композиция содержит IP-MSC по любому из пп.1-10 в фармацевтически приемлемом носителе.

12. Применение IP-MSC по любому из пп.1-10 для лечения или предотвращения вирусной инфекции.

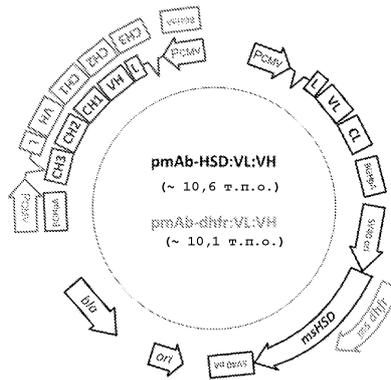


дизайнер
Фиг. 1

A



B



Фиг. 2

huMAb GP10.4B HC (SEQ ID NO: 1):

NTGCGCGTTACNGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACCTGAGATCACCGGTGCTAGC
 ACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCC
 ACTGTTGACAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
 TTCCTGAGAGTCTCCTGTGTTACGCTGGATTCAATTCAGAGCCTACGGCATGCAC
 TGGGTCCGCCAGATTCCAGCAAGGGAAGTGGAGTGGGTGGCAGATATTTGGTCTGCC
 GAGACTAATAGACTATGCAGATTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGAC
 AACTCCAAGAGCACACTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGG
 CGTATATTTCTGTGCCAAAGCGCGACAGGCTATGATTATGTCGTTGACTTATGGGGC
 CAGGGAACGCTGGTACGCTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCC
 TGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
 AGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCG
 CGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA

huMAb GP 19.7E HC (SEQ ID NO: 2):

ATCCAGCTGTGACCGGCGCCTACCTGAGATCACCGGTGCTAGCACCATGGAGACAGA
 CACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAGGTG
 CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTTCGGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGCTACTCGATGCACTGGGTCCGCCATGTTT
 CTGGGAAGGGGCTGGTGTGGGTCTCATATATTAATAGTATGGGAGTACTAAATCT
 ACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCTCCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAAGC
 TCTATCTGCAAAATGGACAGTTTGGAGTTCGAGGACACGGCTGTATATTCGTTGTAA
 GGCTGTACATTACGACTGGTCCCATTCGTGTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACC
 TCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCTCAAGAG
 CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC
 GGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGC
 TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGC
 AGCTTGGGCACCCAGACTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAG
 GTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAACTCACATGCCACCGTGC
 CCAGCACCTGAACTCT

Фиг. 3

huMAb GP10.4B LC (SEQ ID NO: 3):

GCGCCGNTNNNATCCNAGCTGTGACCGGCGCCTACCTGAGATCACCGGTGCTAGCAC
 CATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACT
 GGTGACGAAATTTGTTGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCGTCTGTAGGAGACA
 GAGTCAACATCACTTGTGGGCGAGTGGGACATCAATACTTATTTAGGTTGGTTTCA
 GCAGAGACCAGGGAAAGCCCTAAGTCCCTGATCTATGGTGCATCTAATTTGCAAAA
 TGGGGTCCCATCAAGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACGATTTTACTCTCACCATC
 AACGGCCTGCAGACTGAAGACTTTGCGACTTATTATTGCCAACAAATATAGCATCTAC
 CCGTCACTCTGGCGGAGGGACCAAGGGGACATGAAGCGAAGTGTGGCTGCACC
 ATCTGTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT
 GTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGAT
 AACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGA
 CAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCTTACCGTGTGAGCAAGCAGACTACGAGAAAC
 ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCC

huMAb GP19.7E LC (SEQ ID NO: 4):

CGTTCGATCCAGCTGTGACCGGCGCCTACCTGAGATCACCGGTGCTAGCACCATGGA
 GACAGACACACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC
 GATATTTGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCA
 CCATCACTTCCCGGCCAGTCAAGTATTAATAATTTGGTTGGCCTGGTATCAGGAGA
 AACAGGGAAAGCCCTAAGTCTCTGATAAATAAGGCGTCTAGTTTGAAGAGTGGGG
 TCCCATCAAGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCTCACCATCACCA
 GCCTGCAGCCTGATGATTTGCAACTTATTACTGCCAACAAATAATAAGTAATTCGTG
 GACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGACATGAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGT
 TTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG
 CTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC
 CTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
 CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
 TCTACGCCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGCTAGCTCGACATGATAAGATACATTGATGAGTTT
 GGACAAACCAACTAGAATGCAGTGAATAAATGCTTTATTGTTGAAATTTGTGAT
 GCTATTGCTTTATTGTTGAAATTTGTGATGCTAT

Фиг. 4

huMab GP10.4B HC (SEQ ID NO: 5):

METDITLLLVVLLLVVPGSTGDQVQLVQSGGGVVQPGRSLRVSCVTSGFNFRAYGMHW
 VRQIPGKGLEWVADIWSAETNRHYADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTGVIYF
 CAKARPGYDYVVDLWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLX

huMab GP19.7E HC (SEQ ID NO: 6):

METDITLLLVVLLLVVPGSTGDEVQLVESGGGLVPRGGSLRLSCAASGFSFSSYSMHVW
 RHVPGKGLVWVSYINSDGSKIYADSVKGRFSISRDNKAKNKLYLQMDSLRVEDTAVYSC
 VRLVHYDWSPFVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPQSCDKTHTCPPCPAPEL

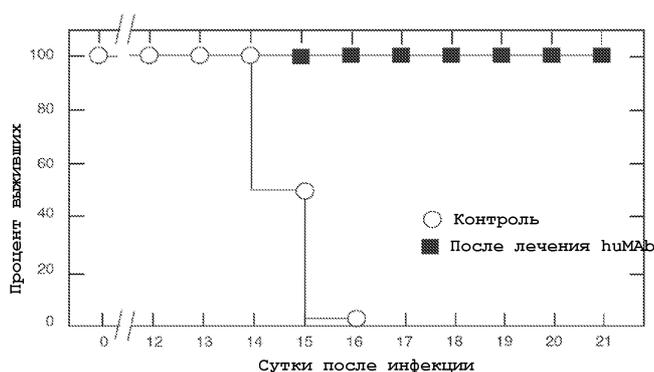
huMab GP10.4B LC (SEQ ID NO: 7):

METDITLLLVVLLLVVPGSTGDEIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASRDINTYLGWFQQR
 PGKAPKSLIYGASNLQNGVPSRFSGSGSTYFTLTINGLQTEDFATYYCQQYSIYPLSLGG
 GTKADMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS

huMab GP19.7E LC (SEQ ID NO: 8):

METDITLLLVVLLLVVPGSTGDDIVMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSINNWLAWYQE
 KPGKAPKLLINKASSLESGVPSRFSGSGTEFTLTTSLQPDDEFATYYCQQYNSNSWTFG
 QGTKVDMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
 NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 5



Фиг. 6

