

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391768** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.10.10

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.17

(54) **ДОСТАВКА АНТИТЕЛ**

(31) **20215823.4**

(32) **2020.12.18**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/086645**

(87) **WO 2022/129609 2022.06.23**

(88) **2022.09.15**

(71) Заявитель:
АС ИММЬОН СА (CH)

(72) Изобретатель:
**Дель Валь Грегорио, Невольтрис
Дэмиен (CH)**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)**

(57) Вектор содержит полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки ГЭБ экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга. Экспрессионные кассеты, полезные в таких векторах, могут содержать в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и дополнительно содержать IRES после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Антитела и фрагменты антител, полученные таким образом, могут быть более высокого качества, демонстрировать более низкие уровни агрегации и более низкую нежелательную иммуногенность.

A1

202391768

202391768

A1

ДОСТАВКА АНТИТЕЛ

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к средствам и способам эффективной доставки генов, кодирующих антитело или фрагмент антитела, посредством вектора, такого как, среди прочего, вирусный вектор, в клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или центральной нервной системы (ЦНС), такие как эндотелиальные клетки головного мозга, с получением молекулы (молекул) антитела в клетках, которые высвобождаются в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга. Посредством доставки генов антител в ГЭБ или ЦНС, в частности в эндотелиальные клетки головного мозга, настоящее изобретение также относится к способу повышения концентрации антител в центральной нервной системе (ЦНС). Доставка терапевтического антитела посредством этого подхода полезна для лечения различных заболеваний или нарушений, возникающих в ЦНС, таких как нейродегенеративные заболевания или нарушения, двигательные заболевания или нарушения, опухоли головного мозга, психоз и нейровоспаление ЦНС, среди прочих. Согласно одному аспекту настоящее изобретение связано с неожиданным открытием, что трансдукция эндотелиальных клеток головного мозга *in vitro* векторами, такими как векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), приводит к секреции высококачественных антител в большом количестве в базолатеральное пространство. Настоящее изобретение также описывает неожиданно высокий выход экспрессии антител и улучшенное качество белка посредством чередования положений цепей, использования различных секреторных пептидов и настройки регуляторных элементов, расположенных против хода транскрипции, внутри и по ходу транскрипции. Настоящее изобретение преодолевает трудности, связанные с доставкой терапевтических антител в головной мозг с необходимостью преодолевать гематоэнцефалический барьер в достаточных терапевтических дозах. Настоящее изобретение применимо к любому млекопитающему, особенно к человеку, и направлено на улучшение доставки терапевтических антител в головной мозг. Таким образом, настоящее изобретение можно применять для лечения заболеваний, нарушений или состояний у пациента, страдающего заболеванием или нарушением ЦНС, включая без ограничения заболевания, связанные с белком бета-амилоид, TDP-43-протеинопатии, альфа-синуклеопатии, таупатии, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, включая полиглутаминовые нарушения, такие как болезнь Хантингтона, рак и

опухоли головного мозга, эпилепсию, психиатрические заболевания, нейровоспалительные заболевания, нервно-мышечные заболевания, вирус-индуцированные энцефалиты и заболевания, характеризующиеся микроглиальной дисфункцией.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой структурный и функциональный барьер, который защищает мозг от переносимых с кровью патогенов и токсинов, а также поддерживает жестко регулируемую микросреду, необходимую для правильного функционирования нейронов в центральной нервной системе (ЦНС) [1, 2]. ГЭБ состоит из трех типов клеток: эндотелиальных клеток (ЕС), которые образуют физический барьер между кровотоком и головным мозгом, и двух периваскулярных клеток, перицитов и астроцитов, которые располагаются на аблюминальной поверхности слоя ЕС [3]. Хотя эндотелиальные клетки головного мозга вносят вклад в основные функции ГЭБ, эти три типа клеток составляют весь гематоэнцефалический барьер большинства позвоночных. Их взаимодействие и взаимосвязь имеют решающее значение для поддержания строго регулируемого гомеостаза ЦНС.

Эндотелиальные клетки головного мозга обладают уникальными свойствами по сравнению с эндотелиальными клетками, они удерживаются вместе плотными соединениями (ТТ), многобелковой соединительной сетью, которая ограничивает диффузию соединения через парацеллюлярное пространство. В то время как малые молекулы, такие как вода, кислород и небольшие жирорастворимые вещества, могут легко проникать из крови в головной мозг, плотные соединения предотвращают диффузию больших молекул, в том числе антител, входящих в головной мозг [4].

Этот строго регулируемый вход в головной мозг является одной из основных проблем при разработке биологических средств для лечения заболеваний, затрагивающих центральную нервную систему (ЦНС). Действительно, сообщалось, что приблизительно 0,1–0,3% введенного антитела достигает головного мозга после периферического введения [5] [6]. Даже при высокой инъекционной дозе часто сложно достичь достаточной концентрации антител в головном мозге, чтобы вызвать терапевтический ответ. Этот недостаток был описан как одна из возможных причин неудачи пассивной иммунотерапии в ходе клинических испытаний ([7]).

В течение последних десятилетий альтернативные неинвазивные подходы, такие как опосредованный рецепторами трансцитоз ([8]), доставка наночастицами [9] [10],

интраназальная доставка [11, 12] или клеточные технологии ([13, 14]), были разработаны для увеличения проникновения макромолекул в головной мозг. Тем не менее, сообщалось об ограниченной эффективности, в основном связанной с производственными трудностями [15], опосредованной мишенью диспозицией лекарственного средства *in vivo* [16] [17] или предположительной антигенностью модифицированного белка [18].

В недавнем исследовании [14] авторы сообщили о системе клеточной нацеленной доставки, состоящей из трансфицированных *ex vivo* аутологичных эндотелиальных клеток-предшественников (EPC), способных проходить ГЭБ и экспрессировать терапевтические антитела. Однако, несмотря на то, что наблюдали успешную трансфекцию *ex vivo*, ожидается ограниченный хоуминг сконструированных EPC после внутривенной трансплантации [19], что снижает терапевтический потенциал такого подхода. Внутриаартериальная инъекция может быть подходящей альтернативой, но остается сложной, поскольку доза клеток, скорость инфузии и типы клеток должны быть тщательно оценены и оптимизированы [20].

В соответствии с генной терапией с использованием вирусных векторов представляющий интерес ген может быть доставлен непосредственно в ЦНС на основе введения терапевтических генов в конкретный орган, ткань или тип клеток с использованием вирусов, которые были модифицированы путем включения в их геном представляющего интерес трансгена. Вирусные векторы, которые применяли для генной терапии, основаны без ограничения на ретровирусах, лентивирусах, аденовирусах и аденоассоциированных вирусах.

Аденоассоциированные вирусы (AAV) представляют собой эффективную и клинически безопасную платформу для доставки генов, о чем свидетельствуют недавно одобренные: Luxturna® (*voretigene neparvovect-rzyl*), первая одобренная терапия на основе AAV2, доставляет функциональную копию гена RPE65 пациентам с наследственным заболеванием сетчатки из-за мутаций в обеих копиях гена RPE65, и Zolgensma® (*onasemnogene aeparvovect-xioi*), вектор AAV9, доставляющий функциональную копию гена SMN1 в моторные нейроны у пациентов со спинальной мышечной атрофией (SMA).

AAV также применяли в качестве носителей для переноса генов в нервную систему, что позволяет осуществлять экспрессию генов, нокдаун и генное редактирование [21]. Однако большинство этих подходов основаны на инвазивной локальной инъекции векторов AAV (внутрижелудочковое, подоболочечное или интрацистернальное введение) для того, чтобы 1) обойти гематоэнцефалический барьер и 2) временно и пространственно ограничить экспрессию трансгена.

Различные серотипы дикого типа, включая AAV2, могут трансдуцировать ГЭБ, но не пересекают его, поэтому для их доставки в головной мозг требуются инвазивные хирургические вмешательства [22, 23]. Напротив, серотипы AAV9, вводимые внутривенно, могут преодолевать BBB и проникать в ЦНС, что приводит к переносу генов в головной и спинной мозг [24, 25].

Недавно опубликованные сконструированные капсидные векторы, такие как без ограничения AAV-S, AAV-F [26] или AAV-PHP.eB на основе AAV9 ([27-29]), обеспечивают хорошую трансдукцию головного мозга, где большинство нейронов и астроциты во многих областях взрослой мыши трансдуцировали с использованием внутривенного пути введения. Аналогичным образом, недавно раскрыто, что капсид AAV-BR1 (обозначаемый в данном документе взаимозаменяемо как AAV2-BR1) [30], на основе AAV2, а чуть позже раскрыто, что AAV9-PHP.V1 [31] селективно трансдуцируют эндотелиальные клетки головного мозга с длительной экспрессией трансгена, что является потенциальным лечением невровакулярных заболеваний.

AAV-опосредованная экспрессия либо целых иммуноглобулинов (IgG), либо фрагментов антител, лишенных Fc-доменов, была продемонстрирована в ЦНС для различным показаний [32-44], но также сообщалось об ограничениях, присущих обоим форматам [32, 45, 46]. Действительно, размер упаковки экспрессионных кассет AAV накладывает ограничения на конструкцию целых генов IgG, где все необходимые элементы для транскрипции и трансляции, включая гены как тяжелой, так и легкой цепи, должны составлять менее 4,7 тысяч пар оснований. На сегодняшний день большинство конструкций состоят из одного промотора и, следовательно, требуют использования последовательностей самопроцессинга, таких как фурин-2A (F2A), между геном тяжелой цепи антитела (HC) и легкой цепью (LC) антитела [47-49]. Исследователи отдают предпочтение этой конструкции из-за высоких титров экспрессии, небольшого размера последовательности F2A (всего от 60 до 80 пар оснований) и эквивалентности экспрессии цепей антител. Однако в большинстве случаев пептид F2A остается присоединенным либо к тяжелой, либо к легкой цепи, потенциально вызывая нежелательную иммуногенность экспрессируемых белков или клеток, экспрессирующих антитела [45]. Внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) для экспрессии бицистронных антител был описан как альтернатива последовательностям саморасщепления, но обычно достигается более низкая экспрессия белка из-за дисбаланса экспрессии тяжелой и легкой цепей. В то время как фрагменты антител, такие как scFv или однодоменные антитела,

обладают некоторыми преимуществами, такими как более высокие титры белка по сравнению с целой молекулой IgG из-за моноцистронной экспрессии, указанные фрагменты лишены эффекторных функций Fc и не обладают способностью связывания FcRn, что приводит к более короткому периоду полужизни *in vivo*. Фрагменты, лишённые Fc-домена, затем не способны рекрутировать эффекторные клетки для устранения патологических комплексов в паренхиме головного мозга и обнаруживают сниженный отток связанного антигена из головного мозга в кровь посредством обратного трансцитоза [32, 50-52]. Из-за одновалентной связывающей способности таких молекул наблюдается более низкая аффинность по сравнению с аналогом IgG. Таким образом, секретируемый целый IgG для нацеливания и устранения внеклеточных протеинопатий может быть предпочтительным вариантом по сравнению с фрагментами, но существует необходимость в разработке способа, который преодолевает существующие ограничения, обеспечивая высококачественную экспрессию с увеличением воздействия антител, рекрутированием эффекторных клеток и снижением риска нежелательной иммуногенности продуцируемых IgG *in situ*.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе впервые описан способ доставки, который повышает (терапевтическую) концентрацию антитела или фрагмента антитела в центральной нервной системе (ЦНС) путем доставки генов, кодирующих антитело или фрагменты антител, с использованием вектора, такого как вирусный вектор или другой вектор, такой как липосомы или наночастицы, в клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), такие как без ограничения эндотелиальные клетки головного мозга, для локальной продукции молекулы терапевтического антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга. Антитела, полученные с помощью этого нового подхода, можно применять для лечения нарушений, связанных с ЦНС. При таком сценарии клетки ГЭБ (эндотелиальные клетки головного мозга, и/или перициты, и/или астроциты) обеспечивают длительную экспрессию высококачественных антител в ЦНС, в частности в паренхиме головного мозга.

Эта новая стратегия преодолевает препятствия традиционных стратегий пассивной иммунизации, которые должны преодолевать гематоэнцефалический барьер для достижения достаточных терапевтических доз антител в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга.

Настоящее изобретение также относится к улучшенным экспрессионным кассетам для продукции антител и фрагментов антител, которые обеспечивают неожиданно более высокий выход экспрессии антител и улучшенное качество белка посредством чередования положений цепи, использования различных секреторных пептидов и настройки регуляторных элементов, расположенных внутри и по ходу транскрипции, по сравнению с ранее описанными стратегиями предшествующего уровня техники.

Настоящее изобретение отчасти основано на открытии, что векторы можно применять для доставки полинуклеотида (полинуклеотидов), кодирующего (кодирующих) антитело или фрагмент антитела, в клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Экспрессия полинуклеотида (полинуклеотидов), кодирующего (кодирующих) антитело или фрагмент антитела, клетками ГЭБ приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга. Это открытие представляет собой новую стратегию, которая преодолевает ограничения традиционных стратегий, основанных на проходе терапевтических антител через ГЭБ для достижения достаточных терапевтических доз антител в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга, для лечения заболеваний или нарушений ЦНС.

Соответственно, согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки ГЭБ экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

Путем нацеливания векторов, содержащих полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, описанных в настоящем документе, на ГЭБ, происходит увеличение количества антител или фрагментов антител, которые доставляются в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга, по сравнению с обычными терапевтическими подходами на основе антител, которые предусматривают прямую доставку антител или фрагментов антител субъекту. Как описано в настоящем документе, сообщалось, что только приблизительно 0,1%-0,3% введенного антитела достигает головного мозга после периферического введения. Напротив, авторы изобретения обнаружили, что применение вектора AAV для введения полинуклеотида (полинуклеотидов), кодирующего (кодирующих) антитело (MAV1), в линию

эндотелиальных клеток головного мозга приводит к неполяризованной секреции МАВ1. Это означает, что этот способ можно применять для экспрессии антител или фрагментов антител в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга.

ЦНС состоит из двух основных компонентов: головного и спинного мозга. Сенсорные импульсы передаются в ЦНС, а двигательные импульсы проходят из ЦНС. ЦНС также координирует деятельность всей нервной системы. Согласно одному варианту осуществления векторы для применения в соответствии с настоящим изобретением трансдуцируют или трансфицируют клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки ГЭБ экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС. ЦНС содержит множество типов клеток и согласно одному варианту осуществления антитело или фрагмент антитела доставляются в по меньшей мере один тип клеток (или все) в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления антитело или фрагмент антитела могут доставляться в эндотелиальные клетки головного мозга, нейроны, перициты, астроциты, олигодендроциты, микроглиальные и эпендимные клетки. Таким образом, доставка может осуществляться в нейроны и не относящиеся к нейронам (глиальные) клетки ЦНС. Согласно одному варианту осуществления антитело или фрагмент антитела секретируются клетками ГЭБ в ЦНС. Например, по меньшей мере 20% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 30% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 40% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 50% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 60% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 70% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 80% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 90% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в ЦНС.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело или фрагмент антитела доставляются в паренхиму головного мозга. В контексте настоящего изобретения «паренхима

головного мозга» относится к функциональной ткани головного мозга, состоящей из нейронов и глиальных клеток. Векторы для применения в соответствии с настоящим изобретением трансдуцируют или трансфицируют клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки ГЭБ экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления антитело или фрагмент антитела секретируются из клеток ГЭБ в паренхиму головного мозга. Например, по меньшей мере 20% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 30% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 40% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 50% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 60% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 70% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 80% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере 90% экспрессированного антитела или фрагмента антитела в клетках ГЭБ доставляется в паренхиму головного мозга.

Как уже описано в настоящем документе, ГЭБ представляет собой структурный и функциональный барьер, который защищает головной мозг от переносимых кровью патогенов и токсинов. ГЭБ состоит из трех типов клеток: эндотелиальных клеток, перицитов и астроцитов. В то время как открытия авторов настоящего изобретения в первую очередь относятся к эндотелиальным клеткам ГЭБ, их открытия могут быть в равной степени применимы и к другим клеткам ГЭБ. Таким образом, согласно одному варианту осуществления вектор трансдуцирует или трансфицирует полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующий) антитело или фрагмент антитела, в тип клеток, выбранный из эндотелиальных клеток, перицитов и астроцитов. Вектор может трансдуцировать или

трансфицировать один конкретный тип клеток ГЭБ. Например, вектор может трансдуцировать или трансфицировать перициты ГЭБ. Согласно другому примеру вектор может трансдуцировать или трансфицировать астроциты ГЭБ. Как указано выше, после трансдукции или трансфекции экспрессируется антитело или фрагмент антитела.

Согласно предпочтительному варианту осуществления вектор трансфецирует или трансдуцирует эндотелиальные клетки ГЭБ. Трансфекция или трансдукция эндотелиальных клеток ГЭБ полинуклеотидом, описанным в настоящем документе, является предпочтительной, поскольку эндотелиальные клетки ГЭБ имеют низкую скорость оборота, которая может оказаться оптимальной для длительной экспрессии *in vivo* антитела или фрагмента антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга.

Альтернативно, вектор может трансдуцировать или трансфицировать множество типов клеток ГЭБ. Например, вектор может трансдуцировать или трансфицировать эндотелиальные клетки и астроциты ГЭБ. Альтернативно, вектор может трансдуцировать или трансфицировать эндотелиальные клетки и перициты ГЭБ. В качестве другой альтернативы, вектор может трансдуцировать или трансфицировать астроциты и перициты ГЭБ. В качестве другой альтернативы, вектор может трансдуцировать или трансфицировать эндотелиальные клетки, астроциты и перициты ГЭБ. Как упоминалось выше, после трансдукции или трансфекции экспрессируется антитело или фрагмент антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления вектор, содержащий полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела, может селективно нацеливаться на клетки ГЭБ. Нацеливание на определенные клетки ГЭБ может быть достигнуто, например, с помощью нейротропных векторов. Нейротропные векторы могут быть вирусными векторами, и этот термин включает сконструированные варианты. Вирусные векторы, как правило, неспособны к репликации. Полинуклеотид (полинуклеотиды) может (могут) интегрироваться в геном клеток ГЭБ. Одним из примеров нейротропного вектора является вирус простого герпеса (HSV). В контексте настоящего изобретения «нейротропный вектор» относится к вектору, который преимущественно трансдуцирует или трансфецирует клетки ГЭБ и/или ЦНС по сравнению с клетками, не относящимися к ГЭБ и/или ЦНС, соответственно. Таким образом, согласно одному варианту осуществления вектор содержит нейротропный вектор. Согласно другому варианту осуществления вектор содержит модифицированный HSV.

Альтернативные способы селективного нацеливания на клетки ГЭБ состоят в применении вектора, экспрессирующего или содержащего (в частности, на поверхности, например, в вирусном капсиде) пептид, малую молекулу (SME), антитело или его фрагмент антитела, белок, наночастицу, липид, олигонуклеотид, аптамер или катионную молекулу на поверхности вектора, которые нацеливают вектор на клетки ГЭБ.

Согласно одному варианту осуществления вектор экспрессирует пептид на поверхности вектора, который нацеливает вектор на клетки ГЭБ. Другими словами, пептид, малая молекула, антитело или его фрагмент антитела, белок, наночастица, липид, олигонуклеотид, аптамер или катионные молекулы, экспрессированные или содержащиеся на поверхности вектора, придают специфичность нацеливания на клетки ГЭБ. Согласно другому варианту осуществления пептид или другая перечисленная молекула, экспрессируемые или содержащиеся на поверхности вектора, нацеливают вектор на конкретный тип (типы) клеток ГЭБ. Примеры подходящих пептидов, а также способы получения и тестирования таких пептидов, включая способы фагового дисплея, известны в данной области техники. Например, пептид может содержать лиганд или пептид, нацеленный на рецептор, участвующий в клеточном трансцитозе. Такие пептиды обеспечивают поглощение вектора клетками ГЭБ с помощью рецептор-опосредованного трансцитоза. Согласно одному варианту осуществления пептид нацелен на рецептор, выбранный из рецептора трансферрина, рецептора инсулина и рецептора липопроотеина низкой плотности. Согласно другому варианту осуществления пептид содержит пептид трансферрина. Примером пептида, нацеленного на ГЭБ является, пептид NRGTEWD (SEQ ID NO: 15), включенный в штамм AAV2, пептиды AAV-BR1, такие как эти, могут быть включены в невирусные векторы согласно некоторым вариантам осуществления.

Таким образом, вектор может нести мутации, такие как вставки, делеции или замены в поверхностных белках вектора, таких как вирусные капсидные белки, которые приводят к нацеливанию вектора на клетки ГЭБ. Согласно конкретному варианту осуществления вектор может содержать мутации, которые нацеливают вектор на клетки ГЭБ.

В качестве альтернативы или в качестве дополнения нейротропный вирусный вектор, содержащий полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела, можно применять для селективного нацеливания на клетки ГЭБ.

Термин «вектор» хорошо известен в данной области техники и в контексте настоящего изобретения является подходящим для применения для транспорта (посредством трансдукции или трансфекции) полинуклеотида (полинуклеотидов) в клетку-хозяин. Это определение

включает как невирусные, так и вирусные векторы. Вирусные или невирусные векторы могут нацеливаться на клетки ГЭБ или ЦНС, такие как без ограничения эндотелиальные клетки головного мозга, для локальной продукции молекулы терапевтического антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга. Антитела, в частности терапевтические антитела, полученные с помощью этого нового подхода, могут быть использованы для лечения нарушений, связанных с ЦНС. В таком сценарии эндотелиальные клетки головного мозга, и/или перициты, и/или астроциты действуют как резервуар для обеспечения высококачественной и долговременной экспрессии антител в ЦНС, предпочтительно в паренхиме головного мозга.

Невирусные векторы включают без ограничения органические наноматериалы, такие как липосомы, экзосомы, дендримеры и мицеллы или неорганические наноматериалы, такие как наночастицы золота, наночастицы диоксида кремния или углеродные нанотрубки. Согласно одному варианту осуществления невирусные векторы экспрессируют пептид, малую молекулу (SME), антитело или его фрагмент антитела, белок, наночастицу, липид, олигонуклеотид, аптамер или катионную молекулу на поверхности вектора, которая нацеливает вектор на клетки ГЭБ.

Вирусные векторы включают без ограничения вирусы дикого типа и сконструированные (например, модифицированные) вирусы. Примеры вирусных векторов включают без ограничения аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус, ретровирус, риновирус, лентивирус, гепатит, HSV и любую вирусоподобную частицу. Как известно в данной области техники, вирусоподобные частицы (VLP) представляют собой многобелковые структуры, которые имитируют организацию и конформацию аутентичных нативных вирусов, но не содержат вирусный геном. Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что трансдукция эндотелиальных клеток головного мозга векторами AAV приводит к секреции высокого качества и большого количества антител эндотелиальными клетками головного мозга. Поэтому, согласно одному варианту осуществления вирусный вектор представляет собой AAV. AAV может быть любого из подходящих серотипов, примеры которых включают без ограничения AAV серотипа 1 (AAV1), AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 3 (AAV3), AAV серотипа 4 (AAV4), AAV серотипа 5 (AAV5), AAV серотипа 6 (AAV6), AAV серотипа 7 (AAV7), AAV серотипа 8 (AAV8), AAV серотипа 9 (AAV9), AAV серотипа 10 (AAV10), AAV серотипа 11 (AAV11), или AAV серотипа 12 (AAV12) или любые другие серотипы дикого типа, или сконструированные AAV. Более конкретно, AAV могут

быть выбраны из AAV серотипа 1 (AAV1), AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 8 (AAV8), AAV серотипа 9 (AAV9) и AAV серотипа 10 (AAV10). Согласно другому варианту осуществления вирусный вектор выбран из AAV2, AAV8 AAV9 и AAVrh.10 (AAV реуз изолят 10).

Согласно другому варианту осуществления вирусный вектор представляет собой сконструированный AAV. Сконструированный AAV может представлять собой сконструированный AAV2, сконструированный AAV9, сконструированный AAV1 или сконструированный AAV10. Согласно предпочтительному варианту осуществления сконструированный AAV2 представляет собой AAV-BR1. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления сконструированный AAV9 представляет собой AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB или AAV9-PHP-V. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления сконструированный AAV1 представляет собой AAV1RX, AAV1R6 или AAV1R7. Более подробная информация о сконструированном AAV1 представлена в Albright BH *et al.*, который включен в настоящий документ посредством ссылки [53, 54]. Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления вектор представляет собой AAV-BR1 или AAV9-PHP-V1, которые являются специфическими для эндотелиальных клеток ГЭБ.

Согласно другому варианту осуществления вектор содержит вирусные и невирусные элементы. Виросомы являются примером вектора, который содержит как вирусные, так и невирусные элементы. Еще одним примером являются вирусные векторы, смешанные с катионными липидами.

Все векторы, которые описаны в настоящем документе, содержат полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела. Полинуклеотид может содержать ДНК или РНК. Полинуклеотид может, например, содержать дополнительные компоненты для облегчения экспрессии (например, трансляции) последовательности, кодирующей антитело или фрагмент антитела, в клетках ГЭБ. Например, полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, содержится в экспрессионной кассете. Согласно одному варианту осуществления экспрессионная кассета содержит, по существу состоит из или состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

варианту осуществления экспрессионная кассета содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 96% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. Согласно другому варианту осуществления экспрессионная кассета содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 97% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. Согласно другому варианту осуществления экспрессионная кассета содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 98% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. Согласно другому варианту осуществления экспрессионная кассета содержит нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную нуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В контексте настоящего изобретения «% идентичности» применяют для описания сходства последовательностей между двумя последовательностями, такими как нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности. Ее можно определить путем сравнения двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, при этом нуклеотидная последовательность, подлежащая сравнению, может содержать добавления или делеции по отношению к эталонной последовательности для оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Процент идентичности вычисляют путем определения количества идентичных положений, в которых остаток идентичен между двумя последовательностями, путем деления этого количества идентичных положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями. Например, можно использовать программу BLAST, «BLAST 2 sequences» (Tatusova et al, «Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences», FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), доступную на сайте <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, причем используемые параметры заданы по умолчанию (в частности, для параметров «штраф за открытый гэпа»: 5 и «штраф за расширение гэпа»: 2, выбранная матрица представляет собой, например, матрицу "BLOSUM 62",

предложенную программой), процент идентичности между двумя сравниваемыми последовательностями вычисляется непосредственно программой.

Экспрессионная кассета может содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующие один или более и предпочтительно все из промотора, функционально связанного с полинуклеотидом, кодирующим антитело или фрагмент антитела, сайта связывания рибосом, старт-кодона, стоп-кодона и последовательности терминации транскрипции. Подходящим образом экспрессионная кассета может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую пост-транскрипционный регуляторный элемент. Подходящим образом, экспрессионная кассета может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую элемент полиА (полиаденилирования).

В контексте настоящего изобретения фраза «промотор» относится к области ДНК, которая обычно расположена против хода транскрипции от последовательности полинуклеотида (например, последовательности полинуклеотида, кодирующего антитело или фрагмент антитела), подлежащего транскрипции, которая необходима для осуществления транскрипции, например, которая инициирует транскрипцию. Согласно некоторым вариантам осуществления промотор выбран из промотора цитомегаловируса (CMV), EF1A (человеческий эукариотический фактор элонгации трансляции 1 альфа 1), CAG (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актина), CBh (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актином), SV40 (энхансер/ранний промотор вируса обезьян 40), GFAP (промотор человеческого глиофибрилярного кислого белка), ATP1A2_1 (Na, K АТФаза α 2), CLDN_5 (Клаудин 5), ADRB2_1 (адренорецептор бета 2), TNFRSF6B_1 (член 6b суперсемейства рецепторов TNF), PDYN_1 (продинорфин), GH1_1 (человеческий гормон роста), OPALIN_1 (Opalin), SYN1_1 (Синапсин 1), CAMK2A_1 (кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II альфа), NEFH_1 (полипептид тяжелой цепи нейрофиламента), NEUROD6_1 (нейронный фактор дифференцировки 6) или OLIG2_1 (транскрипционный фактор 2 олигодендроглиоцитов). Согласно предпочтительному варианту осуществления промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (CMV), CBh, ранний энхансер CMV, слитый с промотором GFAP, ATP1A2_1, CLDN_5, ADRB2_1, TNFRSF6B_1, PDYN_1, GH1_1, OPALIN_1, SYN1_1, CAMK2A_1, NEFH_1, NEUROD6_1 или OLIG2_1. Согласно более предпочтительному варианту осуществления промотор представляет собой CBh, CMV или ранний энхансер CMV, слитый с промотором GFAP или

OLIG2. Согласно даже более предпочтительному варианту осуществления промотор представляет собой промотор CMV или промотор CBh.

Термин промотор включает синтетические промоторы. Термин «синтетический промотор» в контексте настоящего изобретения относится к промотору, который не встречается в природе. Например, функциональные варианты промоторов природного происхождения можно применять в соответствии с настоящим изобретением. «Функциональный вариант» промотора в контексте настоящего изобретения представляет собой вариант эталонного промотора, который сохраняет способность функционировать таким же образом, как и эталонный промотор. Согласно дополнительным вариантам осуществления применяют усеченные формы промоторов природного происхождения. Согласно предпочтительным вариантам осуществления промотор функционально связан с энхансером, таким как ранний энхансер CMV. Усеченные или модифицированные промоторы природного происхождения можно применять для облегчения вставки относительно большого антигена, кодирующего последовательности, в вектор, в частности, в вирусный вектор.

Как подробно описано в настоящем документе, вектор может быть специфически нацелен на клетки ГЭБ (и/или ЦНС). Однако в других случаях векторы специфически не нацелены на клетки ГЭБ (и/или ЦНС). Например, многие вирусные векторы дикого типа нацелены на любой тип тканей или клеток. В таких случаях ГЭБ-специфические промоторы или ЦНС-специфические промоторы можно применять для управления экспрессией полинуклеотида, кодирующего антиген или фрагмент антигена, в клетках ГЭБ или ЦНС предпочтительным или преобладающим образом по сравнению с другими тканями.

Согласно одному варианту осуществления полинуклеотид содержит промотор GFAP (человеческий глиофибрилярный кислый белок), функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим антиген или фрагмент антигена. Согласно другому варианту осуществления промотор GFAP функционально связан с ранним энхансером CMV. В этом случае происходит преимущественная или преобладающая экспрессия антигена или фрагмента антигена в астроцитах.

Согласно одному варианту осуществления полинуклеотид содержит промотор, выбранный из ATP1A2_1 (Na, K АТФаза $\alpha 2$), CLDN_5 (Клаудин 5), ADRB2_1 (адренорецептор бета 2) и TNFRSF6B_1 (член 6b суперсемейства рецепторов TNF), функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим антиген или фрагмент антигена. Согласно другому варианту осуществления промотор функционально связан с ранним энхансером CMV. В этом

случае происходит преимущественная или преобладающая экспрессия антитела или фрагмента антитела в эндотелиальных клетках ГЭБ.

Согласно одному варианту осуществления полинуклеотид содержит промотор, выбранный из PDYN_1 (продинорфин), GH1_1 (человеческий гормон роста) и OPALIN_1 (Opalin), функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим антитело или фрагмент антитела. Согласно другому варианту осуществления промотор функционально связан с ранним энхансером CMV. В этом случае происходит преимущественная или преобладающая экспрессия антитела или фрагмента антитела в клетках головного мозга.

Согласно одному варианту осуществления полинуклеотид содержит промотор, выбранный из SYN1_1 (Синапсин 1), CAMK2A_1 (кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II альфа), NEFH_1 (полипептид тяжелой цепи нейрофиламента), NEUROD6_1 (нейронный фактор дифференцировки 6), функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим антитело или фрагмент антитела. Согласно другому варианту осуществления промотор функционально связан с ранним энхансером CMV. В этом случае происходит преимущественная или преобладающая экспрессия антитела или фрагмента антитела в нейронах.

Согласно одному варианту осуществления полинуклеотид содержит промотор OLIG2_1 (транскрипционный фактор 2 олигодендроглиоцитов), функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим антитело или фрагмент антитела. Согласно другому варианту осуществления промотор OLIG2_1 функционально связан с ранним энхансером CMV. В этом случае происходит преимущественная или преобладающая экспрессия антитела или фрагмента антитела в олигодендроцитах.

Термин «функционально связанный» в контексте настоящего изобретения относится к расположению различных полинуклеотидных элементов относительно каждого из них таким образом, что элементы функционально связаны и способны взаимодействовать друг с другом предполагаемым образом. Такие элементы могут включать без ограничения промотор, энхансер и/или регуляторный элемент, последовательность полиаденилирования, один или несколько интронов и/или экзонов и кодирующую последовательность представляющего интерес гена, подлежащего экспрессии. Полинуклеотидные элементы, когда они правильно ориентированы или функционально связаны, действуют вместе, модулируя активность друг друга, и в конечном итоге могут влиять на уровень экспрессии продукта (например, антитела или фрагмента антитела). Под модуляцией подразумевается увеличение, уменьшение или

поддержание уровня активности определенного элемента. Как понятно специалисту в данной области техники, функционально связанный подразумевает функциональную активность и не обязательно относится к природной позиционной связи.

Как описано выше, экспрессионная кассета может содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующие сайт связывания рибосомы (RBS). Согласно предпочтительному варианту осуществления RBS представляет собой внутренний аминокислотный сайт рибосомы (IRES). Согласно одному варианту осуществления IRES происходит из вируса энцефаломиокардита. Согласно другому варианту осуществления IRES содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8. Таким образом, IRES является особенно предпочтительным в экспрессионной кассете, содержащей более одного гена, кодирующего антитело или фрагмент антитела. Например, когда экспрессионная кассета содержит ген, кодирующий легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и ген, кодирующий тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

Согласно всем аспектам настоящего изобретения экспрессионная кассета может дополнительно содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующие посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE) на 3' конце конструкции, как схематически представлено в самой верхней конструкции на фиг. 1. Последовательность WPRE обычно применяют для увеличения экспрессии генов, доставляемых вирусными векторами. Без ограничения теорией, включение последовательности в экспрессионные кассеты может повысить стабильность мРНК и, таким образом, выход белка.

В качестве альтернативы, экспрессионная кассета может содержать последовательности, кодирующие саморасщепляющиеся пептиды. Указанные саморасщепляющиеся пептиды можно применять в экспрессионной кассете, содержащей более чем один ген, кодирующий антитело или фрагмент антитела. Например, когда экспрессионная кассета содержит один промотор, функционально связанный с геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и с геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. В таких случаях последовательности, кодирующие саморасщепляющиеся пептиды, расположены после первого гена (например, ген, кодирующий легкую цепь антитела или фрагмента антитела) и до второго гена (например, ген, кодирующий тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела). Такие системы могут допускать котрансляционное саморасщепление пептида посредством проскока рибосом (например, что

приводит к разделению полипептидов тяжелой и легкой цепей антитела или фрагмента антитела из одного транскрипта мРНК). Одним конкретным классом саморасщепляющихся пептидов является семейство пептидов 2A (включая пептид F2A, который был получен из вируса ящура), которые имеют мотив основной последовательности DxExNPGP (SEQ ID NO: 16). Поэтому, согласно одному варианту осуществления экспрессионная кассета содержит последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид из семейства 2A. Согласно другим вариантам осуществления экспрессионная кассета дополнительно содержит последовательности, кодирующие фуриновый сайт расщепления против хода транскрипции от сайта саморасщепления. Другими словами, экспрессионная кассета содержит один промотор, функционально связанный с геном, кодирующей легкую цепь антитела или фрагмент антитела, и с геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмент антитела, где последовательности, кодирующие фуриновый сайт расщепления и саморасщепляющиеся пептиды, расположены после первого гена и перед вторым геном. Добавление фуринового сайта расщепления может быть сделано для исключения дополнительных аминокислот саморасщепляющегося пептида, которые в противном случае оставались бы присоединенными к белку (например, в легкой цепи антитела или фрагмента антитела против хода транскрипции) после саморасщепления. Примечательно, однако, что даже при наличии фуринового сайта расщепления против хода транскрипции от саморасщепляющегося пептида дополнительные аминокислоты могут оставаться в некотором количестве в белках (например, например, в легкой цепи антитела или фрагмента антитела против хода транскрипции), и что это может привести к иммунному ответу (например, иммуногенности) на белок. Более того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили повышенную агрегацию конструкций, содержащих фурин и 2A, позволяющих саморасщепление. Следовательно, согласно предпочтительному варианту осуществления экспрессионная кассета не содержит последовательности, кодирующие саморасщепляющиеся пептиды после первого гена и перед вторым геном.

Экспрессионная кассета может дополнительно содержать секреторный пептид при 5' конце полинуклеотида, кодирующего антитело или фрагмент антитела. В контексте настоящего изобретения секреторный пептид способствует доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга. В случаях, когда имеется несколько генов, кодирующих антитело или фрагмент антитела, все гены могут дополнительно содержать последовательность, кодирующую секреторный пептид.

Настоящее изобретение не ограничивается конкретным полинуклеотидом, кодирующим конкретное антитело или фрагмент антитела. Однако как правило, антитело или фрагмент антитела представляет собой терапевтическое антитело или фрагмент антитела. Терапевтическое антитело или фрагмент антитела представляет собой то, которое с пользой проявляет свою активность в ЦНС, в частности, в головном мозге. Таким образом, терапевтическое антитело или фрагмент антитела может связываться с целевым антигеном, экспрессированным в ЦНС, в частности, в головном или спинном мозге.

В общем, термин «антитело» применяется в настоящем документе в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая без ограничения моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), полностью человеческие антитела и фрагменты антител, пока они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. Антитела также могут представлять собой химерные антитела (особенно области VH и VL мыши, слитые с человеческими константными доменами), рекомбинантные антитела, антигенсвязывающие фрагменты рекомбинантных антител, гуманизированные антитела.

«Фрагмент антитела» антитела относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела и которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Согласно одному варианту осуществления фрагменты антител представляют собой Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv и предпочтительно scFv), а также мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Термин также охватывает однодоменные антитела (например, VHH, VNAR или однодоменное антитело человека). Одним из предпочтительных фрагментов антител согласно настоящему изобретению является scFv-Fc, в котором scFv (слитый белок доменов VH и VL, соединенных коротким линкерным пептидом, обычно состоящим из приблизительно 10-25 аминокислот) соединен с областью кристаллизуемого фрагмента (Fc). В scFv-Fc отсутствуют домены CH1 и CL.

Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящего изобретения относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигенного сайта.

Признак «моноклональный» указывает на то, что антитело относится к по существу однородной популяции антител и не должен толковаться как требующий получения антитела каким-либо конкретным методом. Моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридным методом, описанным Kohler, Nature 256 (1975), 495.

Соответственно, в контексте настоящего изобретения термин «антитело» относится к полным молекулам иммуноглобулина, а также к частям таких молекул иммуноглобулина (т.е. «фрагмент антитела»). Кроме того, термин относится, как обсуждалось выше, к модифицированным и/или измененным молекулам антител. Термин также относится к рекомбинантным или синтетически полученным/синтезированным антителам. Термин также относится к интактным антителам, а также к их фрагментам антител, таким как разделенные легкие и тяжелые цепи, Fab, Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂. Термин «антитело» также включает без ограничения полностью человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела с трансплантированными CDR и конструкции антител, такие как одноцепочечные Fv (scFv), scFv-Fc или слитые с антителом белки.

Гуманизированные антитела представляют собой модифицированные антитела, которые также называют измененными человеческими антителами. Гуманизированное антитело конструируют путем переноса CDR антитела, происходящего из иммунизированного животного, в определяющие комплементарность области человеческого антитела. Известны обычные методы генетической рекомбинации для таких целей (см. публикацию европейской заявки на патент № EP 239400, международную публикацию № WO 96/02576, Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856, международную публикацию № WO 99/51743).

В контексте настоящего изобретения термин «CDR» относится к «определяющей комплементарность области», которая хорошо известна в данной области техники. CDR представляют собой части иммуноглобулинов, которые определяют специфичность указанных молекул и вступают в контакт со специфическим лигандом. CDR являются наиболее вариабельной частью молекулы и способствуют разнообразию этих молекул. В каждом V-домене присутствуют три области CDR CDR1, CDR2 и CDR3. VH-CDR или CDR-H обозначает область CDR вариабельной тяжелой цепи, а VL-CDR или CDR-L относится к области CDR вариабельной области легкой цепи. VH означает вариабельную область тяжелой цепи, а VL означает вариабельной легкой цепи. Области CDR области, происходящей из Ig, можно определить, как описано в Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th edit. NIH

Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991), Chothia J., Mol. Biol. 196 (1987), 901-917 или Chothia, Nature 342 (1989), 877-883.

Область «Fc» содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов CH3.

«Фрагмент Fab'» содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая содержит домен VH и домен CH1, а также область между доменами CH1 и CH2, так что может образоваться межцепочечная дисульфидная связь двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' с образованием молекулы F(ab')₂.

«Фрагмент F(ab')₂» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами CH1 и CH2, так что образуется межцепочечная дисульфидная связь между двумя тяжелыми цепями. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух фрагментов Fab', которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

«Область Fv» содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержит константных областей.

«scFv-Fc» содержит переменные области «Fv» как тяжелой, так и легкой цепей, слитые с областью «Fc», содержащей два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобными взаимодействиями доменов CH3.

Соответственно, в контексте настоящего изобретения обеспечиваются молекулы антител или их фрагменты антител, которые гуманизированы и могут быть успешно использованы в фармацевтических композициях, включая смеси по меньшей мере двух молекул антител или их фрагментов антител.

«Антитело, которое связывается с эпитопом» в пределах определенной области белка, представляет собой антитело, которому требуется присутствие одной или нескольких аминокислот в этой области для связывания с белком.

Согласно определенным вариантам осуществления «антитело, которое связывается с эпитопом» в пределах определенной области белка идентифицируют с помощью анализа мутаций, при котором аминокислоты белка мутируют, и связывания антитела с полученным измененным белком (например, измененным белком, содержащим эпитоп) определяется как по меньшей мере 20% от связывания с неизменным белком. Согласно некоторым вариантам

осуществления «антитело, которое связывается с эпитопом» в пределах определенной области белка идентифицируют с помощью анализа мутаций, при котором аминокислоты белка мутируют, и связывания антитела с полученным измененным белком (например, измененным белком, содержащим эпитоп) определяется как по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% от связывания с неизменным белком. Согласно определенным вариантам осуществления связывание антитела определяется с помощью FACS, WB или подходящего анализа связывания, такого как ELISA.

Антитело или фрагмент антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой антитело или фрагмент антитела, которые связываются с эпитопом с ЦНС. Более конкретно, антитело или фрагмент антитела связывается с эпитопом в ЦНС, который связан с заболеванием или нарушением ЦНС. Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело или фрагмент антитела выбрано из анти-ErbB2, анти-TDP-43 (NI-205), анти-Abeta (такого как бапинеизумаб, соланезумаб, леканемаб, адуканумаб, донанемаб, гантенерумаб или кренезумаб), анти-ApoE4 (Аполипопротеин E4) и анти-DDX3X (АТФ-зависимая РНК-хеликаза), анти-Тау (тилавонемаб, госуранемаб, заготенемаб, семоринемаб, бепранемаб, ВПВ076, JNJ-63733657, Lu AF87908, PNT001, E-2814), анти-LINGO-1 (такого как опицинумаб), анти-альфа-синуклеин (цинпанемаб, прасинезумаб, MEDI-1341, Lu AF82422, BAN0805), анти-ASC (IC-100), анти-NLRP3, анти-C5 (равулизумаб, экулизумаб), анти-C1q (ANX-005), анти-C3, анти-гентингтин (C-617, NI-302), анти-прион, анти-CD20 (такого как офатумумаб, окрелизумаб, ритуксимаб, BCD-132, ублитуксимаб, ВАТ-4406F, AL-014), анти-PD-1 (IBC-Ab002) или анти-VEGF-A (бевацизумаб, ранибизумаб, бролуцизумаб, фарицимаб, вануцизумаб).

Как поясняется в экспериментальном разделе настоящего документа, линию эндотелиальных клеток головного мозга человека hCMEC/D3 трансдуцировали AAV2, AAV8, AAV9 и AAVrh.10 (AAV резус изолят 10), доставляя ген, кодирующий одно из анти-TDP-43 антител MAB1 (химерный человеческий IgG1), анти-ErbB2 антитела (Herceptin) MAB2 или eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок). Это привело к высокому качеству и длительной экспрессии антител с течением времени. Авторы настоящего изобретения также подтвердили свои наблюдения на клеточных линиях мышей и первичных эндотелиальных клеток головного мозга человека. Система доставки привела к получению правильно свернутых антител в ряде различных форматов антител (включая полноразмерные антитела и

фрагменты антител). Важно отметить, что в этих экспериментах секретируемые антитела обнаруживали как в апикальной, так и в базолатеральной сторонах, что подтверждает доставку в паренхиму головного мозга через ГЭБ на этой модели. Таким образом, данные, содержащиеся в примерах, указывают на то, что способы и векторы, описанные в настоящем документе, можно применять для доставки правильно свернутых антител или фрагментов антител (таких как терапевтические антитела) в ЦНС.

Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы впервые предложить способ увеличения концентрации антител в ЦНС для лечения заболеваний или нарушений, связанных с ЦНС, путем доставки в клетки полинуклеотида (полинуклеотидов), кодирующего (кодирующих) антитело или фрагмент антитела, в клетки в ЦНС и/или ГЭБ. Этот новый подход может быть полезен для лечения различных заболеваний или нарушений, возникающих в ЦНС.

Во избежание сомнений, в контексте настоящего изобретения термин «лечение» включает терапевтическое лечение, а также симптоматическое лечение и профилактику состояния. Применение термина «лечить», «лечение» или «обработка» (и их грамматических вариаций) означает, что тяжесть состояния субъекта снижается, по меньшей мере частично улучшается или облегчается, и/или что некоторое облегчение, смягчение или снижение по меньшей мере одного клинического симптома достигается, и/или наблюдается задержка прогрессирования заболевания или нарушения.

В контексте настоящего изобретения термин «субъект» относится к индивидууму, например, млекопитающему, такому как человек, имеющему или подверженному риску возникновения определенного состояния, нарушения или симптома, связанного с ЦНС. Субъект может быть субъектом, нуждающимся в лечении в соответствии с настоящим изобретением. Субъект может получать лечение состояния, нарушения или симптома. Альтернативно, субъект не получал лечение до лечения в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение относится к инновационной стратегии, которую можно использовать у любого млекопитающего, включая человека, и применять для лечения заболеваний или нарушений у субъекта, страдающего заболеванием или нарушением ЦНС. Доставляя гены терапевтических антител в эндотелиальные клетки головного мозга, они действуют как резервуар для обеспечения высокого качества и долговременной экспрессии антител в ЦНС.

Согласно одному варианту осуществления заболеванием или нарушением является нейродегенеративное нарушение.

Согласно другому варианту осуществления заболевание или нарушение связано с ЦНС, включая без ограничения заболевания, связанные с белком бета-амилоид, TDP-43-протеинопатии, альфа-синуклеопатии, таупатии, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, включая полиглутаминовые нарушения, такие как болезнь Хантингтона, рак и опухоли головного мозга, эпилепсию, психиатрические заболевания, нейровоспалительные заболевания, нервно-мышечные заболевания, вирус-индуцированные энцефалиты и заболевания, характеризующиеся микроглиальной дисфункцией.

Согласно другому варианту осуществления заболевание, или нарушение, или состояния относятся к пациенту, страдающему заболеванием, связанным с белком бета-амилоид, TDP-43-протеинопатиями, альфа-синуклеопатиями, таупатиями, болезнями экспансии тринуклеотидных повторов, включая полиглутаминовые нарушения, такие как болезнь Хантингтона, раком и опухолями головного мозга, эпилепсией, психиатрическими заболеваниями, нейровоспалительными заболеваниями, нервно-мышечными заболеваниями, вирус-индуцированными энцефалитами и заболеваниями, характеризующимися микроглиальной дисфункцией.

Согласно некоторым вариантам осуществления заболевания, нарушения или состояния, связанные с белком бета-амилоид, согласно настоящему изобретению включают умеренное когнитивное нарушение (MCI), синдром Дауна (DS), связанную с синдромом Дауна болезнь Альцгеймера, церебральную амилоидную ангиопатию (CAA), рассеянный склероз, болезнь Паркинсона (PD), болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви, ALS (боковой амиотрофический склероз). Многие из этих состояний характеризуются или связаны с потерей когнитивной способности памяти. Таким образом, состояния, характеризующиеся или связанные с потерей когнитивной способности памяти согласно настоящему изобретению, включают AD, умеренное когнитивное нарушение (MCI), синдром Дауна (DS), связанную с синдромом Дауна болезнь Альцгеймера, церебральную амилоидную ангиопатию (CAA), рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, болезнь Паркинсона с деменцией (PDD), деменцию с тельцами Леви, ALS (боковой амиотрофический склероз).

В частности, заболевания, нарушения или состояния, связанные с бета-амилоидом, могут быть выбраны из болезни Альцгеймера (AD), синдрома Дауна (DS), связанной с

синдромом Дауна болезни Альцгеймера, церебральной амилоидной ангиопатии (САА) или деменции с тельцами Леви.

Согласно некоторым вариантам осуществления TDP-43-протеинопатии включают лобно-височную деменцию (FTD, такую как спорадическую или наследственную с болезнью двигательного нейрона или без нее (MND), с мутацией програнулина (GRN), с мутациями C9orf72, с мутацией TARDBP, с мутацией валозин-содержащего белка (VCP), связанной с хромосомой 9p, кортико-базальную дегенерацию, лобно-височную лобарную дегенерацию (FTLD) с включениями убиквитин-положительного TDP-43 (FTLD-TDP), заболевание, характеризующееся появлением аргирофильных зерен, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию семантического варианта (svPPA), FTD поведенческого варианта (bvFTD), первичную прогрессирующую афазию неплавного варианта (nfvPPA и подобное), боковой амиотрофический склероз (ALS, такой как спорадический ALS, с мутацией TARDBP, с мутацией ангиогенина (ANG)), болезнь Александра (AxD), лимбическую преобладающую возрастную энцефалопатию TDP-43 (LATE), хроническую травматическую энцефалопатию (СТЕ), синдром Перри, болезни Альцгеймера (AD, включая спорадическую и наследственную формы AD), синдром Дауна, наследственную британскую деменцию, полиглутаминовые заболевания (болезнь Хантингтона и спиноцеребеллярная атаксия типа 3 (SCA3, также известная как болезнь Мачадо-Джозефа)), деменцию со склерозом гиппокампа и миопатии (спорадический миозит с тельцами включений, миопатия с тельцами включений с мутацией в валозин-содержащем белке (VCP, также болезнь Педжета костей и лобно-височная деменция)), черепно-мозговую травму (ТБИ), деменцию с тельцами Леви (DLB) или болезнь Паркинсона (PD).

В частности, заболевания, нарушения или состояния TDP-43-протеинопатий могут быть выбраны из лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), лимбической преобладающей возрастной энцефалопатии TDP-43 (LATE) и рассеянного склероза (MS).

Согласно некоторым вариантам осуществления синуклеинопатией является болезнь Паркинсона (спорадическая, наследственная с мутациями альфа-синуклеина, наследственная с мутациями, отличными от альфа-синуклеина, истинная вегетативная недостаточность и дисфагия с тельцами Леви), деменция с тельцами Леви (LBD, включая деменцию с тельцами Леви (DLB) («истинная» деменция с тельцами Леви), деменция при болезни Паркинсона

(PDD)) или болезнь диффузных телец Леви, спорадическая болезнь Альцгеймера, наследственная болезнь Альцгеймера с мутациями APP, наследственная болезнь Альцгеймера с PS-1, PS-2 или другими мутациями, наследственная британская деменция, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, множественная системная атрофия (синдром Шая-Дрейджера, стрионигральная дегенерация и оливопонтocerebellарная атрофия), черепно-мозговая травма, хроническая травматическая энцефалопатия, деменция боксеров, таупатии (болезнь Пика, лобно-височная деменция, болезнь Стила-Ричардсона-Ольшевского, кортико-базальная дегенерация, лобно-височная деменция с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, и болезнь Ниманна-Пика тип С1), синдром Дауна, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Хантингтона, болезнь двигательного нейрона, боковой амиотрофический склероз (спорадический, наследственный и комплекс ALS-деменции Гуам), нейроаксональная дистрофия, нейродегенерация с накоплением железа в головном мозге типа 1 (болезнь Галлервордена-Шпатца), прионные болезни, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, атаксия-телеангиэктазия, синдром Мейгса, подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Гоше, болезнь Краббе, а также другие лизосомальные болезни накопления (включая синдром Куфора-Ракеба и синдром Санфилиппо), или расстройство поведения во сне с быстрыми движениями глаз (REM).

В частности, синуклеопатия может быть выбрана из болезни Паркинсона, множественной системной атрофии, деменции с тельцами Леви (LBD, включая деменцию с тельцами Леви (DLB) («истинная» деменция с тельцами Леви), деменции при болезни Паркинсона (PDD)) или болезни диффузных телец Леви.

Согласно некоторым вариантам осуществления таупатия выбрана из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, болезни Паркинсона, болезни Крейтцфельда-Якоба, деменции боксеров, синдрома Дауна, синдрома Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, церебральной амилоидной ангиопатии прионного белка, черепно-мозговой травмы, комплекса бокового амиотрофического склероза/деменции при паркинсонизме Гуам, негуамской болезни двигательного нейрона с нейрофибриллярными клубками, деменции, характеризующейся появлением аргирофильных зерен, кортико-базальной дегенерации, диффузных нейрофибриллярных клубков с кальцификацией, лобно-височной деменции, лобно-височной деменции с паркинсонизмом, связанным с хромосомой 17, болезни Галлервордена-Шпатца, множественной системной атрофии, болезни Ниманна-Пика тип С1, паллидо-пункто-нигральной дегенерации, болезни Пика, прогрессивного

субкортикального глиоза, болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского, подострого склерозирующего панэнцефалита, деменции с преобладанием нейрофибриллярных клубков, постэнцефалитического паркинсонизма и миотической дистрофии.

В частности, таупатия может быть выбрана из болезни Альцгеймера или болезни Стила-Ричардсона-Ольшевского.

Согласно некоторым вариантам осуществления нейровоспалительные заболевания, нарушения или аномалии выбраны из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, лобно-височной деменции, лимбической преобладающей возрастной энцефалопатии TDP-43, бокового амиотрофического склероза, болезни двигательного нейрона, болезней экспансии тринуклеотидных повторов, включая полиглутаминовые нарушения, такие как болезнь Хантингтона, рассеянного склероза, демиелинизации, вирусных энцефалитов, эпилепсии, ишемического и геморрагического инсульта, черепно-мозговой травмы, хронической травматической энцефалопатии, криопирин-связанных периодических синдромов (CAPS), синдрома Макла-Уэлса (MWS), семейного холодового аутовоспалительного синдрома (FCAS), мультисистемного воспалительного заболевания неонатального возраста (NOMID), синдрома периодической лихорадки (HIDS), сидеробластной анемии с иммунодефицитом В-клеток, периодической лихорадки, задержки в развитии (SIFD), болезни Бехчета, синдрома Шегрена, церебральной малярии, поражения головного мозга из-за пневмококкового менингита, вируса чикунгунья, вируса Росс-Ривер, гриппа, ВИЧ, коронавирусов, лихорадки Денге, вируса Зика, гельминтозов, бактериальной инфекции, депрессии, психологического стресса, ВИЧ-ассоциированного нейрокогнитивного нарушения, коронавирус-ассоциированных воспалительных патологий.

Согласно некоторым вариантам осуществления нейровоспалительные заболевания, нарушения или аномалии предпочтительно выбраны из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции, рассеянного склероза, демиелинизации, вирусных энцефалитов, эпилепсии, инсульта, криопирин-связанных периодических синдромов (CAPS), васкулитов, связанных с анти-нейтрофил цитоплазматическими антителами, волчанки, псориатического артрита и наследственных возвратных тифов (HRF).

Согласно некоторым вариантам осуществления нейровоспалительные заболевания, нарушения или аномалии более предпочтительно выбраны из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции, рассеянного

склероза, демиелинизации, вирусных энцефалитов, инсульта, криопирин-связанных периодических синдромов (CAPS).

Согласно некоторым вариантам осуществления нервно-мышечные заболевания могут включать геморрагический инсульт, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона и болезнь Крейтцфельда-Якоба, спинальные мышечные атрофии и боковой амиотрофический склероз. Согласно другому варианту осуществления заболевание или нарушение ЦНС представляет собой нейродегенеративное нарушение.

Согласно предпочтительному варианту осуществления заболевание или нарушение ЦНС выбрано из лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), и лимбической преобладающей возрастной энцефалопатии TDP-43 (LATE), и рассеянного склероза (MS).

Рак и опухоли головного мозга и ЦНС, которые также можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают астроцитомы (в том числе мозжечковые и церебральные), глиому ствола головного мозга, опухоли головного мозга, злокачественные глиомы, эпендимому, глиобластому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоли зрительного пути и глиомы гипоталамуса, первичную лимфому центральной нервной системы, эпендимому, глиому ствола головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамуса, экстракраниальную герминогенную опухоль, медуллобластому, синдромы миелодисплазии, олигодендроглиому, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, миелоидный лейкоз, множественную миелому, миелопролиферативные заболевания, нейробластому, новообразование плазматических клеток/множественную миелому, лимфому центральной нервной системы, внутренние опухоли головного мозга, астроцитарные опухоли головного мозга, глиомы и инвазию метастатических опухолевых клеток в центральную нервную систему.

Векторы, как описано в настоящем документе, можно вводить субъекту любым обычным путем, включая инъекцию или постепенную инфузию с течением времени. Введение можно проводить посредством парентерального введения. Введение можно проводить, например, инфузией или интратекальным, интрацистернальным, интрацеребровентрикулярным, интрапаренхиматозным, интраназальным, интравитреальным, подкожным или внутримышечным путем. Согласно одному варианту осуществления вектор

вводят посредством внутривенной инъекции или внутривенной инфузии. В качестве дополнительных примеров подходящие формы для парентеральной инъекции (включая подкожную, внутримышечную, внутрисосудистую или инфузию) включают стерильный раствор, суспензию или эмульсию. Внутривенная инъекция является предпочтительной.

Идентификация подходящих доз композиций согласно настоящему изобретению находится в пределах рутинных знаний специалиста в данной области техники. Например, подходящая доза для данного субъекта будет определяться с учетом различных факторов, которые, как известно, модифицируют действие вектора для применения согласно настоящему изобретению. Например, тяжесть и тип заболевания или нарушения ЦНС, масса тела, пол, диета, время и способ введения, другие лекарственные средства и другие соответствующие клинические факторы. Дозы и схемы могут варьироваться в зависимости от конкретного состояния, нарушения или симптома общего состояния субъекта. Также возможно, что не существует единой принятой дозы для лечения данного заболевания, а диапазон доз считается подходящим. Эффективные дозы могут быть определены методами *in vitro* или *in vivo*.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболевания или нарушения ЦНС у субъекта. Способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, субъекту. Указанный способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и предпочтительно трансдуцированные или трансфицированные клетки продуцируют (например, экспрессируют) антитело или фрагмент антитела, и антитело или фрагмент антитела доставляются в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу доставки антитела или фрагмента антитела в ГЭБ субъекта, причем способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела субъекту, где способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу доставки антитела или фрагмента антитела в ЦНС субъекта, причем способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, субъекту, где способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и

трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения ЦНС у субъекта, причем способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, субъекту, где способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, для получения лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения ЦНС у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, для доставки полинуклеотида, кодирующего антитело или фрагмент антитела в ГЭБ субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

Все варианты осуществления, описанные в настоящем документе, относящиеся к векторам для применения в соответствии с предыдущими аспектами настоящего изобретения, в равной степени применимы к этим другим аспектам настоящего изобретения.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что определенные конструкции экспрессионных кассет улучшают качество продуцируемых антител. Это важно при доставке антител *in vivo*. Таким образом, применение экспрессионных кассет согласно настоящему изобретению (как подробно описано в различных аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения в настоящем документе) обеспечивает предпочтительную доставку антител и фрагментов антител в ЦНС, которая может осуществляться путем прямой доставки в ЦНС или путем доставки через клетки ГЭБ (в соответствии с настоящим изобретением, как определено в настоящем документе). Таким образом, описанные ниже аспекты могут быть выполнены *in vivo*, где клетки представляют собой клетки ГЭБ, особенно эндотелиальные

клетки головного мозга или, в более общем смысле, клетки ЦНС. Таким образом, антитело или фрагмент антитела, как правило, представляет собой терапевтическое антитело или фрагмент антитела, как описано в настоящем документе. Приведенные ниже аспекты также могут быть осуществлены *ex vivo* или *in vitro* для продукции антител согласно некоторым вариантам осуществления. Согласно этим вариантам осуществления можно применять клетки любого подходящего типа. В данном случае снова антитело или фрагмент антитела обычно представляет собой терапевтическое антитело или фрагмент антитела.

Соответственно, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или ЦНС, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что расположение легкой цепи перед тяжелой цепью в таких конструкциях является значительно предпочтительным. Предпочтительно IRES располагается между первым и вторым генами.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к вектору, содержащему экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или ЦНС, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС, предпочтительно в паренхиму головного мозга. В такой конструкции IRES не требуется.

ЦНС, как и в случае с ГЭБ, содержит множество типов клеток и согласно одному варианту осуществления вектор трансдуцирует или трансфицирует полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела, в по

меньшей мере один (или во все) тип клеток в ЦНС. Например, вектор может трансдуцировать или трансфицировать клетки ЦНС, которые выбраны из эндотелиальных клеток головного мозга, нейронов, перицитов, астроцитов, олигодендроцитов, микроглиальных и эпендимных клеток. Таким образом, вектор может трансдуцировать или трансфицировать нейроны и не относящиеся к нейронам (глиальные) клетки ЦНС. Альтернативно, вектор может трансдуцировать или трансфицировать один конкретный тип клеток ЦНС. Например, вектор может трансдуцировать или трансфицировать эндотелиальные клетки головного мозга ЦНС. Согласно другому примеру вектор может трансдуцировать или трансфицировать нейроны ЦНС. Согласно другому примеру вектор может трансдуцировать или трансфицировать астроциты ЦНС. Согласно другому примеру вектор может трансдуцировать или трансфицировать олигодендроциты. Согласно другому примеру вектор может трансдуцировать или трансфицировать клетки микроглии ЦНС. Альтернативно, вектор может трансдуцировать или трансфицировать эпендимные клетки ЦНС.

Согласно другому варианту осуществления вектор трансдуцирует или трансфицирует множество типов клеток как ГЭБ, так и ЦНС.

Как описано выше, вектор, содержащий полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела, может трансдуцировать или трансфицировать, в частности, клетки ГЭБ и/или ЦНС. Те же методики, которые описаны для нацеливания на ГЭБ, описанные в настоящем документе, в равной степени применимы для нацеливания вектора непосредственно на ЦНС. Согласно одному варианту осуществления вектор экспрессирует пептид на поверхности вектора, который нацеливает вектор на клетки ГЭБ или ЦНС. Другими словами, пептид, экспрессируемый на поверхности вектора, придает специфичность нацеливания на ГЭБ и/или ЦНС. Согласно другому варианту осуществления пептид, экспрессируемый на поверхности вектора, нацеливает вектор на определенный тип (типы) клеток ГЭБ и/или ЦНС. Примеры подходящих пептидов, а также способы получения и тестирования таких пептидов, включая способы фагового дисплея, известны в данной области техники.

В качестве альтернативы или дополнительно, нейротропный вектор, содержащий полинуклеотид (полинуклеотиды), кодирующий (кодирующие) антитело или фрагмент антитела, можно применять для трансдукции или трансфекции, в частности, клеток ГЭБ и/или ЦНС, таких как HSV. Таким образом, согласно одному варианту осуществления вектор

содержит нейротропный вектор. Согласно другому варианту осуществления вектор содержит модифицированный HSV.

Все варианты осуществления, описанные в настоящем документе, относящиеся к векторам для применения в соответствии с предыдущими аспектами настоящего изобретения, в равной степени применимы к этим другим аспектам настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления экспрессионная кассета содержит в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Экспрессионная кассета может дополнительно содержать внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела. Другими словами, экспрессионная кассета содержит в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, IRES и вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Согласно другому варианту осуществления экспрессионная кассета содержит в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Положение каждого элемента в экспрессионной кассете находится относительно других элементов и экспрессируется таким образом, что начинается при 5' конце и движется в направлении 3' конца, стандартным образом.

Настоящее изобретение также относится к неожиданно более высокому выходу экспрессии антител и улучшенному качеству белка посредством чередования положений цепей, применения различных секреторных пептидов и настройки регуляторных элементов, расположенных внутри и ниже, по сравнению со стратегиями, известными из уровня техники.

Таки образом, настоящее изобретение относится к способу снижения агрегации антитела или фрагмента антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно

содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

Те же самые конструкции также приводят к улучшению качества антител по сравнению со способами, в которых применяют другие конструкции (как описано в настоящем документе, в частности, конструкции с тяжелой цепью перед легкой цепью в кассете и/или включающие саморасщепляющиеся пептиды, такие как пептид фурин/2A). Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу улучшения созревания и/или качества антитела или фрагмента антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

Другими словами, один способ в соответствии с настоящим изобретением приводит к увеличению доли антитела или фрагмента антитела, имеющих ту же трехмерную структуру, что и нативная конфигурация антитела или фрагмента антитела. Это можно измерить, например, с помощью электрофореза, такого как SDS-PAGE. Образец также может быть восстановлен (например, с использованием DTT), а затем исследован на геле для

подтверждения точного образования дисульфидной связи и того, что как легкая, так и тяжелая цепи мигрируют при ожидаемой молекулярной массе.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что положение гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, относительно гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, влияет на наблюдаемую долю агрегации. Действительно, когда ген, кодирующий легкую цепь, является первым геном в экспрессионной каскаде, за которым следует ген, кодирующий тяжелую цепь, снижается агрегация экспрессированного антитела по сравнению с обратной ориентацией (например, когда ген, кодирующий тяжелую цепь, является первым геном в экспрессионной каскаде, за которым следует ген, кодирующий легкую цепь).

Согласно одному варианту осуществления клетки трансформируют экспрессионной каскадой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная каскада дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и агрегация антител снижается по сравнению с клетками, трансформированными экспрессионной каскадой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор функционально связанный с первым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная каскада дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Как описано более подробно в настоящем документе, экспрессионная каскада может необязательно содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующие WPRE, на 3' конце конструкции, как схематически представлено в самой верхней конструкции на фиг. 1. Таким образом, согласно одному варианту осуществления экспрессионная каскада содержит последовательности, обеспечивающие или кодирующие WPRE после второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Необходимо отметить, что это относится ко всем соответствующим конструкциям и способам настоящего изобретения.

Согласно другому варианту осуществления клетки трансформируют экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и агрегация антитела или фрагмента антитела снижается по сравнению с клетками, трансформированными экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела.

Например, агрегация антитела или фрагмента антитела снижается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%.

Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили повышенную агрегацию конструкций, содержащих фурин и 2A (как например, пептид 2A, происходящий из вируса ящура, F2A), что делает возможным саморасщепление. Таким образом, экспрессионные кассеты предпочтительно не содержат саморасщепляющиеся пептиды, в частности, не содержат фурин/2A.

Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что положение гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, относительно гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, влияет на титр антител. Действительно, когда ген, кодирующий легкую цепь, является первым геном в экспрессионной кассете, за которым следует ген, кодирующий тяжелую цепь, титр экспрессируемого антитела или фрагмента антитела увеличивается по сравнению с обратным расположением (например, когда ген, кодирующий тяжелую цепь, является первым геном в экспрессионной кассете, за которым следует ген, кодирующий легкую цепь).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу повышения титра антитела или фрагмента антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим

тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит либо внутренний сайт связывания рибосомы (IRES), либо сайт саморасщепления (например, фурин-2A) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

Хотя это наблюдение относится к сайтам саморасщепления, в частности к конструкциям, содержащим фурин-2A, предпочтительно, чтобы они не были включены из-за проблем агрегации и иммуногенности, как обсуждается в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления клетки трансформируют экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Таким образом, титр антител повышается по сравнению с клетками, трансформированными экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Как описано более подробно в настоящем документе, экспрессионная кассета может необязательно содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующий WPRE, на 3' конце конструкции, как схематически представлено самой верхней конструкцией на фиг. 1. Таким образом, согласно одному варианту осуществления экспрессионная кассета содержит

последовательности, обеспечивающие или кодирующие WPRE, после второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

Согласно другому (менее предпочтительному) варианту осуществления, клетки трансформируют экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит сайт саморасщепления (например, фурин-2A) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и титр антител повышается по сравнению с клетками, трансформированными экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит сайт саморасщепления (например, фурин-2A) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Как описано более подробно в настоящем документе, экспрессионная кассета может необязательно содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующий WPRE на 3' конце конструкции, как схематически представлено самой верхней конструкцией на фиг. 1. Таким образом, согласно одному варианту осуществления экспрессионная кассета содержит последовательности, обеспечивающие или кодирующие WPRE после второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

Согласно другому варианту осуществления клетки трансформируют экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и титр антител повышается по сравнению с клетками, трансформированными экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела.

Например, титр антитела или фрагмента антитела повышается на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%.

Без ограничения теорией, авторы настоящего изобретения также полагают, что антитела, полученные с использованием экспрессионных кассет, которые не содержат сайты саморасщепления, такие как фурин-2А, обладают пониженной иммуногенностью по сравнению с антителами, полученными с использованием экспрессионных кассет, которые содержат сайты саморасщепления, такие как фурин-2А. Это связано с тем, что в антителах отсутствуют какие-либо остатки сайтов саморасщепления, такие как пептид фурин-2А, которые, как известно, способствуют нейтрализующему ответу на антитела и/или клеточному иммунитету к антителу. Как следствие, полагают, что антитела, продуцируемые с использованием экспрессионной кассеты, не содержащей сайты саморасщепления (такие как фурин-2А), приводят к снижению нежелательной иммуногенности. Термин «нежелательная иммуногенность» в контексте настоящего изобретения используется для обозначения иммунного ответа животного (например, человека) против антитела (в частности, направленного на пептидные остатки саморасщепляющихся пептидов, включенных в экспрессионные кассеты), что приводит к продукции нейтрализующих антител и/или клеточного иммунитета, что снижает активность терапевтических антител *in vivo*. Кроме того, указанная нежелательная иммуногенность может быть причиной нежелательных явлений, связанных с терапией антителами или фрагментами антител *in vivo*.

Таким образом, согласно дополнительному аспекту, настоящее изобретение относится к способу снижения нежелательной иммуногенности антитела или фрагмента антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую

цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу снижения нежелательных явлений, связанных с терапией антителом или фрагментом антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

Согласно одному варианту осуществления этих аспектов клетки трансформируют или трансдуцируют экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и нежелательная иммуногенность снижается по сравнению с клетками, трансформированными экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит сайт расщепления фури-2А после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или

фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

Например, иммуногенность и/или соответствующие нежелательные явления, связанные с терапией антителом или фрагментом антитела, снижаются на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%.

В контексте сравнения специалисту в данной области техники понятно, что будут использоваться одни и те же клетки и одни и те же условия.

Согласно другому варианту осуществления антитело или фрагмент антитела не содержит элементы саморасщепления. Согласно другому варианту осуществления антитело или фрагмент антитела не содержит пептиды фурин-2А или их фрагменты.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителу или фрагменту антитела, полученным способами согласно настоящему изобретению. Антитела или фрагменты антител, полученные способами согласно настоящему изобретению, можно применять для снижения нежелательной иммуногенности (которая может включать воспаление) у субъекта по сравнению с антителами или фрагментами антител, полученными способами, в которых используется экспрессионные кассеты, содержащие сайты саморасщепления между генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела или фрагмента антитела. Согласно другому варианту осуществления антитело или фрагмент фрагмента, полученные способами согласно настоящему изобретению, также могут снижать любую токсичность, связанную с антителами, полученными способами, в которых используются экспрессионные кассеты, содержащие сайты саморасщепления между генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела или фрагмента антитела.

Настоящее изобретение также относится к соответствующим экспрессионным кассетам, которые можно применять в таких способах. Таким образом, настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, где экспрессионная кассета дополнительно содержит IRES после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Введение экспрессионной кассеты в клетки вызывает более высокий титр антител по сравнению с титром антител,

образующихся при введении экспрессионной кассеты, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым гном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и вторым гном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и IRES после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, в идентичные клетки. Как описано более подробно в настоящем документе, экспрессионная кассета может необязательно содержать последовательности, обеспечивающие или кодирующий WPRE на 3' конце конструкции, как схематически представлено самой верхней конструкцией на фиг. 1. Таким образом, согласно одному варианту осуществления экспрессионная кассета содержит последовательности, обеспечивающие или кодирующие WPRE после второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

Подобным образом, настоящее изобретение относится к экспрессионной кассете, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым гном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым гном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Введение экспрессионной кассеты в клетки продуцирует более высокий титр антител по сравнению с титром антител, продуцируемым при введении экспрессионной кассеты, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым гном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым гном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, в идентичные клетки.

Эти экспрессионные кассеты предпочтительно не включают сайт саморасщепления, такой как сайт расщепления фурина/2A, поскольку такая конструкция приводит к более высокой агрегации (т.е. более низкому качеству) экспрессируемых антител, а также к повышению иммуногенности.

Настоящее изобретение также относится к вектору, который трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или ЦНС, содержащему экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе. Такие векторы полезны в способах получения антитела или фрагмента антитела, предусматривающих трансформацию клеток вектором и поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

Экспрессионные кассеты, описанные в настоящем документе, были сконструированы для доставки вирусных векторов. В таких векторах существуют ограничения в отношении количества генетического материала, который можно упаковать. Таким образом, настоящее изобретение относится к вирусному вектору, в частности к нейротропному вирусному вектору или вирусному вектору, который может трансдуцировать или трансфицировать клетки ГЭБ или ЦНС, содержащему экспрессионную кассету согласно настоящему изобретению. Вирусный вектор может содержать сконструированный вектор AAV2, предпочтительно AAV-BR1 или сконструированный вектор AAV9, такой как AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB или AAV9-PHP-V1, или сконструированный вектор AAV1, такой как AAV1RX, AAV1R6 или AAV1R7. Вирусный вектор может содержать экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и дополнительно содержит IRES после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела. Вирусный вектор может содержать экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

Эти векторы и экспрессионные кассеты можно применять в любом из способов согласно настоящему изобретению.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Представление различных конструкций, исследованных для получения rAAV-происходящих антител, связанных производных и других белков. Изогнутые стрелки указывают на чередование положения легкой и тяжелой цепей в экспрессионной кассете. SP: Секреторный пептид, IRES: Внутренний аминокислотный сайт рибосомы, FSG2A: Саморасщепляющийся пептид Фурин/2A, WPRE: Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков, рА: Поли А. Тяжелая цепь или легкая цепь могут представлять собой любые последовательности антител. Промотор может предпочтительно представлять собой CMV (человеческий промотор цитомегаловируса) или другие промоторы, такие как без ограничения EF1A (человеческий эукариотический фактор элонгации трансляции 1 альфа 1),

СAG (ранний энхансер CMV, слитый с промотором куриного β -актина), CBh (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актина), SV40 (ранний энхансер/ промотор вируса обезьян 40), GFAP (промотор человеческого глиофибрилярного кислого белка) *: 3' регуляторные элементы не включены.

Фиг. 2А. Титры супернатанта клеток CHO MAB1 IgG и scFv-Fc после трансфекции рAAV. Система BLI Octet, биосенсоры, покрытые белком А. Стрелки указывают на явное снижение экспрессии, когда ген тяжелой цепи расположен перед легкой цепью в конструкции (HC/LC) по сравнению с их соответствующими аналогами LC/HC. Конструкции клонов соответствуют вариантам на фиг. 1, как подробно показано на чертеже.

Фиг. 2В. Титры супернатантов клеток CHO MAB1 Fab после трансфекции рAAV. Система BLI Octet, анти-His-покрытые биосенсоры. Стрелки снова указывают на явное снижение экспрессии, когда ген тяжелой цепи расположен перед легкой цепью в конструкции (HC/LC) по сравнению с их соответствующими аналогами LC/HC.

Фиг. 3. Разделение очищенных IgG MAB1 с помощью SDS-PAGE с окрашиванием кумасси синим. Образцы восстанавливали в присутствии 5 мМ дитиотреитола по показаниям (DTT). Стрелки указывают на сдвиг в сторону большей молекулярной массы.

Фиг. 4. Разделение очищенного scFv-Fc MAB1 с помощью SDS-PAGE с окрашиванием кумасси синим. Образцы восстанавливали в присутствии 5 мМ дитиотреитола по показаниям (DTT).

Фиг. 5. Связывание IgG MAB1 с пептидом TP-62. Октет-кинетика, начиная со 100 нМ связывающего кандидатного белка, с последующим 2-кратным серийным разведением. Верхняя панель охватывает IgG MAB1 с 2 промоторами с разными промоторами и конструкцией IgG HC/LC фурин. Нижняя панель охватывает конструкции IgG MAB1 фурин HC/LC и LC/HC, конструкции IgG IRES LC/HC и HC/LC, а также конструкции IgG scFv-Fc. Детали отдельных конструкций показаны на чертеже. Каждая панель начинается с загрузки биосенсора с использованием 500 нМ пептида TP-62.

Фиг. 6. Анализ эксклюзионной хроматографией по размеру соответствующих очищенных IgG, происходящих из рAAV, с использованием колонки Superdex 200 Increase 10/300GL. Разделение проводили в буфере PBS при 4°C. Индивидуальные детали конструкции показаны на чертеже.

Фиг. 7. Эксклюзионная хроматография, наложение релевантных очищенных IgG, происходящих из рAAV. Те же условия, что и на фиг. 6.

Фиг. 8. Анализ С-концевых частей конструкций IgG MAB2 фурин, подтверждающий наличие оставшегося пептида фурин/F2A и, таким образом, увеличение массы первой цепи антитела на конструкцию. Трипсиновый гидролиз в геле с последующей ЖХ/МС.

Фиг. 9. Очищенные MAB1 IgG и scFv-Fc на мл культуры, полученные в результате трансдукции СНО с AAV2, 8, 9 и 10, по сравнению с трансфекцией. Количество очищенного белка на мл определяли количественно по OD 280 нм с использованием соответствующего коэффициента экстинкции. Индивидуальные детали конструкции показаны на чертеже.

Фиг. 10. Разделение очищенных IgG MAB1 с помощью SDS-PAGE с окрашиванием кумасси синим. Образцы восстанавливали в присутствии 5 мМ дитиотреитола по показаниям (DTT).

Фиг. 11. Сравнение титра IgG после трансдукции СНО, дифференцированных нейронов и клеток ГЭБ конструкциями векторов антител AAV2, 8, 9 и 10. Левая панель: трансдукция СНО, средняя панель — трансдукция дифференцированной линии клеток нейробластомы человека, правая панель — трансдукция дифференцированных клеток гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Детали отдельных конструкций показаны на чертеже.

Фиг. 12. Сравнение титра IgG после трансдукции первичных клеток головного мозга крыс с помощью векторных конструкций AAV2, 8, 9 и 10 MAB1 IgG и scFv-Fc. Индивидуальные детали конструкции показаны на чертеже.

Фиг. 13. Обнаружение MAB1 (изотип IgG1 человека), секретируемых клетками hCMES/D3 в апикальные супернатанты трехмерной модели ГЭБ OrganoPlate® через 3 дня после трансдукции различными серотипами AAV WT. Экспрессия MAB1 регулируется промотором CMV. Элемент IRES применяли между LC и HC для достижения продукции бицистронных антител. Таким образом, протестированные конструкции имели следующее расположение: 5'- промотор CMV-ген, кодирующий легкую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-IRES-ген, кодирующий тяжелую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-3'. Присутствие антител измеряли с помощью анализа ELISA связывания полноразмерного (FL) белка hTDP-43, выраженного как O.D. (оптическая плотность). Для контрольной трансдукции AAV2-eGFP связывания не наблюдали. Как и ожидали, связывание антител не было обнаружено для 2 контролей, mIgG MAB1 и hIgG MAB2, поскольку для обнаружения использовали анти-человеческое вторичное антитело, а MAB2 не может связывать белок hTDP-43 FL.

Фиг. 14. Обнаружение MAB1 (изотип IgG1 человека) секретируется клетками hCMEC/D3 как в апикальном, так и в базолатеральном компартментах трехмерной модели ГЭБ OrganoPlate® через 3 дня после трансдукции конструкцией AAV2. Бицистронная экспрессия MAB1, управляемая промотором CMV, была достигнута с использованием элемента IRES между LC и HC. Таким образом, протестированные конструкции имели следующее расположение: 5'-промотор CMV-ген, кодирующий легкую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-IRES-ген, кодирующий тяжелую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-3'. Присутствие антител измеряли с помощью анализа ELISA связывания полноразмерного белка TDP-43. Для контрольной трансдукции AAV2-eGFP связывания не наблюдали. Данные выражены как O.D.

Фиг. 15. Обнаружение MAB1 (изотип IgG1 человека), секретируемых клетками hCMEC/D3 в супернатант 24-луночного культурального планшета через 3 дня после трансдукции конструкцией AAV2 при различных MOI (множественность заражения). Бицистронная экспрессия MAB1, управляемая промотором CMV, была достигнута с использованием элемента IRES между LC и HC. Таким образом, протестированные конструкции имели следующее расположение: 5'- промотор CMV-ген, кодирующий легкую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-IRES-ген, кодирующий тяжелую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-3'. Присутствие антител измеряли с помощью анализа ELISA связывания полноразмерного белка TDP-43. Данные выражены в концентрации, вычисленной по стандартной кривой.

Фиг. 16. Обнаружение MAB1 (изотип IgG1 человека), который секретируется клетками hCMEC/D3 как в апикальном, так и в базолатеральном компартментах модели Transwell ГЭБ через 3 дня после трансдукции конструкцией AAV2. Бицистронная экспрессия MAB1, регулируемая промотором CMV, была достигнута с использованием элемента IRES между LC и HC. Таким образом, протестированные конструкции имели следующее расположение: 5'-промотор CMV-ген, кодирующий легкую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-IRES-ген, кодирующий тяжелую цепь, с последовательностью, кодирующей секреторный пептид-3'. Присутствие антител измеряли с помощью анализа ELISA связывания полноразмерного белка hTDP-43. Для контрольной трансдукции AAV2-eGFP не наблюдали связывания (данные не показаны). Данные выражены как относительный процент присутствующих антител.

Фиг. 17. Обнаружение hIgG1 и scFv- MAB1 Fc в клеточном супернатанте через 6 дней после трансдукции конструкциями AAV2, AAV-BR1 и AAVrh10 при MOI 100 000 в (A) линиях эндотелиальных клеток головного мозга мыши b.End3 и b.End5 и (B) клетках hCMEC/D3. Бицистронная экспрессия MAB1, управляемая промотором CMV, была достигнута с использованием элемента IRES между LC и HC. Таким образом, протестированные конструкции имели следующее расположение в направлении от 5' к 3': промотор CMV – секреторный пептид – легкая цепь – IRES – секреторный пептид – тяжелая цепь – WPRE-полиА. Присутствие антител измеряли с помощью HTRF (гомогенной флуоресценции с временным разрешением) с использованием набора анти-hFc (PerkinElmer, Cisbio). Данные, выраженные в концентрации, интерполировали из стандартной кривой и получали для от 3 до 6 биологических повторов в рамках одного эксперимента со средним значением \pm стандартное отклонение.

Фиг. 18. Обнаружение hIgG1 или mIgG2a MAB1, секретируемых первичными эндотелиальными клетками микроциркуляторного русла головного мозга человека из коммерчески доступной трехмерной модели ГЭБ человека *in vitro* (Neuromics). Обнаружение проводили как в апикальном, так и в базолатеральном компартментах через 7 дней после трансдукции векторами AAV2 и AAV-BR1 при MOI 100 000. Бицистронная экспрессия MAB1, управляемая промотором CMV или CBh, была достигнута с использованием элемента IRES между LC и HC. Таким образом, протестированные конструкции имели следующее расположение в направлении от 5' к 3': промотор CMV или CBh – секреторный пептид – легкая цепь – IRES – секреторный пептид – тяжелая цепь – WPRE-полиА. Присутствие антител измеряли с помощью HTRF с использованием набора анти-hFc (PerkinElmer, Cisbio). Данные, выраженные в концентрации (A) или количестве (B), интерполировали из стандартной кривой в соответствующих апикальных и базолатеральных пространствах. Для того, чтобы обеспечить прямое сравнение оцениваемых условий, в рамках одного эксперимента выполняли от 2 до 3 биологических повторов со средним значением \pm стандартное отклонение.

Настоящее изобретение далее описано посредством следующих примеров. Примеры служат только для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом

Примеры

Пример 1. Конструкции векторов антител

1. Отбор оптимальных клонов для вектора

1.1. Введение

Одной из основных проблем при получении вектора одноцепочечной ДНК (оцДНК) в капсидах AAV является емкость. Размер экспрессионной кассеты содержит а) промотор, б) открытую рамку считывания (кодирующую антитело или фрагмент антитела, обычно включающую тяжелую и легкую цепи) и с) регуляторные элементы по ходу транскрипции. После преобразования ДНК в одноцепочечную и получения вектора на основе капсид AAV рекомендуемый размер не превышает 4,7 тысяч пар оснований, включая 5'ITR и 3'ITR. Конструкции большего размера маловероятно войдут в капсидный комплекс вируса AAV и, таким образом, снизят выход продукции. Самокомплементарные конструкции имеют еще меньшую емкость в пределах 5'ITR и 3'ITR, т.е. не более 2,3 тысяч пар оснований.

Обычно используемые конструкции плазмид AAV (pAAV) антител получены из фрагментов антител меньшего размера и соответствуют экспрессионной кассете, управляемой одним промотором, как например, а) одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела (scFv)[44, 55], б) scFv, слитый с доменом IgG Fc, (scFv-Fc)[56, 57] или с) однодоменные антитела, такие как антитела акул и/или верблюжьих [58-62].

В случае полных антител сложно подобрать гены как легкой, так и тяжелой цепи из-за вышеупомянутых ограничений размера экспрессионной кассеты. На сегодняшний день большинство академических и промышленных исследователей ссылаются на конструкции pAAV, состоящие из открытой рамки считывания, транслированной в слияние самопроцессирующихся белков. В большинстве случаев соответствующий порядок кодирования состоит из 1) тяжелой цепи антитела, 2) сайта распознавания фуриновой протеазы, также известного как PACE (фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот) [63], 3) саморасщепляющегося пептида 2A, облегчающего расщепление фурином [47-49] и, как ожидается, способствующего процессу очистки, а именно E2A, F2A, P2A или T2A, и 4) легкой цепи антитела. Исследователи отдают предпочтение этой конструкции из-за полученных высоких титров экспрессии и эквимоллярности экспрессии цепей антител. Однако в большинстве случаев белки не созревают должным образом с остатками слитых пептидов фурина и 2A, включенными в экспрессируемый белок [64], что потенциально усиливает нежелательную иммуногенность экспрессируемых белков [45].

Различные пептиды 2А обладают разной эффективностью саморасщепления, при этом Т2А и Р2А являются наиболее эффективными, а F2А наименее эффективными [65]. Следовательно, до 50% F2А-связанных белков могут оставаться в клетке в виде слитых белков, что может привести к некоторым непредсказуемым результатам, включая приобретение функции [66]. 2А вызывает отсоединение рибосомы от полинуклеотидов приблизительно в 60% случаев. Вместе с рибосомой считывает приблизительно 10% Р2А и Т2А это приводит к снижению экспрессии пептидной цепи по ходу транскрипции приблизительно на 70% [47]. Кроме того, важно отметить, что пептиды 2А происходят из вирусов, т.е. F2А происходит из вируса ящура 18, E2А происходит из вируса ринита А лошадей, Р2А происходит от свиного тешовируса-1 2А, Т2А происходит от вируса *thosea asigna* 2А. Следовательно, оставшиеся остатки пептида 2А либо в тяжелой цепи, либо в легкой цепи могут рассматриваться иммунной системой млекопитающих и человека как чужеродные.

Менее распространенные конструкции рAAV, альтернативные слияниям фурина/2А для экспрессии антител, используют 1) два промотора, каждый из которых управляет тяжелой и легкой цепями антитела, или 2) один промотор и позиционирование внутреннего аминокислотного сайта рибосомы (IRES, последовательность ДНК, происходящая из вируса энцефаломиокардита) между двумя цепями генов антител. Первый увеличивает ограничения в конструкции рAAV из-за обычно большого размера промоторов, тем самым делая необходимым использование небольших промоторов для контроля генов тяжелых и легких цепей антител и удаления регуляторных элементов 3'ITR, которые могут значительно увеличить титр белка. Второй, конструкция IRES, на сегодняшний день считается плохим экспрессором белка [56, 67-69] и поэтому не принимается во внимание для многих конструкций рAAV (где конструкция IRES экспрессирует гораздо более низкие титры, чем конструкции 2А или фурина 2А).

1.2. Подход к отбору

Авторы настоящего изобретения провели скрининг более 55 конструкций рAAV, которые были получены и исследованы на экспрессию в зависимости от положения компонентов открытой рамки считывания, силы промотора, секретируемых пептидов и слитых пептидов. Различные типы конструкций проиллюстрированы на фиг. 1. Насколько известно, экспрессия полного IgG с использованием векторов AAV, описанных в литературе, включает конструкцию фурина/2А, в которой тяжелая цепь расположена перед легкой цепью (см. фиг.

1, конструкция 2). Согласно настоящему подходу исследовали также другие положения легкой и тяжелой цепи для этого типа конструкции и различные силы промоторов для бицистронных конструкций (фиг. 1, конструкция 4). Кроме того, авторы настоящего изобретения поставили под сомнение сообщенную низкую экспрессию бицистронных конструкций IRES, чередуя положения цепи, используя различные секреторные пептиды и настраивая регуляторные элементы внутри и по ходу транскрипции (фиг. 1, конструкция 3). Наконец, авторы настоящего изобретения протестировали два полных клона антител и соответствующие фрагменты антител (фиг. 1, конструкция 1), такие как scFv-Fc, Fab и scFv, а именно MAB1 (анти-TDP-43 антитело) и MAB2 (антитело-ErbB2 антитело). Кроме того, авторы настоящего изобретения включили клоны, экспрессирующие усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP).

В исследованиях согласно настоящему изобретению определили критерии отбора для определения лучших конструкций rAAV следующим образом: 1) высокий титр белка, 2) низкий уровень агрегатов, 3) точное созревание и укладка и 4) связывание с мишенью.

1.3. Трансфекция клеток яичника китайского хомячка (CHO) и титр супернатанта

Кратко, клетки CHO (ExpiCHO-S™ (ThermoFisher, каталог: A29127)) трансфицировали в соответствии с рекомендациями производителя 1 мкг/мл плазмиды на конструкцию с тремя повторениями. Клетки выращивали в 24 глубоких лунках микропланшетов с оптимизированной синтетической средой при 37°C в течение 24 часов, после чего температуру повышали до 32°C, а затем выращивали в течение 11 дней в конечном объеме приблизительно 3,5 мл среды. Затем оценивали титры в каждой тройке супернатантов с использованием биослойной интерферометрии (BLI) с системой Octet и наконечниками биосенсоров, покрытыми либо а) белком А в случае полноразмерных антител и scFv-Fcs, либо б) моноклональным антителом, связывающим His - меченые белки, в данном случае Fabs, scFvs и EGFP. Для всех измерений строили стандартную кривую с использованием соответствующего и предварительно очищенного белка. Результаты показаны для антител и scFv-Fc на фиг. 2А и для Fab на фиг. 2В.

Наблюдения. В случае IgG MAB1 каждая конструкция с 2 промоторами продуцировала значительные титры в диапазоне приблизительно от 30 до 100 мкг/мл. Удивительно, но с конструкциями фурина и IRES получали приблизительно в 2–10 раз более высокие титры в диапазоне от 150 до 350 мкг/мл, но, что примечательно, только тогда, когда ген легкой цепи располагался перед геном тяжелой цепи в конструкции (LC/HC) по сравнению с

конструкциями IgG с 2 промоторами. Высокие уровни белка в конструкции IgG IRES LC/HC были сопоставимы с конструкцией IgG фурина. Это было неожиданно и, насколько известно, впервые описано, поскольку из уровня техники известно обратное [56, 67-69]. Подобное наблюдение было сделано для конструкций Fab MAB1 на фиг. 2B, что указывает на сходный титр с конструкциями фурина и 2 промоторов. Кроме того, положение легкой цепи перед тяжелой цепью (LC/HC) в конструкциях Fab IRES имеет значительно более высокие титры экспрессии, чем для аналогичной конструкции HC/LC. Собранные данные показывают, что в конструкции IgG или Fab с использованием фурина и IRES легкая цепь, расположенная перед тяжелой цепью, увеличивает титр. Титр значительно выше, чем для аналога HC/LC. Наконец, экспрессия, как оказалось, снижается, когда промотор средней силы SV40 включен в качестве одного из двух промоторов в конструкцию IgG с двумя промоторами.

1.4. Очистка белка и анализ на SDS-PAGE

После этого эксперимента клетки собирали, супернатанты трех повторений разделяли и объединяли для каждого клона. В случае полноразмерного антитела и клонов scFv -Fc белки захватывали с использованием коммерчески доступной смолы белка А и элюировали их 100 мМ глициновым буфером с pH 2,8, дополненным 100 мМ NaCl. Затем белки количественно определяли с помощью спектрофотометрии OD 280 нм с использованием их соответствующего коэффициента экстинкции. В случае конструкций Fab и scFvs использовали коммерчески доступную аффинную колонку для His-меченых белков.

Затем белки разделяли с помощью SDS-PAGE 12-4% и окрашивали кумасси синим. Независимо от концентрации белка в каждую лунку геля загружали по 13 мкл на образец, чтобы: а) провести повторную оценку очищенных титров и б) увидеть любые возможные продукты разрушения. Кроме того, проверку образования межцепочечной дисульфидной связи и надлежащего комплекса при 150 кДа проводили в отсутствие дитиотреитола (DTT), а высвобождения легкой цепи и тяжелой цепи в присутствии дитиотреитола. Полученный гель для очищенных клонов rAAV IgG MAB1 представлен на фиг. 3.

Наблюдения. Все образцы имели правильную конфигурацию дисульфидных связей, и антитела мигрировали при соответствующей молекулярной массе 150 кДа. При восстановлении обе конструкции IgG, 2 промотора и IRES, разделяли при ожидаемой молекулярной массе легкой и тяжелой цепей соответственно ~25 и ~50 кДа. Однако было замечено, что первая цепь конструкции IgG фурина/2А была больше по молекулярной массе,

т.е. тяжелая цепь в конфигурации конструкции HC/LC и легкая цепь в конфигурации LC/HC. Размер каждой конструкции цепи IgG фурин/2A дополнительно исследовали с помощью ЖХ/МС на точность определения пептида. Это подтвердило добавление всего или некоторой части пептида фурин/2A к С-концу либо легкой цепи для конструкции LC/HC, либо тяжелой цепи для конструкции HC/LC (см. фиг. 3, 7 и 8). Напротив, вторая цепь конструкции антитела была процессирована должным образом, и с помощью ЖХ/МС не было обнаружено остатков пептида на N-конце. В целом, все клоны показали низкие уровни разрушения в применяемых условиях культивирования клеток. Белки в случае 2 промоторов и IRES, как оказалось, обладают наиболее точным качеством созревания. Наконец, такие же наблюдения были сделаны с клоном MAB2, другим антителом IgG. В данном случае конструкции фурин/2A также имели большую молекулярную массу для первой цепи конструкции, и добавление пептида фурин/2A было подтверждено ЖХ/МС, тогда как IgG в случае 2 промоторов и IRES имели наиболее точное созревание. Очищенные образцы scFv-Fc MAB1 также разделяли в тех же условиях SDS-PAGE. Результат представлен на фиг. 4.

Наблюдения. Согласно очищенным образцам MAB1, scFv-Fc имеет надлежащее образование межцепочечной дисульфидной связи, и белок мигрирует с ожидаемой молекулярной массой ~100 кДа. Одна цепь высвобождается, когда образец восстанавливают с помощью 5 мМ DTT, и мигрирует при ожидаемой молекулярной массе 50 кДа. В целом, все клоны показали низкие уровни разрушения в используемых условиях культивирования клеток.

1.5. Анализ аффинности связывания полученных посредством трансфекции белков с помощью BLI

Для того, чтобы продемонстрировать, что белки, получаемые посредством системы rAAV, являются функциональными, измеряли их аффинность связывания с С-концевым пептидом ДНК-связывающего белка 43 (TDP-43) TAR с помощью BLI с использованием системы Octet. Кратко, наконечники стрептавидинового биосенсора покрывали 500 нМ С-концевого пептида TDP-43, называемого TP-62. Затем проводили измерения с использованием реакционного буфера, состоящего из PBS, дополненного 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,02% Tween. Реакцию проводили при 30°C. Затем образцы анализировали с двукратными серийными разведениями, начиная с концентрации 100 нМ. Молярности белков вычисляли с использованием соответствующих им коэффициентов экстинкции при OD 280 нм. Ассоциацию образца с пептидом TP-62 оставляли на 900 секунд в реакционном буфере с

последующей диссоциацией на 600 секунд в том же буфере. Биосенсоры регенерировали в 10 мМ глицина, pH 2,0, и нейтрализовали в реакционном буфере перед каждым измерением образца. Собранные данные представлены на фиг. 5 для соответствующих очищенных образцов.

Наблюдения. В целом, все клоны MAB1 являются функциональными и связывают С-концевой пептид TDP-43 с сопоставимой K_D , которая находится в диапазоне $\sim 1-6$ нМ. Конструкции с 2 промоторами и IRES имели подобный R_{max} в диапазоне от $\sim 2,5$ до 3 нМ. Важно отметить, что аффинность K_D конструкций с 2 промоторами не менялась в зависимости от промотора или секреторного пептида, соответственно (промоторные конструкции CMV/CMV, CMV/SV40 или SV40/CMV и секреторный пептид Igk или GH1). Напротив, конструкции IgG HC/LC фурин продуцировали белки с приблизительно удвоенным R_{max} по сравнению с конструкциями с 2 промоторами и IRES, соответственно, $\sim 5-6$ нм по сравнению $\sim 2,5-3$ нм. Кроме того, конструкция IgG LC/HC фурин имеет менее выраженный, но также больший R_{max} , чем ее аналоги с 2 промоторами и IRES, соответственно, $\sim 3,5$ нм по сравнению с $\sim 2,5-3$ нм. В соответствии с системой BLI данные указывают на белки с большей молекулярной массой для конструкций фурин/2A в эквимоллярных концентрациях по сравнению с их аналогами с 2 промоторами и IRES, например, белок IgG HC/LC фурин в условиях анализа. Это наблюдение было подтверждено на следующей стадии анализа с помощью эксклюзионной хроматографии (см. 1.6). Наконец, данные демонстрируют, что функциональные белки IgG и scFv могут быть получены с помощью экспрессионной системы rAAV. Дальнейший анализ Octet описан ниже (см. 1.6).

1.6. Анализ белка посредством эксклюзионной хроматографии по размеру и LC/MS

Очищенные белки затем разделяли эксклюзионной хроматографией по размеру для контроля нарушения разрушения, агрегатов и правильной укладки белков, разделяемых при молекулярной массе 150 кДа в виде мономера. Для этого разделяли 100 мкл очищенного образца на колонке Superdex 200 Increase 10/300GL от G&E Healthcare при 4°C с использованием буфера PBS. Полученные разделения представлены на фиг. 6.

Наблюдения. Для всех конструкций мономеры IgG разделялись, как и ожидалось, при объеме элюирования приблизительно 11,7 мл. Напротив, конструкции IgG фурин имели большие уровни агрегатов, 26% для конструкции LC/HC и 38% для конструкции HC/LC. Кроме того, мономерный пик фуриновой конструкции не совпадает с конструкциями IgG IRES и с 2

промоторами (см. совмещенный фиг. 7) и имеет несколько большую молекулярную массу при разделении, подвергаясь элюированию раньше. Это очевидно в случае конструкции IgG LC/HC фурин, которая элюируется на 0,25 мл раньше. Более высокий уровень агрегатов в конструкциях фурин/2A (фиг. 6, 7 и 8) может отражать сообщаемый неожиданный результат и токсичность белка этого типа [66]. Эти данные подтверждают вышеуказанное измерение BLI, указывающее на более высокую молекулярную массу IgG, полученного посредством фурин/2A. Напротив, белок конструкции IgG IRES показал очень низкий уровень агрегатов 2% и обогащение мономерным белком 98%, таким образом демонстрируя более высокое качество. Белок IgG с 2 промоторами также имел низкий уровень агрегации 13% (хотя и выше, чем у конструкции IRES). Эти результаты идентифицировали IgG LC/HC IRES и LC/HC с 2 промоторами как конструкции с лучшим качеством, выходом экспрессии, стабильностью и потенциально меньшей нежелательной иммуногенностью и/или токсичностью.

2. Получение векторов лидирующих кандидатов MAB1 и MAB2

2.1. Выбор капсида AAV для трансдукции клеток

Как обсуждалось выше, для получения вектора выбирали наилучшие конструкции MAB1 и MAB2, обеспечивающие белки наивысшего качества, а именно: а) конструкции MAB1 IgG IRES LC/HC и IgG LC/HC с 2 промоторами, б) MAB2 IgG LC/HC с 2 промоторами и с) MAB1 scFv-Fc. Панель различных представляющих интерес клеток отбирали для доставки трансдуцированного гена, а именно клетки яичника китайского хомячка (CHO), линию клеток нейробластомы человека, дифференцированную в нейроны, и линию эндотелиальных клеток головного мозга (hCMEC/D3). Для этого получали векторы указанных выше лучших конструкций rAAV в капсидах AAV2, AAV8, AAV9 и AAV10. Полученные ультраочищенные капсиды с низким содержанием эндотоксинов использовали для трансдукции клеток.

2.2. Трансдукция клеток CHO, очистка белков и сравнение титра с трансфицированными теми же клонами

Кратко, лидирующие конструкции в форме вектора использовали для трансфекции культур клеток CHO при 100 тысячах гк (геномные копии)/клетка CHO с тремя повторениями, а затем выращивали в оптимизированной синтетической среде, как указано выше, в 24-луночных микропланшетах с глубокими лунками в течение 24 ч при 37°C с последующим сдвигом температуры на 32°C и затем выращиванием в течение 11 дней в конечном объеме 3,5

мл на лунку. На рост клеток не влияло присутствие AAV. После этого клетки собирали, супернатанты трех повторений разделяли и объединяли для каждого клона. Полноразмерные антитела и клоны scFv-Fc захватывают, как указано выше, с использованием смолы белка А и элюируют их 100 мМ глициновым буфером с pH 2,8, дополненным 100 мМ NaCl. Затем белки количественно определяли с помощью спектрофотометрии OD 280 нм с использованием их соответствующего коэффициента экстинкции. Полученные титры показаны на фиг. 9.

Наблюдение. Все трансдуцированные лидирующие конструкции гена экспрессировали с использованием каждого протестированного капсида AAV. Уровень экспрессии варьируется в зависимости от капсида, используемого для получения вектора, но в целом аналогичен тем же конструкциям, трансфицированным очищенными плазмидами.

2.3. Трансдукции первичных клеток головного мозга крысы и титр антител с использованием анализа ELISA для антигена MAB1

Кратко, первичные клетки крысы получали путем рассечения мозга крыс и выращивали при 37°C в 100 мкл нейробазальной среды с добавлением B27™ (ThermoFisher, каталог: 17504044) в 96-луночных микропланшетах, содержащих 50 тысяч первичных клеток на лунку. Лидирующие конструкции в форме вектора использовали для трансдукции первичных клеток головного мозга крысы при 100 тысяч гк/первичная клетка крысы с тремя повторениями, а затем выращивали в нейробазальной среде с добавлением B27 в течение 7 дней при 37°C. Оценка морфологии посредством микроскопа показала, что присутствие AAV не влияло на клетки. Затем собирали супернатанты трансдукционных клеток для трех повторений для количественного определения титра антител против полноразмерного белка hTDP-43 с помощью ELISA. Кратко, 96-луночные микропланшеты покрывали 1 мкг/мл TDP-43 полной длины человека в течение ночи в буфере PBS при 4°C. Планшеты затем промывали 3 раза PBS с добавлением 0,05% Tween и затем блокировали в течение 1 часа при 37°C с PBS, 0,05% Tween с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина. Собранные супернатанты, содержащие антитела, разводили в блокирующем буфере в 20, 40 и 80 раз, образцы по 50 мкл добавляли в микропланшет и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем планшеты промывали, как указано выше, и инкубировали с анти-человеческим Fc-HRP козьим антителом (abcam, №ab98624), разбавленным при разведении 1/10000 в блокирующем буфере, в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали, как указано выше, и в лунки добавляли 100 мкл субстрата TMB, инкубировали несколько минут при комнатной температуре. После этого реакции HRP

блокировали 50 мкл H_2SO_4 0,16M. Наконец, полученные растворы были красного цвета при 450 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (BioTek). Соответствующие титры антител показаны на фиг. 12. Данные показывают, что клоны MAB1 IgG и scFv-Fc в форме вектора в AAV2 имеют значительно более низкий титр экспрессии в диапазоне от 5 до 50 нг/мл клеточного супернатанта. Напротив, другие кандидаты в форме вектора AAV8, 9 и 10 имеют гораздо более высокие титры IgG и scFv-Fc в диапазоне от ~ 500 до 2000 нг/мл клеточного супернатанта, независимо от системы управления экспрессией (IRES или 2 промотора), за исключением MAB1 в форме вектора в AAV9, экспрессированного под двумя промоторами CMV, с титром ~ 180 нг/мл.

Наблюдение. Все трансдуцированные лидирующие конструкции гена экспрессировали с использованием каждого протестированного капсида AAV. Как указано выше, уровень экспрессии варьируется в зависимости от капсида, используемого для получения вектора, но в целом подобен тем же конструкциям, трансфицированным очищенными плазмидами.

2.4. Анализ посредством SDS-PAGE для проверки созревания белка

Очищенные лидирующие белки разделяли с помощью SDS-PAGE 12-4% и окрашивали кумасси синим. Как и выше, образцы белков загружали одинаково по объему (13 мкл/образец) без согласования загруженных количеств, чтобы проверить измеренные количества по OD 280 нм. Полученное разделение представлено на фиг. 10 для клонов MAB1 rAAV.

Наблюдение. Все образцы имели правильную конфигурацию дисульфидной связи, и антитела мигрировали при соответствующей молекулярной массе 150 кДа, как показано на фиг. 10. При восстановлении обе конструкции IgG с 2 промоторами и IRES разделялись при ожидаемой молекулярной массе легкой и тяжелой цепей, соответственно, ~25 и ~50 кДа. scFv-Fc имеют правильное образование межцепочечной дисульфидной связи, и белок мигрирует при ожидаемой молекулярной массе ~100 кДа. Одна цепь высвобождается, когда образец восстанавливают с помощью 5 mM DTT, и мигрирует при ожидаемой молекулярной массе 50 кДа. В целом, как и ожидалось из предыдущих экспериментов по скринингу, все клоны показали низкие уровни разрушения в принятых условиях культивирования клеток.

2.5. Анализ аффинности связывания белков, полученных трансфекцией и трансдукцией, посредством BLI

Для того, чтобы продемонстрировать, что белки, полученные с использованием системы рAAV, были функциональными, измеряли их аффинность связывания с С-концевым пептидом ДНК-связывающего белка 43 (TDP-43) TAR с помощью BLI с использованием системы Octet в тех же условиях, как описано выше. Кратко, наконечники стрептавидинового биосенсора покрывали 500 нМ С-концевого пептида TDP-43, называемого TP-62. Затем измерения проводили с использованием реакционного буфера, состоящего из PBS, дополненного 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,02% Tween. Реакции проводили при 30°C. Затем образцы анализировали с двукратными серийными разведениями, начиная с концентрации 100 нМ. Собранные данные приведены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1.

| Антитело МАВ1 | K_D (нМ) |
|--|---------------------------|
| IgG стандартный | 5,7 |
| IgG IRES рAAV трансфецированный | 4,7 |
| IgG IRES рAAV в форме вектора | 5,7 |
| IgG 2 промотора рAAV трансфецированный | 4,7 |
| IgG 2 промотора рAAV в форме вектора | 4,3 |
| scFv-Fc стандартный | 12,3 |
| scFv-Fc рAAV трансфецированный | 4,0 |
| scFv-Fc рAAV в форме вектора | 21,25 |

Наблюдение. Данные показывают, что клоны IgG либо из конструкций IRES, либо из конструкций рAAV с 2 промоторами имеют значения K_D, сопоставимые с используемым эталоном (Таблица 1). Кроме того, K_D сопоставимы между типами конструкций, трансфецированными или в форме вектора, в диапазоне от ~ 4 до 6 нМ, что демонстрирует, таким образом, что введение вектора приводит к получению белков высокого качества с ожидаемой аффинностью связывания с целевым антигеном TDP-43. То же самое можно сказать и в отношении белков scFv-Fc, возможно, с небольшими вариациями.

2.6. Клеточная линия нейробластомы человека, и трансдукция клеток ГЭБ, и титры белка в супернатантах клеток

На следующей стадии проверяли, могут ли другие типы клеток, кроме СНО, быть эффективно трансдуцированы с помощью векторов AAV2, 8, 9 и 10 конструкций MAB1 IgG и scFv-Fc, а также отрицательного контроля MAB2 IgG 2 промотора LC/НС. Для этого трансдуцировали клетки нейробластомы человека, которые были дифференцированы в нейроны с использованием обогащенной синтетической среды с добавлением 10 мкМ ретиноевой кислоты и 2% эмбриональной бычьей сыворотки при 37°C и 5% CO₂. Приблизительно 200 тысяч клеток трансдуцировали с тремя повторениями и инкубировали в 24-луночных микропланшетах с 500 мкл среды на лунку. Трансдукцию проводили путем добавления приблизительно 100 тысяч копий генома на клетку. Титры как IgG, так и scFv-Fc MAB1 в форме вектора определяли с помощью ELISA. Аналогичный эксперимент проводили с клетками hCMEC/D3, дифференцированными в микрососуды гематоэнцефалического барьера (см. процедуру в следующих примерах). В данном случае клетки гематоэнцефалического барьера выращивали либо при 50 тысяч, либо при 100 тысяч на лунку, 37°C, 5% CO₂, и трансдуцировали 50 тысяч копий генома (кг) на клетку AAV вектора конструкции MAB1 IgG IRES LC/НС. В случае обоих типов клеток среду меняли каждые 3 дня. Кратко, 96-луночные микропланшеты покрывали полноразмерным белком TDP-43, а затем насыщали буфером PBS с добавлением 1% сывороточного бычьего альбумина и 0,05% Tween. Затем образцы добавляли в лунки микропланшета и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Параллельно добавляли соответствующие стандарты образцов, начиная с концентрации 2 мкг/мл, а затем последовательно разбавляли в 2 раза с использованием того же буфера, что и образцы (буфер PBS, дополненный 1% сывороточного бычьего альбумина и 0,05% Tween). Планшеты промывали буфером PBS с добавлением 0,05% Tween. После этого в планшеты добавляли анти-IgG человека Fc антитело, меченное пероксидазой хрена, в буфере PBS, дополненном 1% сывороточного бычьего альбумина и 0,05% Tween, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали, как описано выше, и в лунки добавляли субстрат пероксидазы хрена (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, называемый ТМВ), инкубировали в течение приблизительно 5-10 мин при комнатной температуре и реакции останавливали с помощью 0,5 М H₂SO₄. Затем образцы считывали по отдельности на устройстве для считывания микропланшетов при оптической плотности 450 нм. Собранные данные представлены на фиг.

11 и сравнивали с указанными выше очищенными титрами, полученными с помощью тех же СНО-трансдукций векторами лидирующих конструкций MAB1.

Наблюдение. Оба трансдуцированные коммерчески доступные типы клеток, дифференцированные нейроны из линии клеток нейробластомы человека и клеточная линия эндотелиальных клеток головного мозга (hCMECD/3), продуцировали функциональные MAB1 IgG и scFv-Fc, способные связывать полноразмерный белок TDP-43 (фиг. 11). В целом, антитело и производное продуцируются с течением времени в большом количестве (см. среднюю панель, день 18 для дифференцированной линии клеток нейробластомы человека). Они представляют собой среднее значение приблизительно 0,2–1 пг антител/клетка/день, что является устойчивой клеточной экспрессией, аналогичной экспрессии клеток СНО, выращенных при более высокой плотности клеток (приблизительно 10 миллионов/мл), экспрессирующих около 0,5–4 пг /клетка/день. В этих экспериментах полученные титры выше для AAV2 вектора MAB1 IgG и scFv-Fc. Кроме того, титры scFv-Fc выше для каждого вектора AAV8, 9 и 10 по сравнению с аналогичными векторами IgG. Титры дифференцированной клеточной линии нейробластомы человека конструкции IRES были выше, чем у аналогичной конструкции с 2 промоторами, в зависимости от капсида, использованного для получения вектора. Наконец, MAB2 вектора IgG 2 промотора LC/HC не был обнаружен из-за его свойства связывать другой специфический антиген, отличный от TDP-43 (см. среднюю панель). В заключение, собранные данные подтверждают более раннее наблюдение, указывающее на то, что конструкции IgG IRES достигают более высоких титров экспрессии, чем 2 промотора, при использовании конфигурации LC/HC.

Таблица 2. Последовательности нуклеиновых кислот, используемые в конструкциях векторов антител:

| Описание последовательности | Последовательность нуклеиновой кислоты |
|--|--|
| Последовательность внутреннего аминокислотного сайта рибосомы (IRES) | GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACG TTA CTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAG GCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATT TTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAAT GTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTC TTCTTGACGAGCATTCCCTAGGGGTCTT |

| | |
|---|--|
| | <p>TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGT CTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTT CCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA ACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAG CGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTG CCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATA AGATACACCTGCAAAGGCGGCACAAC CCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAG TTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCT CAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG GATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATG GGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACA TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTA AAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCA CGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAAC ACGATGATAATATGGCCACAACC (SEQ ID NO: 1)</p> |
| <p>Мышиный MAB2, промотор-LC-IRES-НС- WPRE</p> | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTCTTCTAGACAACCTTTGTATA GAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATC AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC GCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTC AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC CCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA</p> |

TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG
TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT
TTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCA
ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATC
AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
TAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC
AGATCCAAGTTTGTACAAAAAGCAG
GCTGCCACCATGGAGACAGATACT
GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGT
GCCAGGATCTACAGGCGACATCGTGAT
GACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCA
CCAGCGTGGGCGACAGAGTGCCATC
ACATGCAAGGCCAGCCAGGACGTGAA
CACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAA
GCCCCGCCATTCTCCTAAGCTGCTGAT
CTACAGCGCCAGCTTCAGATAACCGG
CGTGCCCGATAGATTCACCGGCAACAG
AAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCAT
CAGCTCTGTGCAGGCCGAGGATCTGGC
CGTGTACTACTGTCAGCAGCACTACAC
CACACCTCCAACCTTCGGCGGAGGCAC
CAAGGTGGAAATCAAGAGAGCTGACG
CCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCACC
TAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCG
GAGCCTCTGTCGTGTGCTTCTGAACA

ACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGA
AGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGA
CAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGGACC
GACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA
CAGCATGAGCAGCACCCCTGACACTGA
CCAAGGACGAGTACGAGAGACACAAC
AGCTACACATGCGAGGCTACCCACAA
GACCAGCACAAGCCCCATCGTGAAGT
CCTTCAACAGAAACGAGTGCTGAACCC
AGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCCCTC
TCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGG
CCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGT
GTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCAC
CATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAG
GGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTT
GACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCC
TCTCGCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT
GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCT
GGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGT
CTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGA
ACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCT
GCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGAT
ACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCA
GTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGT
GGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAA
GCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGAT
GCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGA
TCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGC
TTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAA
AAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGG
GGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACG
ATGATAATATGGCCACAACCATGGAG

ACAGATACTGCTGCTGTGGGTGCTG
CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGC
CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCT
GAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCTCTG
AAGCTGAGCTGTACCGCTTCCGGCTTC
AACATCAAGGACACCTACATCCACTGG
GTCAAGCAGAGGCCTGAGCAGGGACT
CGAGTGGATCGGCAGAATCTACCCAC
CAACGGCTACACCAGATACGACCCCA
AGTTCCAGGACAAGGCCACCATCACA
GCCGACACCAGCAGCAACACAGCCTA
TCTCCAGGTGTCCAGGCTGACCAGCGA
GGACACAGCCGTGTACTACTGCTCTAG
ATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCCAT
GGATTATTGGGGACAGGGCGCCAGCG
TGACAGTGTCTAGTGCCAAGACAACA
GCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCTCCT
GTGTGTGGCGACACAACAGGCAGCTCT
GTGACACTGGGCTGTCTGGTCAAGGGC
TACTTCCCCGAACCAGTGACACTGACC
TGGAACAGCGGCTCTCTGTCTAGCGGC
GTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAG
AGCGACCTGTACACACTGTCCTCTAGC
GTGACCGTGACCAGCTCTACATGGCCC
AGCCAGAGCATCACCTGTAACGTGGCC
CATCCTGCCAGCAGCACCAAGGTGGA
CAAGAAGATCGAGCCTAGAGGCCCTA
CCATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAGT
GCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGGCC
CAAGCGTGTTTCATCTTCCACCTAAGA
TCAAGGACGTGCTGATGATCTCTCTGA
GCCCCATCGTGACCTGCGTGGTGGTGG

ATGTGTCTGAGGACGACCCTGACGTGC
AGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGG
AAGTGCACACAGCCCAGACACAGACC
CACAGAGAGGACTACAACAGCACCT
GAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTATCCA
GCACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAG
AATTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAG
GACCTGCCTGCTCCTATCGAGAGAACC
ATCAGCAAGCCCAAGGGCTCTGTCAG
GGCTCCTCAGGTGTACGTTCTGCCACC
TCCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAAC
AAGTGACCCTCACCTGTATGGTCACCG
ACTTCATGCCCCGAGGACATCTACGTGG
AATGGACCAACAACGGCAAGACCGAG
CTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGT
GCTGGACAGCGACGGCAGCTACTTCAT
GTACAGCAAGCTGCGCGTTCGAGAAGA
AGAACTGGGTCGAGAGAAACAGCTAC
AGCTGCTCCGTGGTGCACGAGGGACTG
CACAACCACCACACCACCAAGAGCTTC
AGCAGAACCCCTGGCAAGTGACAACT
TTATTATACATAGTTGGAATTCCGATA
ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTG
AAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG
TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG
CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTAT
TGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCC
TCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTC
TTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCA
GGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT
TTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGG
GCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTT

| | |
|--|--|
| | <p>CCGGGACTTTCGCTTCCCCCTCCCTAT TGCCACGGCGGAACATCGCCGCTG CCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCG GCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGT GTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTCC ATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTG GATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTA CGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGA CCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGC TCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTT CGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTT TGGGCCGCCTCCCCGCATCGGGAATTC CTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTG TGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT TTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC CTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTT TCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG CAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATA GCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGG AACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTC CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGA CGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG (SEQ ID NO: 2)</p> |
| Мышиный MAB2 – IgG с 2 промоторами, состоящий из промотора 1 (CMV)-LC-полиА-промотора 2 (CMV)-HC-WPRE-поли А | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG</p> |

AGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTA
GGGGTTCCTTCTAGACAACCTTTGTATA
GAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATC
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC
ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT
TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
GCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG
TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT
TTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTC
ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATC
AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
TAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC
AGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAG
GCTGCCACCATGGAGACAGATACT
GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGT
GCCAGGATCTACAGGCGACATCGTGAT
GACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCA
CCAGCGTGGGCGACAGAGTGTCCATC
ACATGCAAGGCCAGCCAGGACGTGAA
CACAGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAA

GCCCGGCCATTCTCCTAAGCTGCTGAT
CTACAGCGCCAGCTTCAGATACACCGG
CGTGCCCGATAGATTCACCGGCAACAG
AAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCAT
CAGCTCTGTGCAGGCCGAGGATCTGGC
CGTGTACTACTGTCAGCAGCACTACAC
CACACCTCCAACCTTCGGCGGAGGCAC
CAAGGTGGAAATCAAGAGAGCTGACG
CCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCACC
TAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGCG
GAGCCTCTGTCTGTGCTTCCTGAACA
ACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGA
AGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGA
CAGAACGGCGTGCTGAACTCTTGGACC
GACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA
CAGCATGAGCAGCACCTGACACTGA
CCAAGGACGAGTACGAGAGACACAAC
AGCTACACATGCGAGGCTACCCACAA
GACCAGCACAAGCCCCATCGTGAAGT
CCTTCAACAGAAACGAGTGCTGACAG
ACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG
GACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGA
AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGT
GATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTA
TAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAAC
AACCAATTGCATTCATTTTATGTTTCAG
GTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTT
TAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGT
GGTATAGTTATTAATAGTAATCAATTA
CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA
TGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG
TAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA

ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAA
TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACT
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC
CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATG
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATG
CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC
CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG
TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGT
TTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT
AGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAA
GTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGA
GTTTGT TTTGGCACCAAATCAACGGG
ACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCG
CCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGG
CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
AGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC
ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCC
ACCATGGAGACAGATACTGCTGCTG
TGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAGGA
TCTACAGGCCAGGTTTCTGCTGCAGCAG
TCTGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGC
GCCTCTCTGAAGCTGAGCTGTACCGCT
TCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
ATCCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGA
GCAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAA
TCTACCCACCAACGGCTACACCAGAT
ACGACCCCAAGTTCCAGGACAAGGCC
ACCATCACAGCCGACACCAGCAGCAA
CACAGCCTATCTCCAGGTGTCCAGGCT
GACCAGCGAGGACACAGCCGTGTACT

ACTGCTCTAGATGGGGAGGCGACGGC
TTCTACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGCGCCAGCGTGACAGTGTCTAGTGCC
AAGACAACAGCCCCTAGCGTGTACCCT
CTGGCTCCTGTGTGTGGCGACACAACA
GGCAGCTCTGTGACACTGGGCTGTCTG
GTCAAGGGCTACTTCCCCGAACCAGTG
ACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTG
TCTAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCC
GTGCTGCAGAGCGACCTGTACACACTG
TCCTCTAGCGTGACCGTGACCAGCTCT
ACATGGCCCAGCCAGAGCATCACCTGT
AACGTGGCCCATCCTGCCAGCAGCACC
AAGGTGGACAAGAAGATCGAGCCTAG
AGGCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCC
ATGCAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCT
CGGAGGCCCAAGCGTGTTTCATCTTCCC
ACCTAAGATCAAGGACGTGCTGATGAT
CTCTCTGAGCCCCATCGTGACCTGCGT
GGTGGTGGATGTGTCTGAGGACGACCC
TGACGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAA
CAACGTGGAAGTGCACACAGCCCAGA
CACAGACCCACAGAGAGGACTACAAC
AGCACCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTG
CCTATCCAGCACCAGGATTGGATGAGC
GGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAA
CAACAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGA
GAGAACCATCAGCAAGCCCAAGGGCT
CTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTT
TGCCACCTCCTGAGGAAGAGATGACC
AAGAAACAAGTGACCCTCACCTGTATG
GTCACCGACTTCATGCCCCGAGGACATC

| | |
|--|--|
| | <p>TACGTGGAATGGACCAACAACGGCAA GACCGAGCTGAACTACAAGAACACCG AGCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TACTTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTC GAGAAGAAGAAGCTGGGTCGAGAGAAA CAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGA GGGACTGCACAACCACCACACCACCA AGAGCTTCAGCAGAACCCCTGGCAAG TGACAACTTTATTATACATAGTTGGAA TTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG TTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTT GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGT CCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGC ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTC TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAG AATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCG CAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT GCCTGCAGG (SEQ ID NO: 3)</p> |
| <p>Мышиный MAB1, промотор-LC-IRES укороченный-НС-WPRE</p> | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTCCCTTAGACAACCTTTGTATA GAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATC</p> |

AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC
ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT
TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
GCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA
ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG
TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT
TTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCA
ATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAATC
AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
TAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC
AGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAG
GCTGCCACCATGGAGACAGATACT
GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGT
GCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTCAT
GACACAGACCCCTCTGACACTGAGCGT
GACCATCGGACAGCCTGCCAGCATCA
GCTGCAAGAGCAGTCAGAGCCTGCTG
CACAGCGACGGCAAGACCTACCTGAA
CTGGCTGCTGCAAAGACCCGGCCAGTC
TCCTAAGAGGCTGATCTACCTGGTGTC
CAAGCTGGACAGCAGAATCCCCGACA

GATTCACAGGCAGCGGCTCTGGCACA
GACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTG
GAAGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTA
CTGTTGGCAGGGCACACACTTCCCTCA
CACATTCGGCGCTGGCACAAAGCTGG
AACTGAAGAGAGCTGACGCCGCTCCT
ACCGTGTCTATCTTCCCACCTAGCAGC
GAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCT
GTCGTGTGCTTCCCTGAACAACTTCTAC
CCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAA
GATCGACGGCAGCGAGAGACAGAACG
GCGTGCTGAACTCTTGGACCGACCAGG
ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCATG
AGCAGCACCCCTGACACTGACCAAGGA
CGAGTACGAGAGACACAACAGCTACA
CATGCGAGGCTACCCACAAGACCAGC
ACAAGCCCCATCGTGAAGTCCTTCAAC
AGAAACGAGTGCTGAGCCCCTCTCCCT
CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAA
GCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGT
TTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATT
GCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCG
GAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG
CATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCC
AAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTC
GTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCT
TCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCG
ACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCA
CCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAA
AAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCA
AAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGT
TGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGT

CAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAA
CAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGG
TACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGG
GGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTG
TTTAGTCGAGGTAAAAAACGTCTAG
GCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTT
TCCTTTGAAAAACACGATGATAATATG
GAGACAGATACTGCTGCTGTGGGTG
CTGCTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACA
GGCGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGG
ACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTC
CGTGAAGATCAGCTGCAAGACAAGCG
GCTTCACCTTCACCGAGTACAGCATGC
ACTGGGTCAAGCAGAGCCACGGCAAG
AGCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAA
CCCTAACAACGGCGGCACCAGCTACA
ACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCCACA
CTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCAC
CGCCTACATGGAAGTGAAGAAGCCTGA
CCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACT
GTGCCAGAGAGTCTTGGGGCCAGGGC
ACAACCCTGACAGTCTCTTCTGCCAAG
ACAACAGCCCCTAGCGTGTACCCTCTG
GCTCCTGTGTGTGGCGACACAACAGGC
AGCTCTGTGACACTGGGCTGTCTGGTC
AAGGGCTACTTCCCCGAACCAGTGACA
CTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGTCT
AGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTG
CTGCAGAGCGACCTGTACACACTGTCC
TCTAGCGTGACCGTGACCAGCTCTACA
TGGCCCAGCCAGAGCATCACCTGTAAC
GTGGCCCATCCTGCCAGCAGCACC AAG

GTGGACAAGAAGATCGAGCCTAGAGG
CCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCATG
CAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGG
AGGCCCAAGCGTGTTTCATCTTCCCACC
TAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTC
TCTGAGCCCCATCGTGACCTGCGTGGT
GGTGGATGTGTCTGAGGACGACCCTGA
CGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAA
CGTGGAAGTGCACACAGCCCAGACAC
AGACCCACAGAGAGGACTACAACAGC
ACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCT
ATCCAGCACCAGGATTGGATGAGCGG
CAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAACA
ACAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGA
GAACCATCAGCAAGCCCAAGGGCTCT
GTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTCTG
CCACCTCCTGAGGAAGAGATGACCAA
GAAACAAGTGACCCTCACCTGTATGGT
CACCGACTTCATGCCCCGAGGACATCTA
CGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGA
CCGAGCTGAACTACAAGAACACCGAG
CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTAC
TTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAG
AAGAAGA ACTGGGTCGAGAGAAACAG
CTACAGCTGCTCCGTGGTGCACGAGGG
ACTGCACAACCACCACACCACCAAGA
GCTTCAGCAGAACCCCTGGCAAGTGA
ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAA
TTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAA
AATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCT
TAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGT
GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTAT

CATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCA
TTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTT
GCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCC
CGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTG
CACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCAC
TGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCA
GCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCC
CTCCCTATTGCCACGGCGGAATCATC
GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA
GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT
TCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACG
TCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTG
CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCT
TCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC
CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGC
TGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTC
TTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGA
TCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATC
GGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGC
CTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCC
ATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCT
TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAA
ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGT
CATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG
CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA
AGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGG
GCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT
GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC
GCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCACGCCCAGGGCTTTGCCCGGG

| | |
|---|--|
| | <p>CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC AGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 4)</p> |
| <p>MAB1 промотор-LC-IRES-HC-WPRE- PolyA</p> | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGC TACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGTATA GAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATC AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC ATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC GCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA TGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGC GTGGATAGCGGTTTGA CTCACGGGGAT TTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCA ATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAATC AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCG GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA TAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC AGATCCAAGTTTGTACAAAAAAGCAG</p> |

GCTGCCACCATGGAGACAGATACT
GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGT
GCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTCAT
GACACAGACCCCTCTGACTGTCCGT
GACCATCGGACAGCCTGCCTCCATCTC
CTGCAAGTCCTCTCAGTCCCTGCTGCA
CTCTGACGGCAAGACCTACCTGAACTG
GCTGCTGCAGAGGCCTGGCCAGAGTCC
TAAGAGACTGATCTACCTGGTGTCCAA
GCTGGACTCTCGGATCCCTGACAGATT
CACCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTT
CACCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAG
CCGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGTT
GGCAGGGCACCCACTTTCCACACACCT
TTGGCGCTGGCACAAAGCTGGAAGT
AAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTG
TTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAG
CTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTG
TGCCTGCTGAACAATTCTACCCTCGG
GAAGCCAAGGTGCAGTGGGAAGGTGGA
CAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCA
AGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCA
AGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCA
CACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACG
AGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAA
GTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCT
GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAG
TGTTGAACCCAGCTTTCTTGTACAAAG
TGGGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTA
ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAAT
AAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGT
TATTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGG

CAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCC
CTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGG
GTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGC
AAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAA
GCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGA
CAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTC
AGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGA
CAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCAC
GTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCG
GCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGT
TGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATG
GCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGG
GCTGAAGGATGCCAGAAGGTACCCC
ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTC
GGTGACATGCTTTACATGTGTTTAGT
CGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCC
CCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTT
TGAAAACACGATGATAATATGGCCA
CAACCATGGAGACAGATACTGCTG
CTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCA
GGATCTACAGGCGAGGTTTCAGCTGCA
GCAGTCTGGACCTGAGCTGGTTAAGCC
TGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAA
GACCTCTGGCTTCACCTTCACCGAGTA
CTCCATGCACTGGGTCAAGCAGTCCCA
CGGCAAGTCCCTGGAATGGATCGGCG
GCATCAACCCTAACAACGGCGGCACCT
CCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAA
GCTACCCTGACCGTGGACAAGTCCTCC
TCCACCGCCTACATGGAAGTGCAGTCC
CTGACCTCTGAGGACTCCGCCGTGTAC
TACTGCGCTAGAGAGTCTTGGGGCCAG

GGCACCACACTGACAGTCTCTTCTGCT
TCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCT
CTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCT
GGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTG
ACCGTGTCTTGGA ACTCTGGCGCTCTG
ACATCCGGCGTGCACACCTTTCAGCT
GTGCTGCAATCCAGCGGCCTGTACTCT
CTGTCCTCCGTCGTGACCGTGCCTTCT
AGCTCTCTGGGCACACAGACCTACATC
TGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACC
CAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTG
TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCT
CGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC
TCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG
GTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCC
GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC
CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACA ACT
CCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGA
CCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG
GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAA
AAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCA
GCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTT
GCCTCCATCTCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCG
TGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCG
CCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAG
CCTGAGAACA ACTACAAGACAACCC

TCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT
CTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGA
CAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACG
TGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGG
CCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGT
CCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAGTAGC
AACTTTATTATACATAGTTGGAATTCC
GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATT
TGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAC
TATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT
ACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG
CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTT
CTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTG
TCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT
GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACT
GTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGT
TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC
CTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCTCC
CTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCG
CCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGG
CTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCG
TGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCTT
TTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCA
CCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCT
GCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAG
CGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGC
CGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTC
GCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT
CCCTTTGGGCCGCTCCCCGCATCGGG
AATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCC

| | |
|---|--|
| | <p>TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT GTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA GAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCC GCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGGTC GCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 5)</p> |
| <p>MAb1 - IgG с 2 промоторами, состоящий из промотора 1 (CMV)-LC-полиА-промотора 2 (CMV)-HC-WPRE-поли А</p> | <p>CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCCCGG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTA GGGGTTCCTTCTAGACAACTTTGTATA GAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATC AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC ATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCTGACC GCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT CAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGC ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGG ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG</p> |

TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA
TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGAT
TTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCA
ATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATC
AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACA
ACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
TAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTC
AGATCCAAGTTTGTACAAAAAGCAG
GCTGCCACCATGGAGACAGATACT
GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGT
GCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTCAT
GACACAGACCCCTCTGACACTGTCCGT
GACCATCGGACAGCCTGCCTCCATCTC
CTGCAAGTCCTCTCAGTCCCTGCTGCA
CTCTGACGGCAAGACCTACCTGAACTG
GCTGCTGCAGAGGCCTGGCCAGAGTCC
TAAGAGACTGATCTACCTGGTGTCCAA
GCTGGACTCTCGGATCCCTGACAGATT
CACCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTT
CACCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAG
CCGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGTT
GGCAGGGCACCCACTTTCCACACACCT
TTGGCGCTGGCACAAAGCTGGAACTG
AAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTG
TTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAG
CTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTG
TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGG
GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCA
AGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCA

AGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCA
CACTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACG
AGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAA
GTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCT
GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAG
TGTTGACAGACATGATAAGATACATTG
ATGAGTTTGGACAAACCACA ACTAGA
ATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGT
GAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG
TAACCATTATAAGCTGCAATAACAAG
TTAACAACAACAATTGCATTCATTTTA
TGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGG
AGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCT
ACAAATGTGGTATAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG
CCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTG
ACCGCCCAACGACCCCGCCATTGAC
GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA
TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA
CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG
GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG
GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
GATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG
ATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGT
CAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAA
TCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAA

CAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGG
CGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT
ATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC
GTCAGATCACCCAGCTTTCTTGTACAA
AGTGGGCCACCATGGAGACAGATACA
CTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGG
GTGCCAGGATCTACAGGCGAGGTTCA
GCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGT
TAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGATCTC
CTGCAAGACCTCTGGCTTCACCTTAC
CGAGTACTCCATGCACTGGGTCAAGCA
GTCCCACGGCAAGTCCCTGGAATGGAT
CGGCGGCATCAACCCTAACAACGGCG
GCACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGG
GCAAAGCTACCCTGACCGTGGACAAG
TCCTCCTCCACCGCCTACATGGAACTG
CGGTCCCTGACCTCTGAGGACTCCGCC
GTGTACTACTGCGCTAGAGAGTCTTGG
GGCCAGGGCACCACACTGACAGTCTCT
TCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTG
TTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCT
ACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAG
CCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGC
GCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTT
CCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGGCCTG
TACTCTCTGTCCTCCGTCGTGACCGTG
CCTTCTAGCTCTCTGGGCACACAGACC
TACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCT
TCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT
GGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCC
ACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAG

AACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCC
TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCC
TGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGA
CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACG
AGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC
GCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA
GTACA ACTCCACCTACAGAGTGGTGTC
CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA
AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTC
CTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCA
AGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTT
TACACCTTGCCTCCATCTCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCC
GATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAAT
GGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGAC
AACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGG
CTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGAC
AGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGG
GCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGC
ACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCC
AGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCA
AGTAGCAACTTTATTATACATAGTTGG
AATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCC
TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC ACT
GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATT
GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAT
TCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAG

| | |
|-----------------------------|--|
| | <p>GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA GAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCC GCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC GCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG CTGCCTGCAGG</p> <p>(SEQ ID NO: 6)</p> |
| MAB1, промотор-scFv-Fc-WPRE | <p>cctgcaggcagctgcgcgctcgctcactgaggccgcc gggcaaagcccggcgctgggcgaccttggctgcccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactc catcactaggggtccttctagacaactttagataaaaagtgtg gttattaatagtaataaattacgggggtcattagttcatagcccatat atggagttccgcttacataacttacgtaaatggcccgcctgg ctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacg tatgtcccatagtaacgcaatagggacttccattgacgtcaat gggtggagtatttacgtaaaactgccacttggcagtacatcaa gtgtatcatatgccaagtagccccctattgacgtcaatgacggt aaatggcccgcctggcattatgccagtagacattatggga cttctacttggcagtagctacgtattagtagctgctattacca tgggtgatgcggttttggcagtagcatcaatggcggtgatagagg ttgactcacggggatttcaagtctccaccattgacgtcaat gggagttgttttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgt cgtaacaactccgcccattgacgcaaatggcggttaggcgt gtacggtgggaggtctatataagcagagctggttagtgaacc gtcagatccaagttgtacaaaaagcaggctgccaccatgga gacagatacactgctgctggtgctgctcctctgggtgccag gatctacaggcgaggttcagctgagcagctctggacctgagct ggttaagcctggcgctccgtgaagatctcctgcaagacctctg gcttcacctcaccgagtactccatgactgggtcaagcagctcc cacggcaagtccctggaatggatcggcgcatcaaccctaac</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>aacggcggcacctcctacaaccaagaagttcaagggcaaagct accctgaccgtggacaagtctctcctccaccgctacatggaac tgcggtccctgacctctgaggactccgccgtgtactactgcgct agagagtcttggggccagggcaccactgacagtctctctg gaggcggaggatctggcggaggagggaagtggcggaggcgg atctgacgtggtcatgacacagaccctctgacactgtccgtga ccatcggacagcctgcctccatctctgcaagtcctctcagtcc ctgctgcactctgacggcaagacctacctaactggctgtgc agaggcctggccagagtctaagagactgatctacctggtgtc caagctggactctcggatccctgacagattaccggctctggct ctggcaccgacttcaccctgaagatctccagagtggaagccga ggacctgggcgtgtactactgttggcagggcaccactttcca cacaccttggcgtggcacaagctggaactgaaggaggc ggaggatctgacaagaccacacctgtctccatgtctgtctcc agaactgctcggcggaccttccgtgttctgttctccaaagcc taaggacacctgatgatctctcggaccctgaagtgacctgc gtggtggtgatgtgtctcacgaggatcccgaagtgaagtca attggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacca agcctagagaggaaacagtacaactccacctacagagtgggtgc cgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaaga gtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctgtctctatc gaaaagaccatctccaaggccaaggccagcctagggaacc ccaggttacacctgcctccatctcgggaagagatgaccaag aaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggtcttaccctc cgatatcgcggtggaatgggagttaatggccaagcctgagaac aactacaagacaaccctcctgtgctggactccgacggctcatt cttctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcag cagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggccctgc acaatcactaccccagaagtcctgtctctgagccccggcaa gtagaccagcttctgtgtaaaagtggaattccgataatcaac ctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactat gttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgccttgtat</p> |
|--|--|

| | |
|--|---|
| | catgctattgctcccgtatggcttcattttctcctcctgtataaat cctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggc aacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccact ggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttc gctttccccctccctattgccacggcggaaactcatcgccgcctg ccttggccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgac aattccgtggtgttgcggggaagctgacgtcctttccatggctg ctgcctgtgttgccacctggattctgcgaggacgtccttctgc tacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccggg cctgctgccggctctgcggccttctccgcttctgccttgc ctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcatcg ggaattcctagagctcgcctgatcagcctcactgtgccttctagt tgccagccatctgttgtttgccccccccctgccttcttgaacc tggaagggtccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaa attgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtg gggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaa tagcaggcatgctggggagggccgaggaacccctagtgat ggagtggcactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgag gccgggacgacaaaggctgcccgacgcccgggctttgcccg ggcggcctcagtgagcagcagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 7) |
| Укороченная последовательность внутреннего аминокислотного сайта рибосомы (IRES укороченный) | GCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACG T TACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAG GCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATT TTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAAT GTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTC TTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTT TCCCCTCTCGCAAAGGAATGCAAGGT CTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTT CCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA ACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAG CGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTG |

| | |
|--|--|
| | <p>CCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATA AGATACACCTGCAAAGGCGGCACAAC CCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAG TTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCT CAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG GATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATG GGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACA TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTA AAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCA CGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAAC ACGATGATAAT (SEQ ID NO: 8)</p> |
| <p>MAB1 FAB промотор-LC-IRES-HC-WPRE- PolyA</p> | <p>cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgcc gggcaaagcccggcgctgggacgaccttggcgcccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactc catcactaggggtccttctagacaactttagataaaaagtga gttattaatagtaataaattacgggggtcattagtcatagccat atggagttccgcttacataactacggtaaatggcccgcctgg ctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacg tatgtccatagtaacgcaataggacttccattgacgtcaat gggtggagtattacggtaactgccacttggcagtacatcaa gtgtatcatatgccaagtagccccctattgacgtcaatgacggt aaatggcccgcctggcattatgccagtagacattatggga cttctacttggcagtagctacgtattagtcacgctattacca tggatgagcgggtttggcagtagcatcaatggcgctggatagcgg ttgactcacggggattccaagtctccccattgacgtcaat gggagttgtttggcaccaaaatcaacgggacttccaaaatgt cgtacaactccgccccattgacgcaaatggcggtaggcgt gtacggtgggaggtctatataagcagagctggttagtgaacc gtcagatccaagttgtacaaaaagcaggtgccaccatgga gacagatacactgctgctggtgctgctcctctgggtgccag gatctacaggcgacgtggtcatgacacagaccctctgacact</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>gtccgtgaccatcggacagcctgcctccatctcctgcaagtct ctcagtcctgctgcaactctgacggcaagacctacctaactg gctgctgagaggcctggccagagtctaagagactgatctac ctggtgtccaagctggactctcggatccctgacagattcaccgg ctctggctctggcaccgacttcaacctgaagatctccagagtgg aagccgaggacctgggctgtactactgttggcagggcacc actttccacacaccttggcgtggcacaagctggaactgaa gaggacagtggccgctcctcctcgtgttcatcttccacctcca cgagcagctgaagtccggcacagcttctgctgtgcctgctg aacaacttctacctcgggaagccaaggtgcagtggaaagtg gacaatgccctgcagtccggcaactccaagagtctgtgaccg agcaggactccaaggacagcacctacagcctgtcctccacct gacctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgacgc ctgcaagtgacctacagggcctgtctagccctgtgaccaag tcttcaaccggggcagtggtgaaccagcttctgtacaaag tgggccctctcctccccccccctaacgttactggccgaag ccgcttgaataaggccggtgtgcgttctctatatgttatttcca ccatattgccgtcttggcaatgtgagggcccgaaacctggc cctgtcttctgacgagcattcctaggggtcttccccctctgcca aaggaaatgcaaggtctgttgaatgctgtgaaggaagcagttct ctggaagcttctgaaacaaacacgtctgtagcacccttgg caggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcg gcaaaaagccaagtgtataagatacacctgcaaggcggcac aacccagtgccacgtgtgagttggatagttgtgaaagagtc aaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatg cccagaaggtaacccattgtatgggatctgatctggggcctcg gtgcacatgcttcatgtgttagtcgaggftaaaaaacgtcta ggcccccgaaaccacggggacgtggtttccttgaaaaacac gatgataatatggcacaacctggagacagatacactgctgc tgtgggtgctcctctgggtgccaggatctacaggcgaggtt cagctgcagcagcttgacctgagctggttaagcctggcgct ccgtgaagatctcctgcaagacctctggctcacctcaccgag</p> |
|--|---|

| | |
|--|---|
| | <p>tactccatgcactgggtcaagcagtcccacggcaagtcctgg aatggatcggcggcatcaaccetaacaacggcggcacctct acaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgaccgtggaca agtcctcctccaccgcctacatggaactgcggtcctgacctt gaggactccgccgtgtactactgcgctagagagtcttggggcc agggcaccacactgacagtctcttctgcttctaccaagggaacc agcgtgtccctctggctcctccaagcaagtctaccttggcgg aacagctgctctggctgcctgggtcaaggactcttctgagc ctgtgaccgtgtcttggaaacttggcgtctgacatccggcgtg cacaccttccagctgtgctgcaatccagcggcctgtactctg tctccgtcgtgaccgtgccttctagctctctgggcacacagac ctacatctgcaatgtgaaccacaagcctccaacaccaaggtg gacaagaaggtggaaccaagtctcgggctcccaccacat caccatcattagcaactttattatacatagttggaattccgataatc aacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggattcttaa ctatgtgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgccttt gtatcatgctattgcttcccgtatggcttccatttctcctctgtat aaatcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggccggtgtca ggcaacgtggcgtgggtgctgactgtgttctgacgcaacccc cactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccggga cttctgcttccccctcctattgccacggcggaaactcatgccc cctgccttcccgcgtgctggacaggggctcggctgttgggac tgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatg gctgctgcctgtgtgccacctggattctgcgaggacgtcct tctgctacgtccctcggccctcaatccagcggaccttccctccc gaggcctgctgcccgtctgcggcctctccgcgtcttgcctt cgccctcagacgagtcggatctcccttggcgcctccccgc atcgggaattcctagagctcgtgatcagcctcactgtgcctt ctagttgccagccatctgttggccctccccgtgccttctt gacctggaaggtgccactcccactgtccttctataaaaatg aggaaattgcatcgcaattgtctgagtaggtgtcattctattctggg gggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaa</p> |
|--|---|

| | |
|--|--|
| | <p>gagaatagcaggcatgctggggagggccgcaggaacccta gtgatggagttggcactccctctctgcgctcgcctcac tgaggccgggcgaccaaggtcgccgacgcccgggctttg cccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctg cagg (SEQ ID NO: 9)</p> |
| <p>МAВ1 Fab – IgG с 2 промоторами, состоящая из промотора 1 (CMV)-HC- полиА-промотора 2 (CMV)-LC-WPRE- поли А</p> | <p>cctgcaggcagctgcgctcgcctcactgaggccgccc gggcaaagcccgggctgggcgacctttggtcgcccggcc tcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgccaactc catcactaggggtccttctagacaactttgtatagaaaagtgtg gttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatat atggagttccgcttacataacttacgtaaatggcccgcctgg ctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacg tatgttccatagtaacgccaatagggactttcattgacgtcaat gggtggagatattacggtaactgccacttggcagtacatcaa gtgtatcatatgccaaagtagccccctattgacgtcaatgacgg aatggcccgcctggcattatgccagtagacattatggga cttctacttggcagtagctacgtattagtcacgtattacca tggtgatgcccgtttggcagtagcatcaatgggctggatagcgg ttgactcacggggattccaagtctccaccattgacgtcaat gggagttgtttggcaccaaaatcaacgggactttcaaatgt cgtacaactccgccattgacgcaaatgggctggtaggcgt gtacggtgagggtctatataagcagagctggttagtgaacc gtcagatccaagttgtacaaaaagcaggctgccaccatgga gacagatacactgctgctggtgctgctcctctgggtgccag gatctacaggcgaggttcagctgcagcagcttgacctgagct ggttaagcctggcgctccgtgaagatctcctgcaagacctctg gcttacctcaccgagtactccatgactgggtcaagcagctcc cacggcaagtccctggaatggatcggcggcatcaaccctaac aacggcggcacctcctacaaccagaagttcaagggcaagct acctgaccgtggacaagtctcctccaccgctcatggaac tcgggtccctgacctctgaggactccgctgtactactgcgct</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>agagagtcttggggccaggccaccactgacagtctcttctg cttctaccaaggaccagcgtgttccctctggctcctccagc aagtctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctggtca aggactacttctctgagccttgaccgtgcttggaaactctggcg ctctgacatccggcgtgcacaccttccaagctgtgctgcaatcc agcggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccttctagc tctctgggcacacagacctacatctgcaatgtgaaccacaagc ctccaacaccaagggtggacaagaagggtggaaccaagtctct gcggtcccaccaccatcaccatcattagcagacatgataaga tacattgatgagtttgacaaaaccacaactagaatgcagtgaaa aaaatgctttatttggaaatttggatgctattgctttatttgaacc attataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcatt ttatgtttcaggttcagggggagggtgtgggagggtttttaaagca agtaaaacctctacaaatgtggtatagtattataatgtaatacaatta cggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttcat aacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacc cccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacg ccaatagggactttcattgacgtcaatgggtggagtatttacgg taaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagt acgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggc attatgccagtacatgacctatgggactttcctacttggcagta catctacgtattagtcacgctattaccatgggtgatgcggtttgg cagtacatcaatgggcgtggatagcggttgactcacgggggatt tccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgtttggca ccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccc cattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggagggtct atataagcagagctggttagtgaaccgtcagatcaccagcttt ctgtacaaagtgggccaccatggagacagatacactgctgct gtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctacaggcgacgtg gctatgacacagaccctctgacactgtccgtgaccatcggac agcctgcctccatctctgcaagtctctcagtcctctgctgact ctgacggcaagacctgaactggctgctgcagaggcctg</p> |
|--|--|

| | |
|--|---|
| | <p>gccagagtcctaagagactgatctacctggtgtccaagctgga ctctcggatccctgacagattcacggctctggctctggcaccg actcacctgaagatctccagagtggaagccgaggacctgg gctgtactactgttggcagggcaccactttcacacaccttg gcgctggcacaagaactggaactgaagcggacagtggccgct ccttcctgttcatcttccaccttccgacgagcagctgaagtc ggcacagcttctgtcgtgtgcctgtgaacaacttctacctcg ggaagccaaggtgcagtggaaggtggacaatgccctgcagtc cggcaactccaagagtctgtgaccgagcaggactccaagga cagcacctacagcctgtcctccactgacctgtccaaggcc gactacgagaagcacaaggtgtacgctgcgaagtgacctat cagggcctgtctagccctgtgaccaagtcttcaaccggggcg agtgtgacaactttattatacatagttggaattccgataatcaac ctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactat gtgtccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgat catgctattgctcccgatggctttcatttctcctccttgataaat cctggtgtgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggc aacgtggcgtggtgtgcactgtttgtgacgcaacccccact ggttggggcattgccaccctgtcagctcctttccgggactttc gctttccccctcctattgccacggcggaaactcatcggcctg ccttcccgtgctggacagggctcggctgttgggactgac aattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctg ctgcctgtgtgccacctggattctgcgaggacgtccttctgc tacgtccctcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcg cctgctgccggctctgcggccttccgcttctgccttgc ctcagacgagtcggatctcccttgggcccctccccgatcg ggaattcctagagctcgtgatcagcctcactgtgccttctagt tgccagccatctgttgttggccctccccctgccttccctgaccc tggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaa attgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtg gggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaa tagcaggcatgctggggagggccgcaggaaccctagtgtat</p> |
|--|---|

| | |
|--|--|
| | <p>ggagttggccactccctctctgcgctcgcctcactgag gcccggcgaccaaggctgcccgcgcccgggctttgcccg ggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 10)</p> |
|--|--|

Пример 2. Клеточная культура

Эндотелиальные клетки микрососудов головного мозга человека hCMEC/D3 поддерживали в колбах объемом 75 см², предварительно покрытых 100 мкг/мл коллагена крысиного хвоста типа I (08-115, Merck) в питательной среде EndoGRO -MV (Merck, SCME004) с добавлением всех включенных факторов в наборе и 1 нг/мл bFGF (Merck, GF003) при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Линии клеток эндотелиомы мозга мыши B.End3 и b.End5 культивировали в среде DMEM с добавлением Pen/strep и 10% FBS (среда для выращивания). Клетки культивировали в колбах объемом 75 см², обработанных ТС, и отделяли раствором трипсин-EDTA для пассирования в соотношении 1:10 для субкультивирования. Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

Пример 3. Трехмерная *in vitro* модель ГЭБ OrganoPlate®

Трехмерная система OrganoPlate®, используемая для трехмерного моделирования *in vitro* ГЭБ, охватывает 40 микрофлюидных структур клеточных культур, встроенных в стандартный 384-луночный микропланшет для титрования. Каждый тканевый чип состоит из трех плоскостей, соединенных с соответствующими лунками титровального микропланшета, которые функционируют как входы и выходы для доступа к микрожидкостной культуре. Сначала получали гель внеклеточного матрикса (ЕСМ) из 4 мг/мл коллагена-I (крысиный хвост, Merck) путем смешивания 1М HEPES, 37 г/л NaHCO₃ и 5 мг/мл коллагена-I, и вносили в центральную плоскость. Направляющие фазы применяли для выборочного распределения геля ЕСМ в центральной плоскости путем закрепления мениска. После гелеобразования ЕСМ (в течение ночи или выходных при 37°C, 5% CO₂) клетки hCMEC/D3 высевали в питательную среду EndoGRO-MV с добавлением 1 нг/мл bFGF при плотности 40000 клеток на чип в верхней плоскости. Как только клетки прикреплялись, планшет помещали горизонтально на интервальный качающийся механизм, который индуцировал поток путем взаимного

выравнивания между резервуарами, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение по меньшей мере 3 дней, чтобы обеспечить образование канальцев. Среду меняли приблизительно каждые 3 дня для поддержания оптимальной целостности барьера, которую контролировали перед каждым экспериментом по трансдукции или трансцитозу с помощью анализов проницаемости. Барьерную функцию оценивали путем перфузии 0,5 мг/мл FITC-декстрана (Sigma 46946, в среднем 150 кДа; FD20S, в среднем 20 кДа и Sigma FD10S, в среднем 10 кДа) в культуральной среде через просвет пробирки с последующим определением уровней флуоресценции в базальной области геля, нормализованной к флуоресценции в просвете. Измерения флуоресценции проводили каждые 5 минут в течение 1 часа с использованием ридера живых клеток Incucyte.

Пример 4. Transwell *in vitro* модель ГЭБ

Для модели ГЭБ *in vitro* на основе Transwell апикальная сторона 24-луночного планшета, содержащего мембраны Corning Transwell с размером пор 0,4 мкм (площадь культивирования 0,33 см², Sigma), сначала покрывали коллагеном типа I крысиного хвоста (Merck) в течение 1 часа во влажном инкубаторе. Затем клетки hCMEC/D3 высевали в питательную среду EndoGRO-MV с добавлением 1 нг/мл bFGF при плотности 100000 клеток/см². Смену среды производили приблизительно каждые 2-3 дня, всегда поддерживая апикальный объем 100 мкл и 600 мкл в базолатеральном пространстве. Измерения проницаемости и трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER) проводили со дня 4 после посева эндотелиальных клеток, и обнаружили, что клеточные монослои сохраняют подходящие барьерные свойства вплоть до дня 15 после посева. Для измерения проницаемости среду эндотелиальных клеток заменяли на 600 мкл свежей среды в базолатеральном пространстве. Затем в верхнее пространство добавляли 100 мкл 0,25 мг/мл FITC (Sigma 46946, в среднем 150 кДа; FD20S, в среднем 20 кДа и Sigma FD10S, в среднем 10 кДа) в культуральной среде, и клетки инкубировали во влажном инкубаторе в течение 1 часа. Затем фракции по 100 мкл собирали из базолатерального пространства и переносили в черный 96-луночный планшет Greiner для измерения флуоресценции с использованием устройства для считывания микропланшетов Tecan Spark. Кажущуюся проницаемость вычисляли по формуле $P_{app} = (\Delta Q/\Delta t) \times (1/AC_0)$, где P_{app} представляет собой коэффициент кажущейся проницаемости (см/мин), $\Delta Q/\Delta t$ представляет собой скорость проницаемости декстрана (мкг/мин) через слой эндотелиальных клеток, А представляет собой площадь поверхности слоя

клеток (см²), а C0 представляет собой начальную концентрацию декстрана (мкг/мл), нанесенную на апикальную поверхность клетки. Для измерений TEER среду эндотелиальных клеток заменяли на 1050 мкл свежей среды в нижнем пространстве и 325 мкл в верхнем пространстве. Эпителиальный вольтметр EVOM-3 применяли для измерения TEER.

Пример 5. AAV трансдукция hCMEC/hCMEC и обнаружение антител путем связывания с мишенью. Секретия антител клетками hCMEC/D3 с использованием модели OrganoPlate® ГЭБ

Установленную модель OrganoPlate® hCMEC /D3 *in vitro* BBB применяли для оценки того, могут ли антитела в векторах на основе капсид AAV WT эффективно секретироваться hCMEC. Антитело MAB1 (изотип IgG1 человека) получали в векторе на основе капсид AAV2, AAV8, AAV9 и AAVrh10 и трансдуцировали в монослой hCMEC/D3 через 24 ч после высевания в трехмерную OrganoPlate® при MOI 50000. Через 3 дня после трансдукции собирали супернатанты как из верхней (апикальной) плоскости, так и из нижней (базолатеральной) плоскости, а концентрации антител в апикальном и базолатеральном пространствах определяли путем связывания с полноразмерным (FL) TDP-43 человека с использованием непрямого анализа ELISA. кратко, покрытие планшетов для ELISA 1 мкг/мл FL TDP-43 человека проводили в течение ночи в карбонатном буфере при 4°C. Планшеты промывали 0,05% Tween-20/PBS и затем блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в 0,05% Tween-20/PBS в течение 1 часа при 37°C. Собранные супернатанты, содержащие антитела, затем добавляли в планшет и инкубировали в течение 2 часов при 37°C, после чего планшеты промывали. Добавляли AP-конъюгированное вторичное антитело против IgG мыши (Jackson, 115-055-206), разведенное при разведении 1/1000 в 0,05% Tween-20/PBS, на 1 час при 37°C. После последней промывки планшеты инкубировали с раствором pNPP и через 1 час считывали при 405 нм с помощью планшет-ридера (BioTek). MAB1 (изотип человеческого IgG1) обнаруживали в апикальном супернатанте монослоев hCMEC/D3, трансдуцированных всеми капсидами AAV WT, оценивали и подтверждали сохранение связывания с TDP-43, как показано на фиг. 13. Титры MAB1 в апикальном пространстве оценивали приблизительно в 40 нг/мл для AAV2 и приблизительно 4 нг/мл для серотипов AAV8, AAV9 и AAVrh10. Релевантный отрицательный контроль (AAV2-eGFP) не индуцировал никакого сигнала в анализе ELISA TDP-43. MAB1 (изотип IgG1 человека), трансдуцированный AAV2, также обнаруживали в базолатеральном пространстве на уровнях в 20 раз ниже, чем на апикальной

стороне (фиг. 14), в соответствии с ограниченной диффузией, наблюдаемой через плотный слой ECM в OrganoPlate® (данные не показаны). Конструкция AAV2 MAB1 (изотип IgG1 человека) генерировала титры антител зависимым от дозы образом при трансдукции в клетки hCMEC/D3 при MOI от 5000 до 160000, как показано на фиг. 15. Модель ГЭБ Transwell *in vitro* также применяли для дополнительной проверки доставки антител в векторах. Монослой hCMEC/D3 трансдуцировали через 24 часа после посева в 24-луночные вставки Transwell с использованием конструкции MAB1 AAV2. Через 3 дня после трансдукции собирали супернатанты как с апикальной, так и с базолатеральной сторон, и концентрации антител в апикальном и базолатеральном пространствах определяли путем связывания с человеческим FL TDP-43 с использованием непрямого анализа ELISA, как описано ранее. Эта предварительная оценка предполагает относительно равномерную секрецию антител как в апикальную, так и в базолатеральную сторону и, следовательно, неполяризованную секрецию антитела MAB1 из вектора, как показано на фиг. 1-6.

Пример 6. Секреция антител линиями эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла головного мозга мыши и человека

Иммортализованные клеточные линии hCMEC/D3 b.End3 и b.End5 использовали для оценки способности эндотелиальных клеток головного мозга продуцировать антитела высокого качества. Различные векторы AAV, такие как AAV2, AAV-BR1 и AAVrh10, оценивали на их способность доставлять трансгены антитела MAB1 в клеточные линии человека и мыши. Экспрессия всех антител (таких как hIgG1 и scFv-Fc) управлялась промотором CMV, элемент IRES использовали между генами, кодирующими LC и HC hIgG1, для достижения продукции бицистронных антител. Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты при плотности 100000 клеток/см². Линии эндотелиальных клеток затем трансдуцировали через 4-16 часов после посева при MOI 100000 в питательной среде. Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ и на следующий день заменяли среду для удаления частиц AAV. Супернатанты клеточных культур собирали через 7 дней после посттрансдукции, и титры секретируемых антител определяли с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) с использованием набора hFc (PerkinElmer, Cisbio, 62HFSPEN) в соответствии с инструкциями производителя. Этот способ количественного определения позволял обнаруживать секретируемые и правильно свернутые антитела. Очищенный рекомбинантный MAT1 hIgG1 использовали в качестве стандарта для

количественного определения антител в культуральной среде. Сигналы флуоресценции считывали с помощью устройства для считывания микропланшетов Tecan Spark® (Em: 317 нм; Ex: 620 нм и 665 нм; 75 вспышек; время интегрирования 400 мкс; время задержки 100 мкс). Интерполированные титры секретируемых антител представлены на фиг. 17. MAB1 hIgG1, доставляемый AAV2, количественно определяли при 20 нг/мл в (А) супернатантах мышинных линий эндотелиомы b.End3 и b.End5 и при 200 нг/мл в (В) клеточных супернатантах hCMEC/D3. Конструкцию MAB1 scFv-Fc получали и определяли количественно при 50/100 нг/мл и 2500 нг/мл в супернатантах для b.End3/b.End5 и hCMEC/D3, соответственно. Менее 10 нг/мл MAB1 hIgG1 получали с серотипами AAVrh10 и AAV-BR1 во всех трех клеточных линиях. Полученные уровни антител показывают, что эндотелиальные клетки головного мозга продуцируют правильно уложенные антитела независимо от используемого капсида AAV или формата антитела. Титры экспрессии зависели от оцениваемых условий, и более высокие титры наблюдали для клеточной линии hCMEC/D3 человека по сравнению с обеими клеточными линиями мыши (фиг. 17 А и В). Кроме того, всегда наблюдали более высокие титры антител для scFv-Fc MAB1 по сравнению с полным аналогом IgG1 MAB1, когда каждый из них доставлялся с помощью AAV2. В этом эксперименте AAV2 был более эффективным в доставке трансгена по сравнению с AAV-BR1.

Пример 7. Секреция антител первичными эндотелиальными клетками микроциркуляторного русла головного мозга человека в трехмерной модели ГЭБ человека

Продуцирование антител клетками ГЭБ оценивали с использованием коммерчески доступной модели Transwell, состоящей из первичных эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла головного мозга человека, астроцитов и перицитов, приобретенных у NeuroMics (3D45002). Модель культивировали в соответствии с инструкциями производителя. Кратко, 24-луночный планшет оттаивали в день 0 и замораживающую среду заменяли теплой питательной средой (среда 1). После 3 часов инкубации во влажном инкубаторе среду 1 удаляли и заменяли второй поддерживающей средой (среда 2). Дальнейшую замену среды не производили, и клетки сохраняли в культуре до дня 11 после оттаивания. Векторы AAV2 и AAV-BR1 оценивали для доставки человеческого (hIgG1) и мышинового (mIgG2a) варианта трансгена антитела MAB1. Экспрессию антител регулировали промоторы CMV или CBh, элемент IRES использовали между LC и HC

для достижения продукции бицистронных антител. Эндотелиальные клетки, присутствующие во вкладышах клеточных культур, трансдуцировали при 100000 в питательной среде, как описано ранее для конструкций AAV, на день 4 после оттаивания. Через 7 дней после трансдукции собирали супернатанты как из апикального, так и из базолатерального пространств, и титры секретируемых антител определяли с помощью HTRF с использованием наборов Fc человека и Fc мыши (PerkinElmer Cisbio, 62HFCPEH и 6FMIGPEH) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные рекомбинантные MAB1 в виде форматов hIgG1 или mIgG2a соответственно использовали в качестве стандартов для количественного определения антител и титровали в той же культуральной среде, которую применяли для поддержания модели. Сигналы флуоресценции считывали с помощью устройства для считывания микропланшетов Tecan Spark® (Em: 317 нм; Ex: 620 нм и 665 нм; 75 вспышек; время интегрирования 400 мкс; время задержки 100 мкс). Интерполированные титры секретируемых антител представлены на фи. 18. Сходные титры MAB1 hIgG1 получали для серотипов AAV2 и AAV-BR1, с приблизительно 50 нг/мл в апикальном пространстве (вставка клеточной культуры) и 10-20 нг/мл на базолатеральной стороне. Доставка AAV-BR1 изотипа MAB1 mIgG2a, экспрессированного либо под промотором CMV, либо под промотором CBh, показала в 2-3 раза более низкие титры по сравнению с аналогом hIgG1. Различие в тропизме наблюдали с AAV-BR1 в клеточной линии hCMEC/D3 (фиг. 17А, отсутствие обнаруживаемой экспрессии MAB1 hIgG1) по сравнению с данными для первичных эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла головного мозга человека (фиг. 18А и В). В то время как данные о клеточных линиях *in vitro* позволяют прогнозировать эффекты *in vivo*, данные о первичных клетках являются предпочтительным предиктором тропизма AAV *in vivo*. На фиг. 18В показано относительное количество антител, определенное в апикальном (200 мкл) и базолатеральном (500 мкл) пространствах для каждого вектора AAV. Перераспределение антител предполагает билатеральную секрецию антител из слоя эндотелиальных клеток.

В общем, полученные титры антител показали, что первичные эндотелиальные клетки головного мозга продуцируют правильно уложенные антитела, независимо от используемого капсида AAV и независимо от формата антитела. Важно отметить, что антитела были обнаружены как в апикальной, так и в базолатеральной сторонах, последнее наблюдение имитировало паренхиму головного мозга. Полученные данные подтверждают инновационный способ, описанный в настоящем документе, и подтверждают, что с помощью этой новой стратегии доставки были достигнуты титры IgG высокого качества.

Во всем описании и формуле изобретения слова «содержат» и «содержат», а также их варианты означают «включая, но без ограничения», и они не предназначены (и не исключают) другие фрагменты, добавки, компоненты, целые числа или стадии.

Во всем описании и пунктах формулы изобретения единственное число охватывает множественное число, если контекст не требует иного. В частности, когда используется форма единственного числа, описание следует понимать как предполагающее множественное число, а также единственное число, если контекст не требует иного.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимает специалист в области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и патенты, специально упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки для всех целей настоящего изобретения.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к тем, которые описаны в настоящем документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопровождающих чертежей. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Более того, все аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, считаются широко применимыми и сочетаемыми с любыми и всеми другими согласованными вариантами осуществления, включая те, которые относятся к другим аспектам настоящего изобретения (в том числе по отдельности), в зависимости от обстоятельств.

Ссылочные источники

1. Villabona-Rueda, A., et al., *The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 405.
2. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(1): p. a020412.
3. Pachter, J.S., H.E. de Vries, and Z. Fabry, *The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system*. J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(6): p. 593-604.

4. Sweeney, M.D., et al., *The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders*. Nat Neurosci, 2018. **21**(10): p. 1318-1331.
5. St-Amour, I., et al., *Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(12): p. 1983-92.
6. Pardridge, W.M., *Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain*. Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 373.
7. Thom, G., et al., *Isolation of blood-brain barrier-crossing antibodies from a phage display library by competitive elution and their ability to penetrate the central nervous system*. MAbs, 2018. **10**(2): p. 304-314.
8. Zhang, W., et al., *Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human*. Fluids Barriers CNS, 2020. **17**(1): p. 47.
9. Gao, H., *Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery*. Acta Pharm Sin B, 2016. **6**(4): p. 268-86.
10. Teleanu, D.M., et al., *Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology*. Pharmaceutics, 2018. **10**(4).
11. Chen, H., et al., *Focused ultrasound-enhanced intranasal brain delivery of brain-derived neurotrophic factor*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28599.
12. Ahmad, E., et al., *Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles*. Nanoscale, 2017. **9**(3): p. 1174-1183.
13. Henchcliffe, C. and M. Parmar, *Repairing the Brain: Cell Replacement Using Stem Cell-Based Technologies*. J Parkinsons Dis, 2018. **8**(s1): p. S131-S137.
14. Heller, L., et al., *Secretion of proteins and antibody fragments from transiently transfected endothelial progenitor cells*. Journal of cellular and molecular medicine, 2020. **24**(15): p. 8772-8778.
15. Desai, N., *Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics*. AAPS J, 2012. **14**(2): p. 282-95.
16. Kariolis, M.S., et al., *Brain delivery of therapeutic proteins using an Fc fragment blood-brain barrier transport vehicle in mice and monkeys*. Sci Transl Med, 2020. **12**(545).
17. Ullman, J.C., et al., *Brain delivery and activity of a lysosomal enzyme using a blood-brain barrier transport vehicle in mice*. Sci Transl Med, 2020. **12**(545).

18. Pothin, E., D. Lesuisse, and P. Lafaye, *Brain Delivery of Single-Domain Antibodies: A Focus on VHH and VNAR*. Pharmaceutics, 2020. **12**(10).
19. Guo, X.-b., X. Deng, and Y. Wei, *Homing of Cultured Endothelial Progenitor Cells and Their Effect on Traumatic Brain Injury in Rat Model*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 4164.
20. Guzman, R., M. Janowski, and P. Walczak, *Intra-Arterial Delivery of Cell Therapies for Stroke*. Stroke, 2018. **49**(5): p. 1075-1082.
21. Tervo, D.G., et al., *A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons*. Neuron, 2016. **92**(2): p. 372-382.
22. Olanow, C.W., et al., *Trophic factors for Parkinson's disease: To live or let die*. Mov Disord, 2015. **30**(13): p. 1715-24.
23. Tuszynski, M.H., et al., *Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease*. JAMA Neurol, 2015. **72**(10): p. 1139-47.
24. Merkel, S.F., et al., *Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood-brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells*. J Neurochem, 2017. **140**(2): p. 216-230.
25. Foust, K.D., et al., *Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 59-65.
26. Hanlon, K.S., et al., *Selection of an Efficient AAV Vector for Robust CNS Transgene Expression*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2019. **15**: p. 320-332.
27. Mathiesen, S.N., et al., *CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020. **19**: p. 447-458.
28. Huang, Q., et al., *Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids*. PLoS One, 2019. **14**(11): p. e0225206.
29. Chan, K.Y., et al., *Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems*. Nat Neurosci, 2017. **20**(8): p. 1172-1179.
30. Korbelin, J., et al., *A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(6): p. 609-25.
31. Ravindra Kumar, S., et al., *Multiplexed Cre-dependent selection yields systemic AAVs for targeting distinct brain cell types*. Nat Methods, 2020. **17**(5): p. 541-550.

32. Elmer, B.M., et al., *Gene delivery of a modified antibody to A β reduces progression of murine Alzheimer's disease*. PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226245.
33. Sudol, K.L., et al., *Generating differentially targeted amyloid-beta specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer's disease*. Mol Ther, 2009. **17**(12): p. 2031-40.
34. Ryan, D.A., et al., *Abeta-directed single-chain antibody delivery via a serotype-1 AAV vector improves learning behavior and pathology in Alzheimer's disease mice*. Mol Ther, 2010. **18**(8): p. 1471-81.
35. Levites, Y., et al., *Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice*. J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 11923-8.
36. Kou, J., et al., *Anti-Amyloid- β Single-Chain Antibody Brain Delivery Via AAV Reduces Amyloid Load But May Increase Cerebral Hemorrhages in an Alzheimer's Disease Mouse Model*. J Alzheimers Dis, 2011. **27**(1): p. 23-38.
37. Liu, W., et al., *Vectorized Intracerebral Immunization with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Tau Transgenic Mice*. J Neurosci, 2016. **36**(49): p. 12425-12435.
38. Vitale, F., et al., *Intramuscular injection of vectorized-scFvMCI reduces pathological tau in two different tau transgenic models*. Acta Neuropathol Commun, 2020. **8**(1): p. 126.
39. Vitale, F., et al., *Anti-tau conformational scFv MCI antibody efficiently reduces pathological tau species in adult JNPL3 mice*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 82.
40. Bell, R.D. and M.D. Ehlers, *Breaching the blood-brain barrier for drug delivery*. Neuron, 2014. **81**(1): p. 1-3.
41. Sacramento, C.B., et al., *Anti-Phospho-Tau Gene Therapy for Chronic Traumatic Encephalopathy*. Hum Gene Ther, 2020. **31**(1-2): p. 57-69.
42. Goodwin, M.S., et al., *Utilizing minimally purified secreted rAAV for rapid and cost-effective manipulation of gene expression in the CNS*. Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 15.
43. Goodwin, M.S., et al., *Anti-tau scFvs Targeted to the Cytoplasm or Secretory Pathway Variably Modify Pathology and Neurodegenerative Phenotypes*. Mol Ther, 2020.
44. Pozzi, S., et al., *Virus-mediated delivery of antibody targeting TAR DNA-binding protein-43 mitigates associated neuropathology*. J Clin Invest, 2019. **129**(4): p. 1581-1595.

45. Saunders, K.O., et al., *Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection*. J Virol, 2015. **89**(16): p. 8334-45.
46. Ho, S.C., et al., *IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines*. J Biotechnol, 2012. **157**(1): p. 130-9.
47. Liu, Z., et al., *Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2193.
48. Yang, S., et al., *Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition*. Gene Ther, 2008. **15**(21): p. 1411-23.
49. Sharma, P., et al., *2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(7): p. 3143-51.
50. Zhang, Y. and W.M. Pardridge, *Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier*. J Neuroimmunol, 2001. **114**(1-2): p. 168-72.
51. Boado, R.J., et al., *Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and abeta fibril disaggregation*. Bioconjug Chem, 2007. **18**(2): p. 447-55.
52. Deane, R., et al., *IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor*. J Neurosci, 2005. **25**(50): p. 11495-503.
53. Albright, B.H., et al., *Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier*. Mol Ther, 2018. **26**(2): p. 510-523.
54. Albright, B.H., et al., *Modulation of Sialic Acid Dependence Influences the Central Nervous System Transduction Profile of Adeno-associated Viruses*. J Virol, 2019. **93**(11).
55. Fukuchi, K., et al., *Anti-Abeta single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2006. **23**(3): p. 502-11.
56. Elmer, B.M., et al., *Gene delivery of a modified antibody to Abeta reduces progression of murine Alzheimer's disease*. PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226245.
57. Hay, C.E., et al., 2019.
58. Johnson, P.R., et al., *Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 901-6.
59. Fuchs, S.P. and R.C. Desrosiers, *Promise and problems associated with the use of recombinant AAV for the delivery of anti-HIV antibodies*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16068.

60. Fuchs, S.P., et al., *AAV-Delivered Antibody Mediates Significant Protective Effects against SIVmac239 Challenge in the Absence of Neutralizing Activity*. PLoS Pathog, 2015. **11**(8): p. e1005090.
61. Martinez-Navio, J.M., et al., *Long-Term Delivery of an Anti-SIV Monoclonal Antibody With AAV*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 449.
62. Martinez-Navio, J.M., et al., *Adeno-Associated Virus Delivery of Anti-HIV Monoclonal Antibodies Can Drive Long-Term Virologic Suppression*. Immunity, 2019. **50**(3): p. 567-575 e5.
63. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 753-66.
64. Chng, J., et al., *Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells*. MAbs, 2015. **7**(2): p. 403-12.
65. Kim, J.H., et al., *High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18556.
66. Velychko, S., et al., *Fusion of Reprogramming Factors Alters the Trajectory of Somatic Lineage Conversion*. Cell Rep, 2019. **27**(1): p. 30-39 e4.
67. Fang, J., et al., *Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 584-90.
68. Mizuguchi, H., et al., *IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector*. Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 376-82.
69. Fuchs, S.P., et al., *Recombinant AAV Vectors for Enhanced Expression of Authentic IgG*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0158009.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки ГЭБ экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

2. Вектор для применения по п. 1, где антитело или фрагмент антитела доставляются в паренхиму головного мозга, где необязательно антитело или фрагмент антитела секретируются в паренхиму головного мозга.

3. Вектор для применения по п. 1 или 2, где вектор трансдуцирует или трансфицирует эндотелиальные клетки ГЭБ.

4. Вектор для применения по любому из пп. 1 - 3, где вектор трансдуцирует или трансфицирует перициты или астроциты ГЭБ.

5. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор содержит вирусный вектор дикого типа или сконструированный вирусный вектор.

6. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор содержит нейротропный вектор.

7. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор экспрессирует пептид, малую молекулу, антитело или его фрагмент антитела, белок, наночастицу, липид, олигонуклеотид, аптамер или катионную молекулу на поверхности вектора, которые нацеливают вектор на клетки ГЭБ.

8. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор содержит модификации на поверхности вектора, которые нацеливают вектор на клетки ГЭБ.

9. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор содержит органические наноматериалы, такие как липосомы, экзосомы, дендримеры, мицеллы, неорганические наноматериалы, такие как наночастицы золота, наночастицы диоксида кремния или углеродные нанотрубки.

10. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор выбран из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, ретровируса, риновируса, лентивируса, вируса простого герпеса (HSV) или любой вирусоподобной частицы.

11. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор представляет собой AAV, выбранный из AAV серотипа 1 (AAV1), AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 8 (AAV8), AAV серотипа 9 (AAV9) и AAV серотипа 10 (AAV10).

12. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор представляет собой сконструированный вектор AAV, где необязательно

(i) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV2, предпочтительно AAV-BR1, или

(ii) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV9, такой как AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB, AAV9-PHP-V1, или

(iii) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV1, такой как AAV1RX, AAV1R6 или AAV1R7, или

(iv) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV10.

13. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор представляет собой AAV-BR1 или AAV9-PHP-V1.

14. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где заболевание или нарушение ЦНС выбрано из заболеваний, связанных с белком бета-амилоид, TDP-43-протеинопатий, альфа-синуклеопатий, таупатий, болезней экспансии тринуклеотидных повторов, включая полиглутаминовые нарушения, такие как болезнь Хантингтона, рака и опухолей головного мозга, эпилепсии, психиатрических заболеваний, нейровоспалительных заболеваний, нервно-мышечных заболеваний, вирус-индуцированных энцефалитов и заболеваний, характеризующихся микроглиальной дисфункцией.

15. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где заболевание или нарушение ЦНС выбрано из лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), лимбической преобладающей возрастной энцефалопатии TDP-43 (LATE) и рассеянного склероза.

16. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело или фрагмент антитела выбраны из антитела или фрагмента антитела анти-ErbB2, анти-TDP-43 (NI-205), анти-Abeta (такого как бапинеzumаб, соланезумаб, леканемаб, адуканумаб, донанемаб, гантенерумаб или кренезумаб), анти-ApoE4 (Аполипопротеин E4) и анти-DDX3X (АТФ-зависимая РНК-хеликаза), анти-Тау (тилавонемаб, госуранемаб, заготенемаб,

семоринемаб, бепранемаб, ВІВ076, JNJ-63733657, Lu AF87908, PNT001, E-2814), анти-LINGO-1 (такого как опицинумаб), анти-альфа-синуклеин (цинпанемаб, прасинезумаб, MEDI-1341, Lu AF82422, BAN0805), анти-ASC (IC-100), анти-NLRP3, анти-C5 (равулизумаб, экулизумаб), анти-C1q (ANX-005), анти-C3, анти-гентингтин (C-617, NI-302), анти-прион, анти-CD20 (такого как офатумумаб, окрелизумаб, ритуксимаб, BCD-132, ублитуксимаб, BAF-4406F, AL-014), анти-PD-1 (IBS-Ab002) или анти-VEGF-A (бевацизумаб, ранибизумаб, бролуцизумаб, фарицимаб, вануцизумаб).

17. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где вектор вводится субъекту парентерально.

18. Вектор для применения по п. 17, где вектор вводится субъекту посредством внутривенной инъекции или внутривенной инфузии.

19. Вектор для применения по любому из предшествующих пунктов, где полинуклеотид содержит по меньшей мере один промотор, выбранный из промотора цитомегаловируса (CMV), EF1A (человеческий эукариотический фактор элонгации трансляции 1 альфа 1), CAG (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актина), CBh (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актина), SV40 (энхансер/ранний промотор вируса обезьян 40), GFAP (промотор человеческого глиофибриллярного кислого белка), ATP1A2_1 (Na, K АТФаза $\alpha 2$), CLDN_5 (Клаудин 5), ADRB2_1 (адренорецептор бета 2), TNFRSF6B_1 (член 6b суперсемейства рецепторов TNF), PDYN_1 (продинорфин), GH1_1 (человеческий гормон роста), OPALIN_1 (Opalin), SYN1_1 (Синапсин 1), CAMK2A_1 (кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II альфа), NEFH_1 (полипептид тяжелой цепи нейрофиламента), NEUROD6_1 (нейронный фактор дифференцировки 6) или OLIG2_1 (транскрипционный фактор 2 олигодендроглиоцитов), раннего энхансера CMV, слитого с промотором GFAP, ATP1A2_1, CLDN_5, ADRB2_1, TNFRSF6B_1, PDYN_1, GH1_1, OPALIN_1, SYN1_1, CAMK2A_1, NEFH_1, NEUROD6_1 или OLIG2_1, предпочтительно промотора цитомегаловируса (CMV) или промотора CBh, и где по меньшей мере один промотор функционально связан с последовательностью, кодирующей антитело или фрагмент антитела.

20. Вектор для применения по п. 19, где по меньшей мере один промотор выбран из ATP1A2_1 (Na, K АТФаза $\alpha 2$), CLDN_5 (Клаудин 5), ADRB2_1 (адренорецептор бета 2) и TNFRSF6B_1 (член 6b суперсемейства рецепторов TNF), где необязательно по меньшей мере один промотор функционально связан с энхансером, таким как ранний энхансер CMV.

21. Способ доставки антитела или фрагмента антитела в ГЭБ субъекта, причем способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела субъекту, где способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела.

22. Способ доставки антитела или фрагмента антитела в ЦНС у субъекта, причем способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела субъекту, где способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

23. Способ лечения заболевания или нарушения ЦНС у субъекта, причем способ предусматривает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, субъекту, где способ приводит к трансдукции или трансфекции клеток ГЭБ, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

24. Применение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, для получения лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения ЦНС у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

25. Применение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело или фрагмент антитела, для доставки полинуклеотида, кодирующего антитело или фрагмент антитела, в ГЭБ субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

26. Способ или применение по любому из пп. 21 – 25, дополнительно определенные признаками согласно любому из пп. 2 - 20.

27. Вектор, содержащий экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь

антитела или фрагмента антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или ЦНС, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

28. Вектор, содержащий экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, для применения в способе лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы (ЦНС) у субъекта, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) или ЦНС, и трансдуцированные или трансфицированные клетки экспрессируют антитело или фрагмент антитела, что приводит к доставке антитела или фрагмента антитела в ЦНС.

29. Вектор для применения по п. 27 или 28, где антитело или фрагмент антитела доставляются в паренхиму головного мозга, где необязательно антитело или фрагмент антитела секретируются в паренхиму головного мозга.

30. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 29, где вектор трансдуцирует или трансфицирует клетки ЦНС, и клетки выбраны из эндотелиальных клеток головного мозга, нейронов, перицитов, астроцитов, олигодендроцитов, микроглиальных и эпендимных клеток.

31. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 30, где вектор трансдуцирует или трансфицирует эндотелиальные клетки ГЭБ.

32. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 31, где вектор трансдуцирует или трансфицирует перициты или астроциты ГЭБ.

33. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 32, где антитело или фрагмент антитела секретируются в ЦНС, предпочтительно секретируются в паренхиму головного мозга.

34. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 33, где вектор содержит модификации на поверхности вектора, которые нацеливают вектор на клетки ГЭБ.

35. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 34, где вектор экспрессирует пептид, малую молекулу, антитело или его фрагмент антитела, белок, наночастицу, липид, олигонуклеотид, аптамер или катионную молекулу на поверхности вектора, которые нацеливают вектор на клетки ГЭБ или ЦНС.

36. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 35, где вектор содержит нейротропный вектор.

37. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 36, где вектор содержит органические наноматериалы, такие как липосомы, экзосомы, дендримеры и мицеллы, или неорганические наноматериалы, такие как наночастицы золота, наночастицы диоксида кремния или углеродные нанотрубки.

38. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 37, где вектор содержит вирусный вектор дикого типа или сконструированный вирусный вектор.

39. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 38, где вектор выбран из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, ретровируса, риновируса, лентивируса, вируса простого герпеса (HSV) или любой вирусоподобной частицы.

40. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 39, где вектор представляет собой AAV, выбранный из AAV серотипа 1 (AAV1), AAV серотипа 2 (AAV2), AAV серотипа 8 (AAV8), AAV серотипа 9 (AAV9) и AAV серотипа 10 (AAV10).

41. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 40, где вектор представляет собой сконструированный вектор AAV, где необязательно

(i) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV2, предпочтительно AAV-BR1, или

(ii) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV9, такой как AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB, AAV9-PHP-V1, или

(iii) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV1, такой как AAV1RX, AAV1R6 или AAV1R7, или

(iv) сконструированный вектор AAV представляет собой сконструированный вектор AAV10.

42. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 41, где заболевание или нарушение ЦНС выбрано из заболеваний, связанных с белком бета-амилоид, TDP-43-протеинопатий, альфа-синуклеопатий, таупатий, болезней экспансии тринуклеотидных повторов, включая полиглутаминовые нарушения, такие как болезнь Хантингтона, рака и опухолей головного мозга, эпилепсии, психиатрических заболеваний, нейровоспалительных заболеваний, нервно-мышечных заболеваний, вирус-индуцированных энцефалитов и заболеваний, характеризующихся микроглиальной дисфункцией.

43. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 42, где заболевание или нарушение ЦНС выбран из лобно-височной деменции (FTD), бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), хронической травматической энцефалопатии (СТЕ), лимбической преобладающей возрастной энцефалопатии TDP-43 (LATE) и рассеянного склероза.

44. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 43, где антитело или фрагмент антитела выбраны из антитела или фрагмента антитела анти-ErbB2, анти-TDP-43 (NI-205), анти-Abeta (такого как бапинеизумаб, соланезумаб, леканемаб, адуканумаб, донанемаб, гантенерумаб или кренезумаб), анти-ApoE4 (Аполипопротеин E4) и анти-DDX3X (АТФ-зависимая РНК-хеликаза), анти-Тау (тилавонемаб, госуранемаб, заготенемаб, семоринемаб, бепранемаб, ВПВ076, JNJ-63733657, Lu AF87908, PNT001, E-2814), анти-LINGO-1 (такого как опицинумаб), анти-альфа-синуклеин (цинпанемаб, прасинезумаб, MEDI-1341, Lu AF82422, BAN0805), анти-ASC (IC-100), анти-NLRP3, анти-C5 (равулизумаб, экулизумаб), анти-C1q (ANX-005), анти-C3, анти-гентингтин (C-617, NI-302), анти-прион, анти-CD20 (такого как офатумумаб, окрелизумаб, ритуксимаб, BCD-132, ублитуксимаб, ВАТ-4406F, AL-014), анти-PD-1 (IBC-Ab002) или анти-VEGF-A (бевацизумаб, ранибизумаб, бролуцизумаб, фарицимаб, вануцизумаб).

45. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 44, где вектор вводится субъекту парентерально.

46. Вектор для применения по п. 45, где вектор вводится субъекту посредством внутривенной инъекции или внутривенной инфузии.

47. Вектор для применения по пп. 27 - 46, где экспрессионная кассета дополнительно содержит либо внутренний сайт связывания рибосомы (IRES), либо сайт расщепления фурин-2А после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

48. Вектор для применения по п. 47, где IRES происходит из вируса энцефаломиокардита и необязательно содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8.

49. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 48, где первый ген, кодирующий легкую цепь антитела или фрагмента антитела, дополнительно содержит секреторный пептид, и/или второй ген, кодирующий тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, дополнительно содержит секреторный пептид.

50. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 49, где по меньшей мере один промотор, и/или первый промотор, и/или второй промотор выбраны из промотора цитомегаловируса (CMV), EF1A (человеческий эукариотический фактор элонгации трансляции 1 альфа 1), CAG (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актина), CBh (ранний энхансер CMV, слитый с модифицированным промотором куриного β -актина), SV40 (энхансер/ранний промотор вируса обезьян 40), GFAP (промотор человеческого глиофибрилярного кислого белка), ATP1A2_1 (Na, K АТФаза $\alpha 2$), CLDN_5 (Клаудин 5), ADRB2_1 (адренорецептор бета 2), TNFRSF6B_1 (член 6b суперсемейства рецепторов TNF), PDYN_1 (продинорфин), GH1_1 (человеческий гормон роста), OPALIN_1 (Opalin), SYN1_1 (Синапсин 1), CAMK2A_1 (кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II альфа), NEFH_1 (полипептид тяжелой цепи нейрофиламента), NEUROD6_1 (нейронный фактор дифференцировки 6) или OLIG2_1 (транскрипционный фактор 2 олигодендроглиоцитов), CBh, раннего энхансера CMV, слитого с промотором GFAP, ATP1A2_1, CLDN_5, ADRB2_1, TNFRSF6B_1, PDYN_1, GH1_1, OPALIN_1, SYN1_1, CAMK2A_1, NEFH_1, NEUROD6_1 или OLIG2_1, предпочтительно промотора цитомегаловируса (CMV) или промотора CBh, и где по меньшей мере один промотор функционально связан с последовательностью, кодирующей антитело или фрагмент антитела.

51. Вектор для применения по п. 50, где по меньшей мере один промотор, и/или первый промотор, и/или второй промотор выбраны из ATP1A2_1 (Na, K АТФаза $\alpha 2$), CLDN_5 (Клаудин 5), ADRB2_1 (адренорецептор бета 2) и TNFRSF6B_1 (член 6b суперсемейства рецепторов TNF), где необязательно по меньшей мере один промотор, и/или первый промотор, и/или второй промотор функционально связаны с энхансером, таким как ранний энхансер CMV.

52. Вектор для применения по любому из пп. 27 - 51, где экспрессионная кассета содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, или последовательности, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную указанным.

53. Способ снижения агрегации антитела или фрагмента антитела, улучшения зрелости и/или качества антитела или фрагмента антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном,

кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

54. Способ повышения титра антитела или фрагмента антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно содержит либо внутренний сайт связывания рибосомы (IRES), либо сайт саморасщепления (например, фурин-2A) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

55. Способ снижения нежелательной иммуногенности антитела или фрагмента антитела и/или нежелательных явлений, связанных с терапией антителом или фрагментом антитела, где способ предусматривает:

(i) трансформацию клеток экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и где экспрессионная кассета дополнительно

содержит внутренний сайт связывания рибосомы (IRES) после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, или экспрессионной кассетой, содержащей в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и

(ii) поддержание трансформированных клеток в условиях, подходящих для продукции антитела или фрагмента антитела.

56. Способ по любому из пп. 53 - 55, где антитело или фрагмент антитела не содержат элементы саморасщепления.

57. Способ по любому из пп. 53 - 56 где экспрессионная кассета содержится в векторе, и способ дополнительно определен признаками согласно любому из пп. 29 - 52.

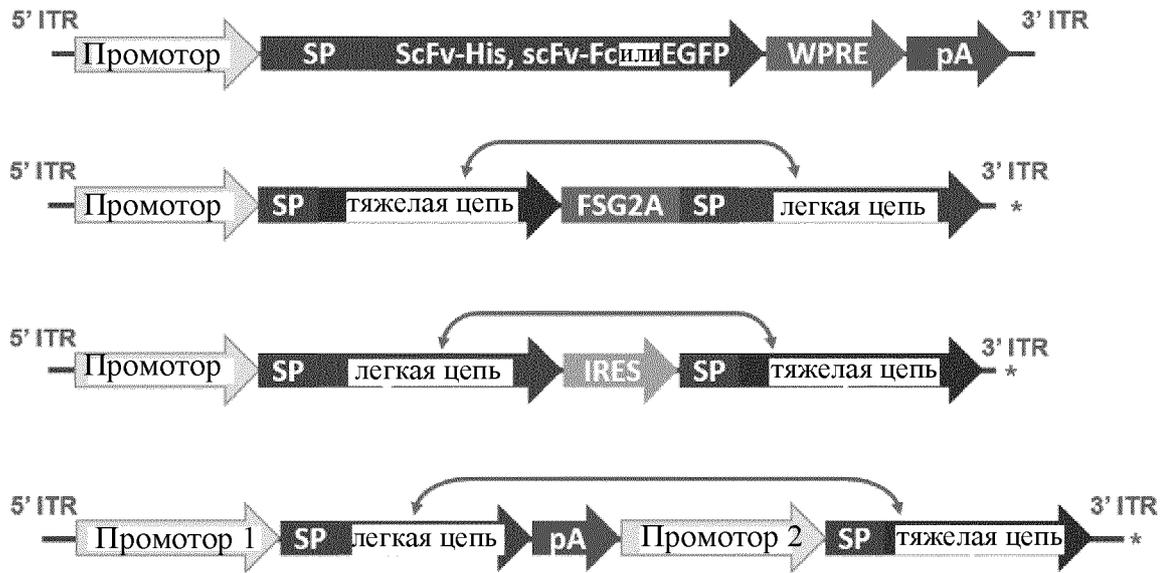
58. Антитело или фрагмент антитела, полученные способами по любому из пп. 53 - 57.

59. Вирусный вектор, содержащий сконструированный вектор AAV2, предпочтительно AAV-BR1, или сконструированный вектор AAV9, такой как AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB или AAV9-PHP-V1, или сконструированный вектор AAV1, такой как AAV1RX, AAV1R6, AAV1R7, или сконструированный вектор AAV10, и где сконструированный вирусный вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': по меньшей мере один промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела, и дополнительно содержащую IRES после первого гена, кодирующего легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и до второго гена, кодирующего тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

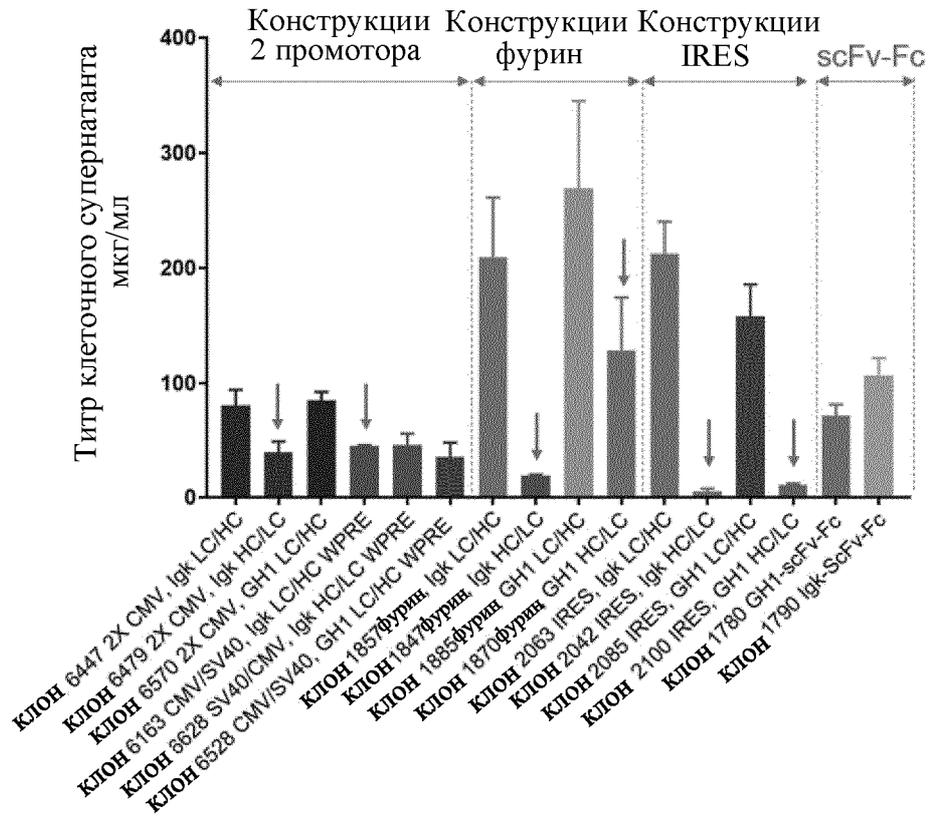
60. Вирусный вектор, содержащий сконструированный вектор AAV2, предпочтительно AAV-BR1, или сконструированный вектор AAV9, такой как AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB или AAV9-PHP-V1, или сконструированный вектор AAV1, такой как AAV1RX, AAV1R6 или AAV1R7, или сконструированный вектор AAV10, и где сконструированный вирусный вектор содержит экспрессионную кассету, содержащую в направлении от 5' к 3': первый промотор, функционально связанный с первым геном, кодирующим легкую цепь антитела или фрагмента антитела, и второй промотор, функционально связанный со вторым геном, кодирующим тяжелую цепь антитела или фрагмента антитела.

61. Сконструированный вирусный вектор по п. 59 или 60, где сконструированный вирусный вектор представляет собой AAV-BR1 или AAV9-RHP-V1.

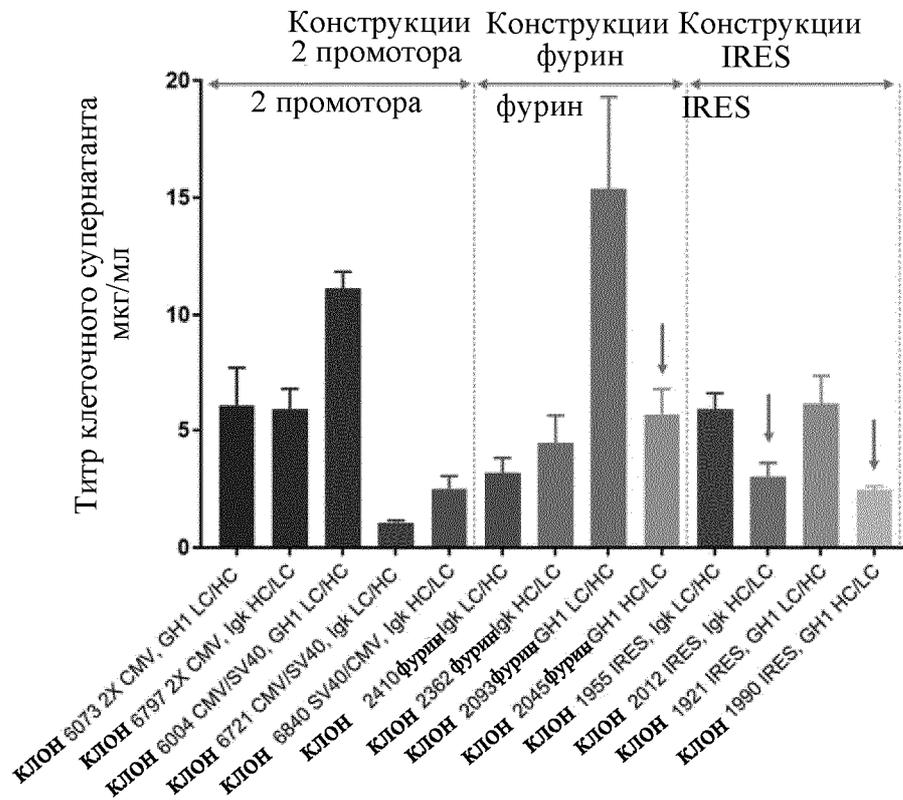
62. Вирусный вектор по любому из пп. 59 - 61, как дополнительно определено согласно любому из пп. 29 - 52.



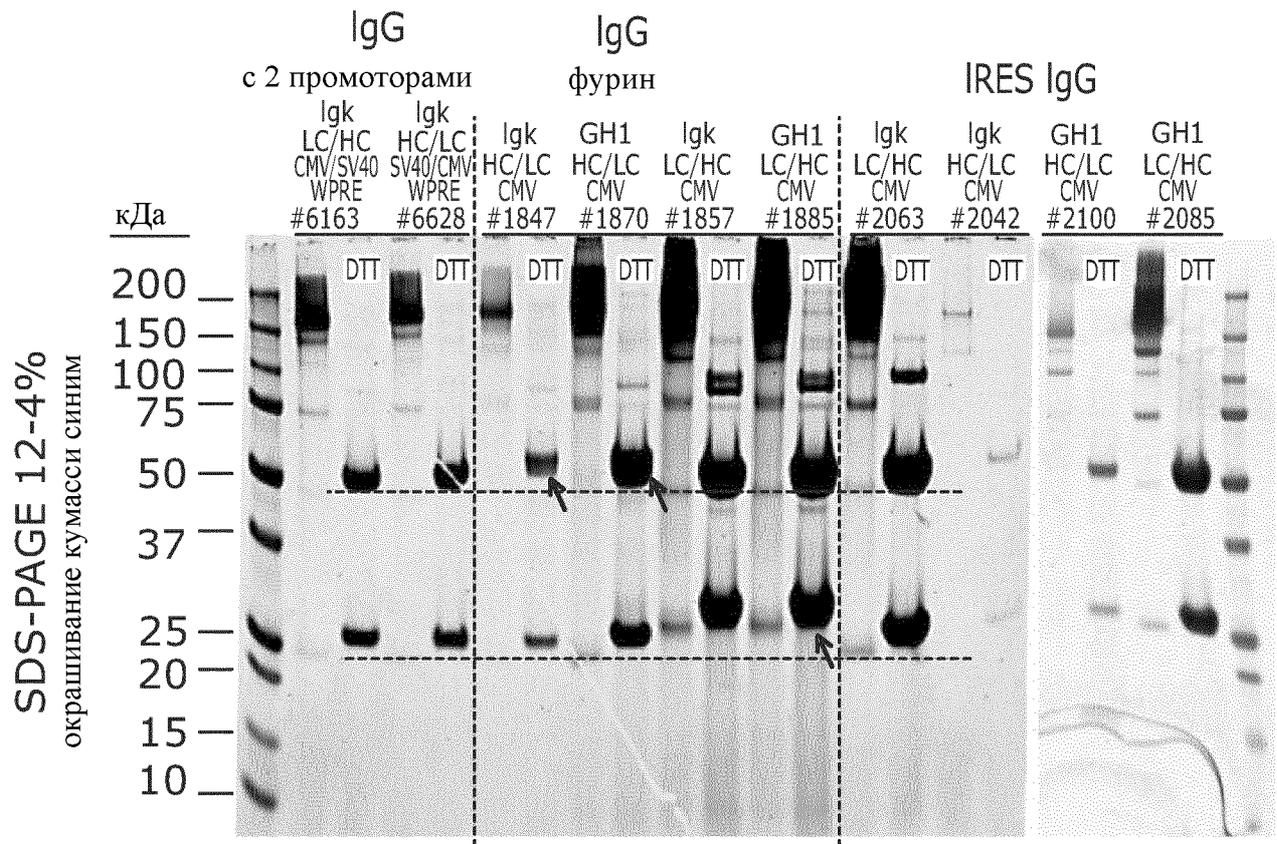
Фиг. 1



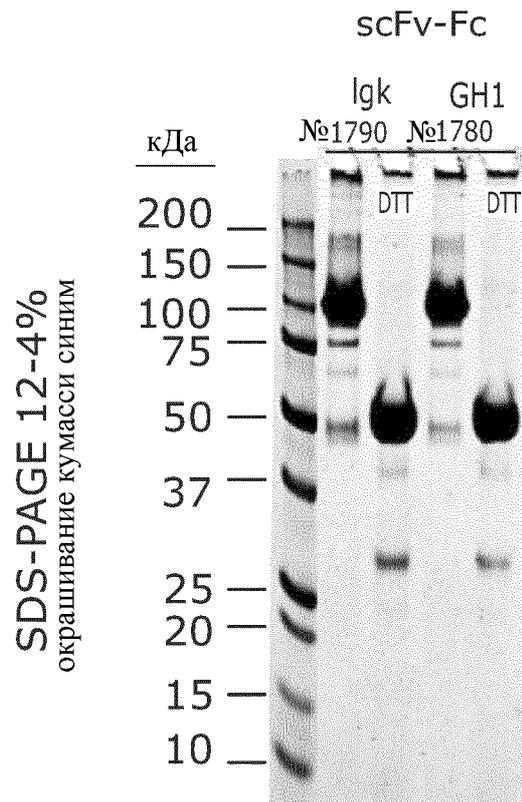
Фиг. 2А



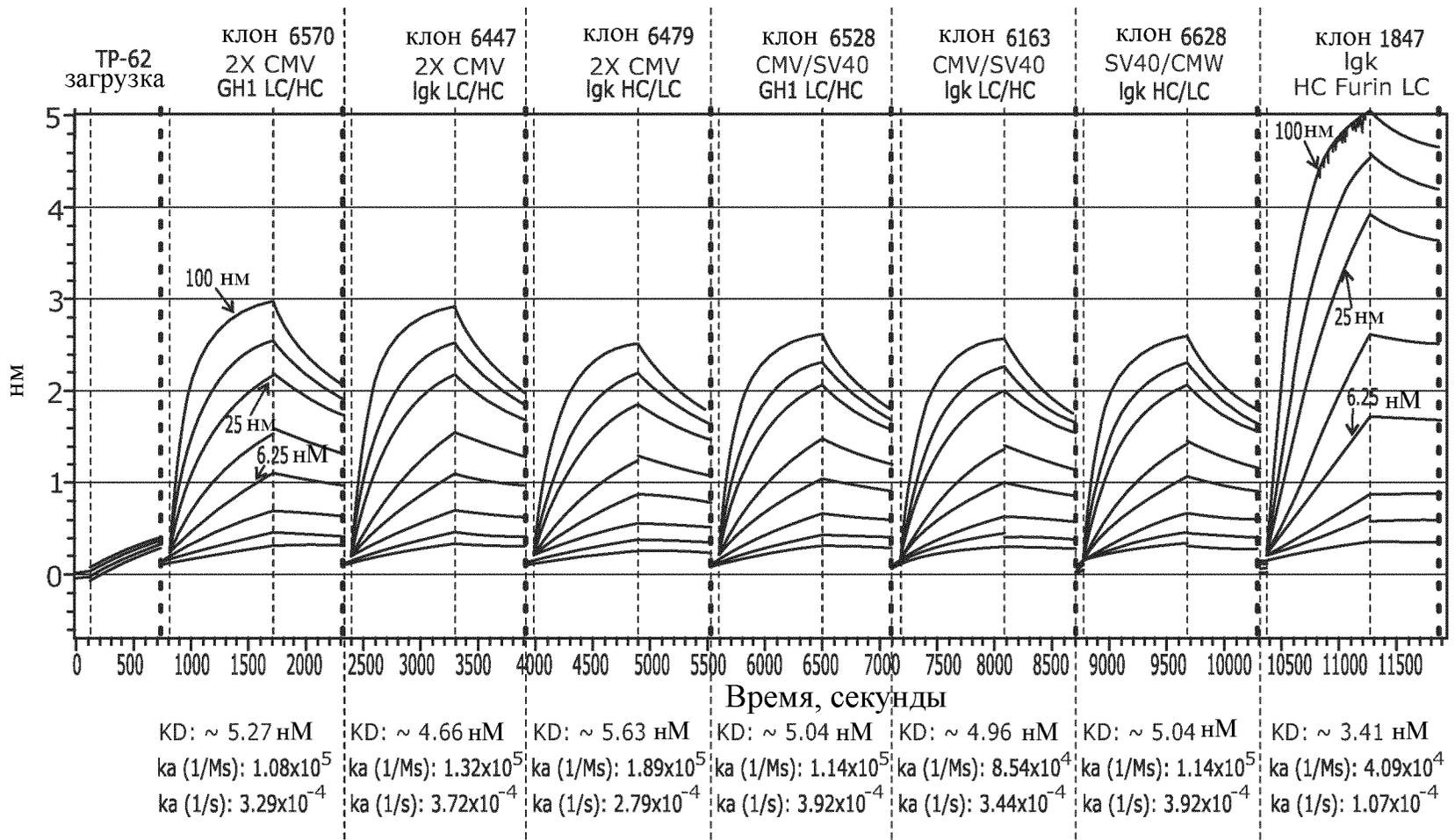
Фиг. 2В



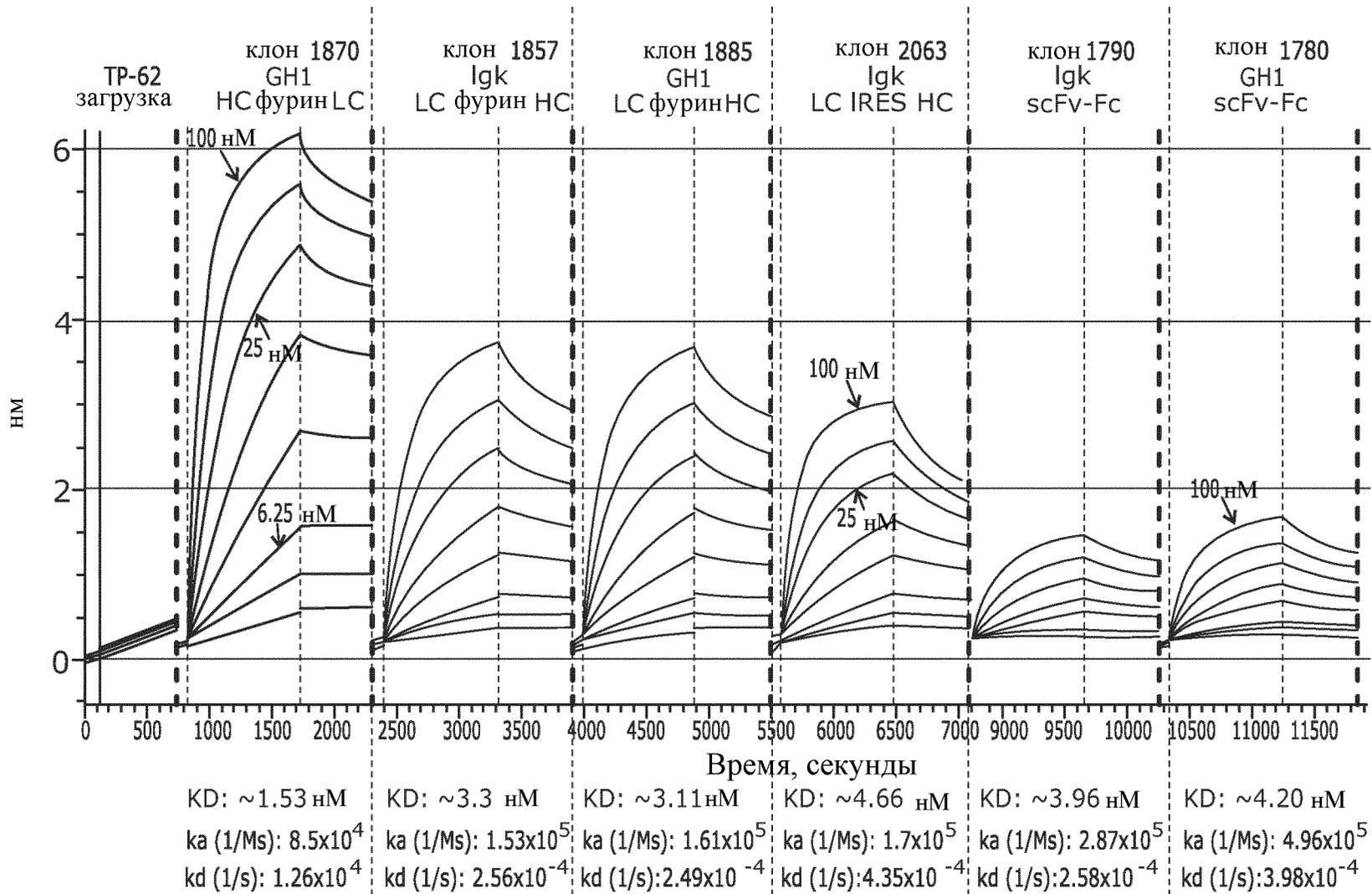
Фиг. 3



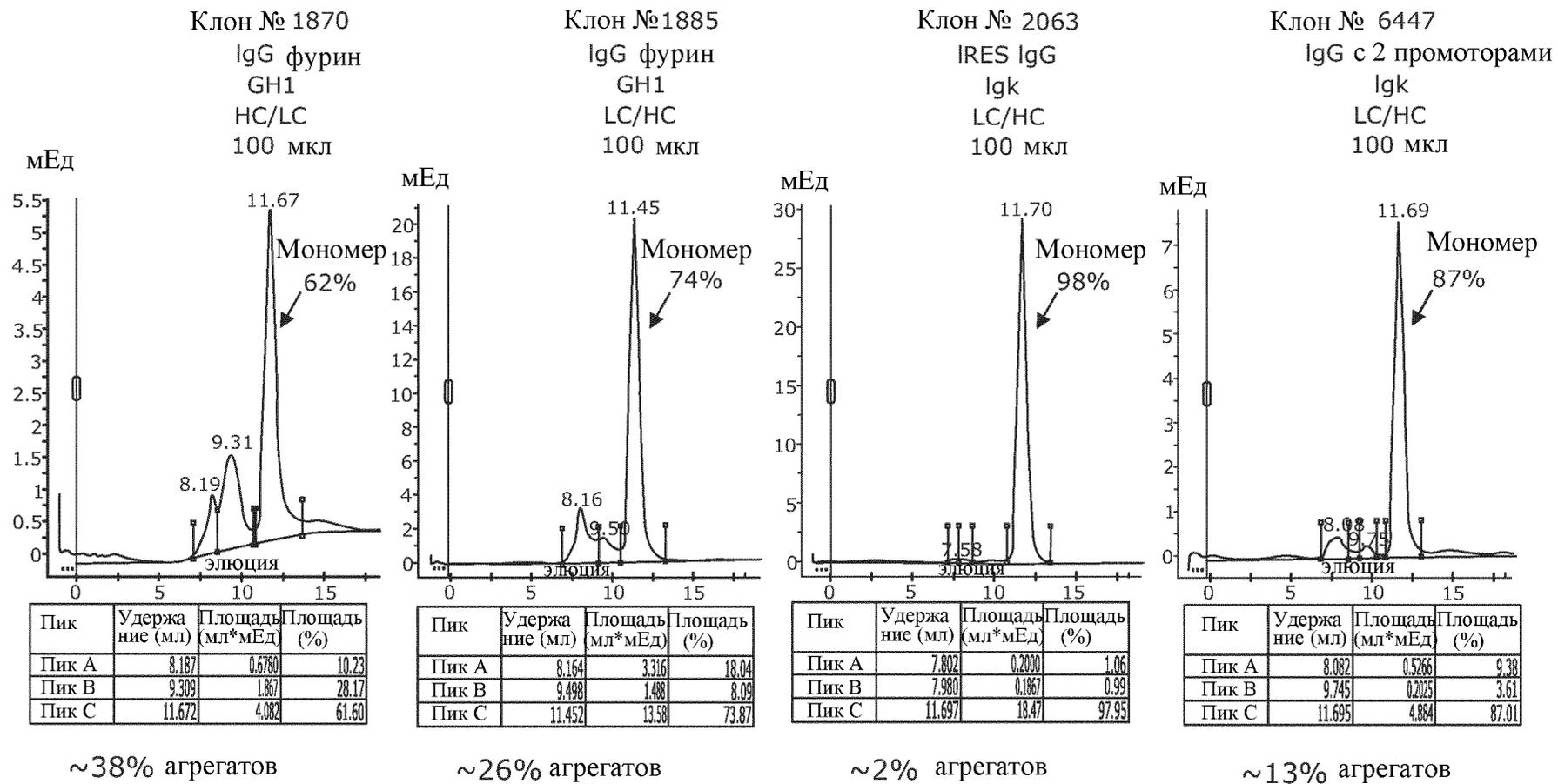
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 5 (продолжение)



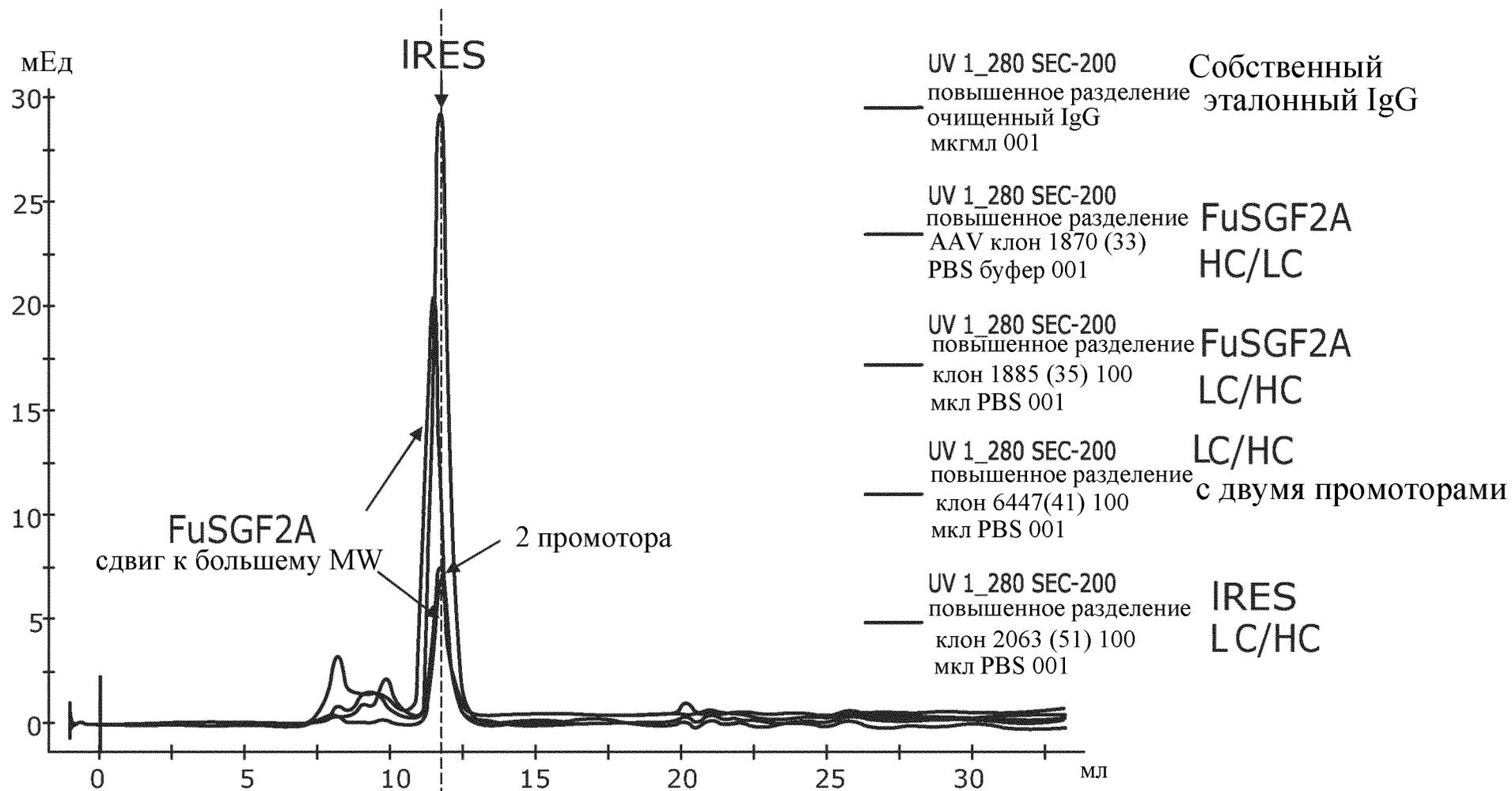
| Пик | Удерживание (мл) | Площадь (мл*мЕд) | Площадь (%) |
|-------|------------------|------------------|-------------|
| Пик А | 8.187 | 0.6780 | 10.23 |
| Пик В | 9.309 | 1.867 | 28.17 |
| Пик С | 11.672 | 4.082 | 61.60 |

| Пик | Удерживание (мл) | Площадь (мл*мЕд) | Площадь (%) |
|-------|------------------|------------------|-------------|
| Пик А | 8.164 | 3.316 | 18.04 |
| Пик В | 9.498 | 1.488 | 8.09 |
| Пик С | 11.452 | 13.58 | 73.87 |

| Пик | Удерживание (мл) | Площадь (мл*мЕд) | Площадь (%) |
|-------|------------------|------------------|-------------|
| Пик А | 7.802 | 0.2000 | 1.06 |
| Пик В | 7.980 | 0.1867 | 0.99 |
| Пик С | 11.697 | 18.47 | 97.95 |

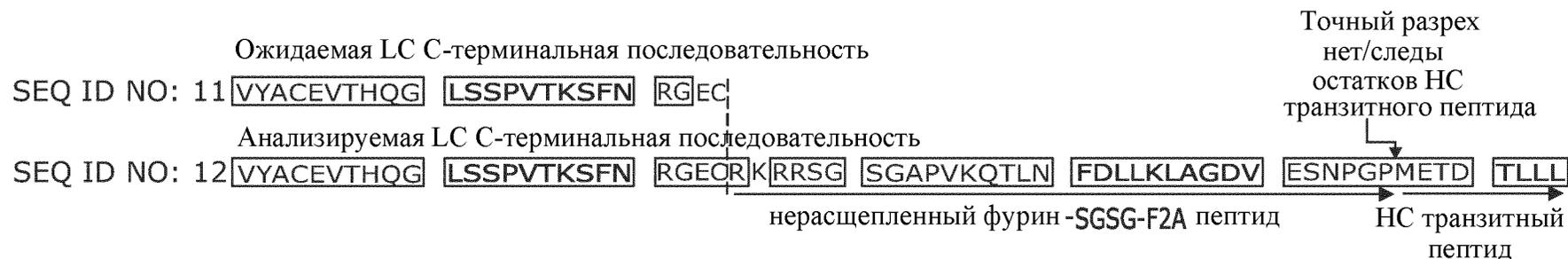
| Пик | Удерживание (мл) | Площадь (мл*мЕд) | Площадь (%) |
|-------|------------------|------------------|-------------|
| Пик А | 8.082 | 0.5266 | 9.38 |
| Пик В | 9.745 | 0.2025 | 3.61 |
| Пик С | 11.695 | 4.884 | 87.01 |

Фиг. 6



Фиг. 7

1. Клон IgG MAB2 LC-фурин-НС

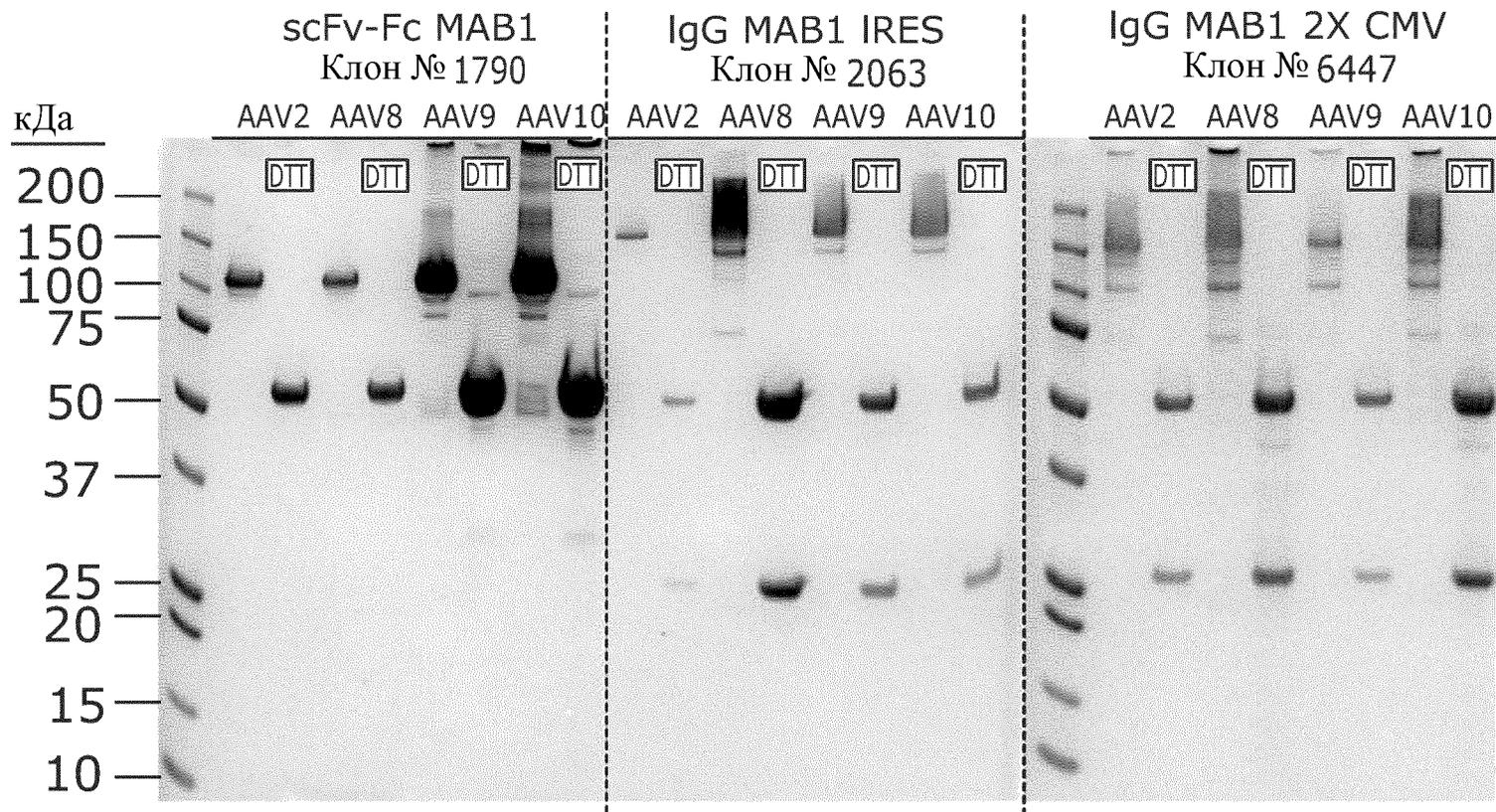


2. Клон IgG MAB2 НС-фурин-LC



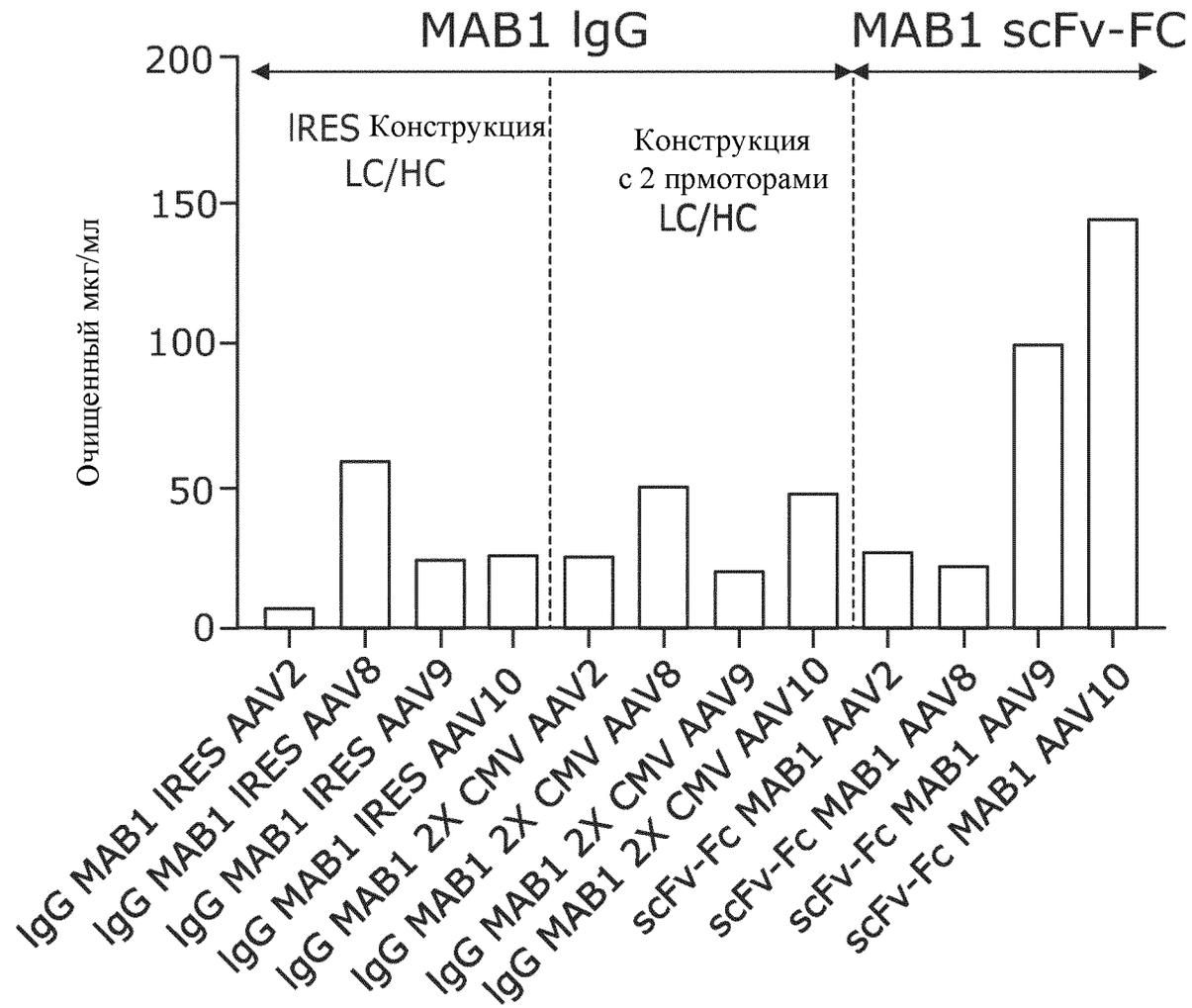
Фиг. 8

SDS-PAGE 12-4%
окрашивание кумасси синим



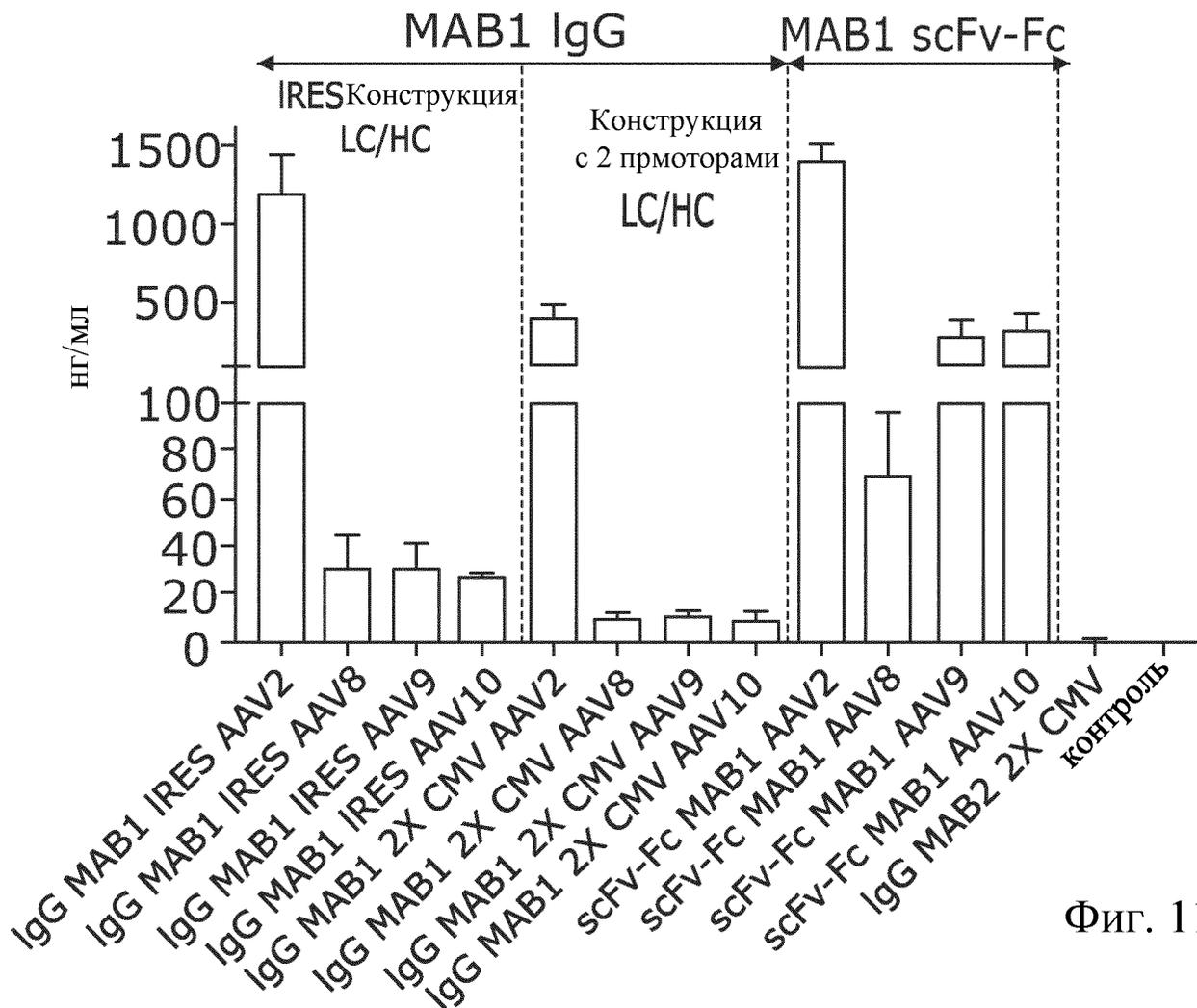
Фиг. 10

Антитела, секретированные клетками CHO, день 12
Средние очищенные титры на мл культуры

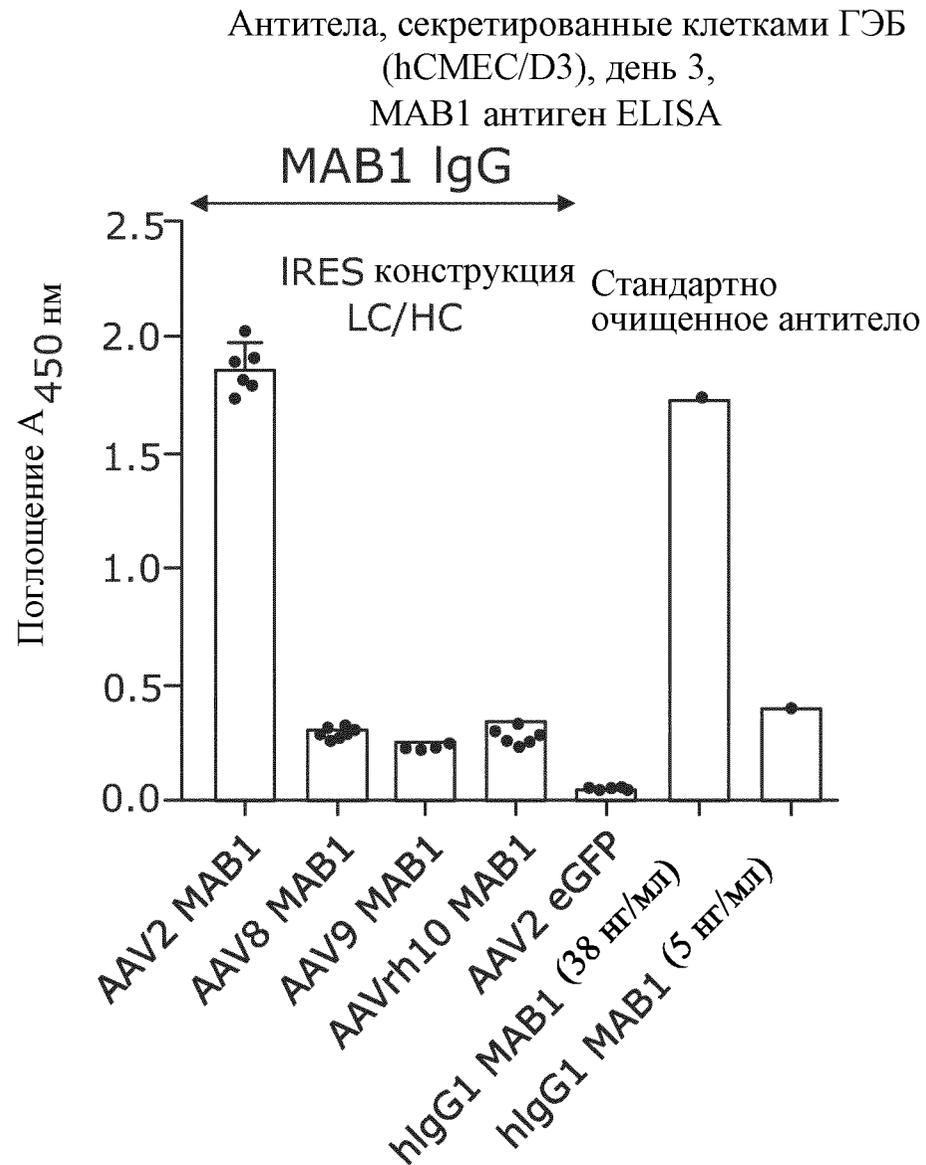


Фиг. 11

Антитела, секретированные дифференцированными нейронами
(SH-SY5Y), день 18,
MAB1 антиген ELISA

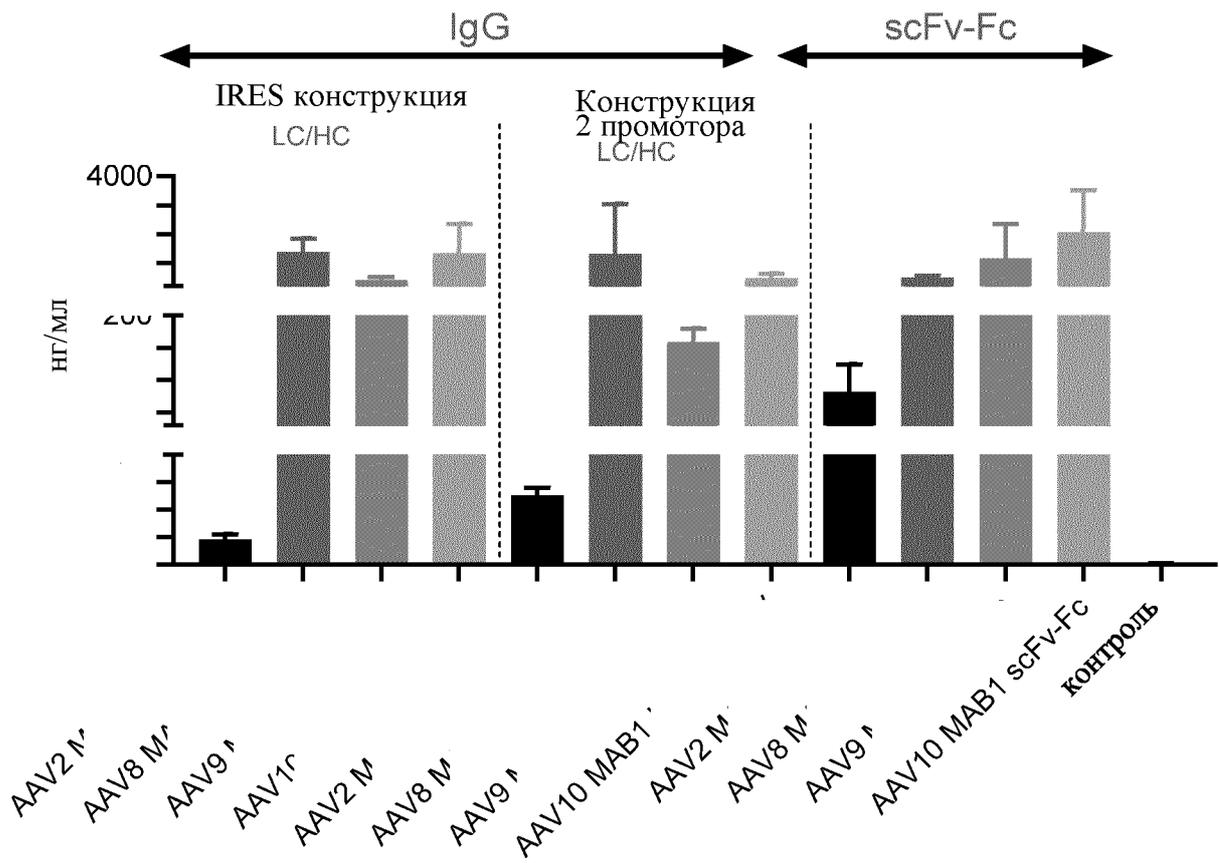


Фиг. 11 (продолжение)

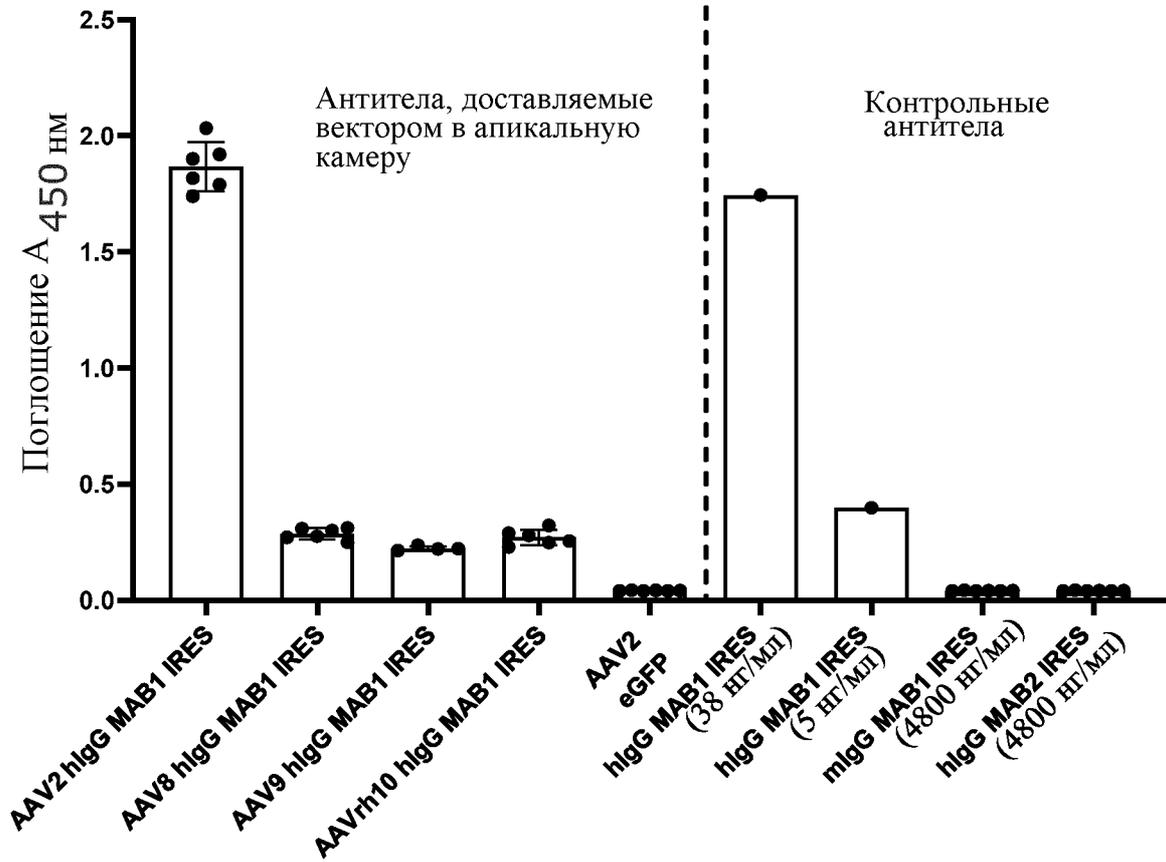


Фиг. 11 (продолжение)

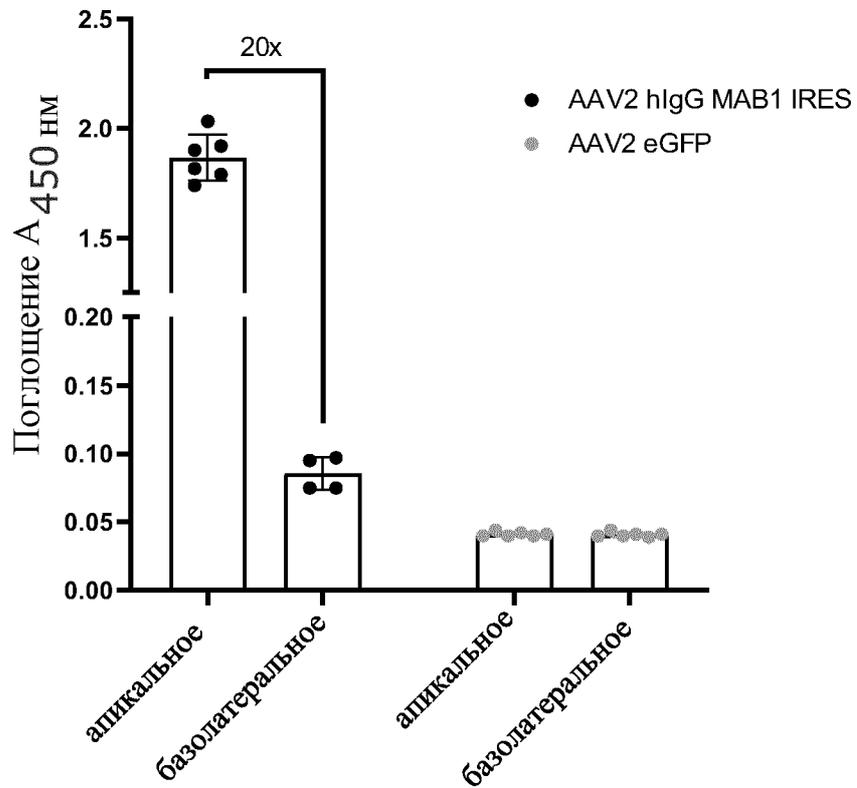
Антитела, секретированные первичными клетками
головного мозга крыс, день 7,
MAB1 антиген ELISA



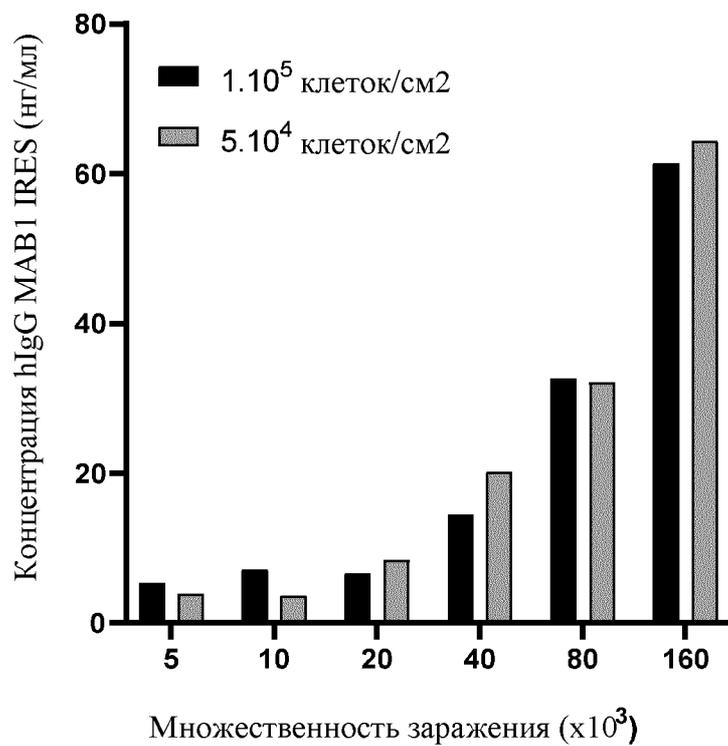
Фиг. 12



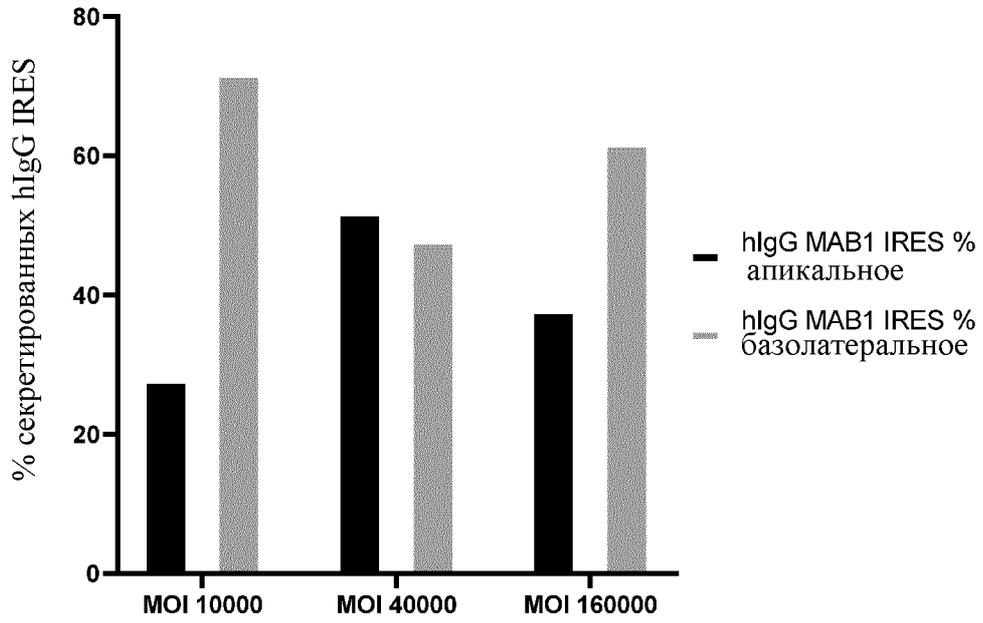
Фиг. 13



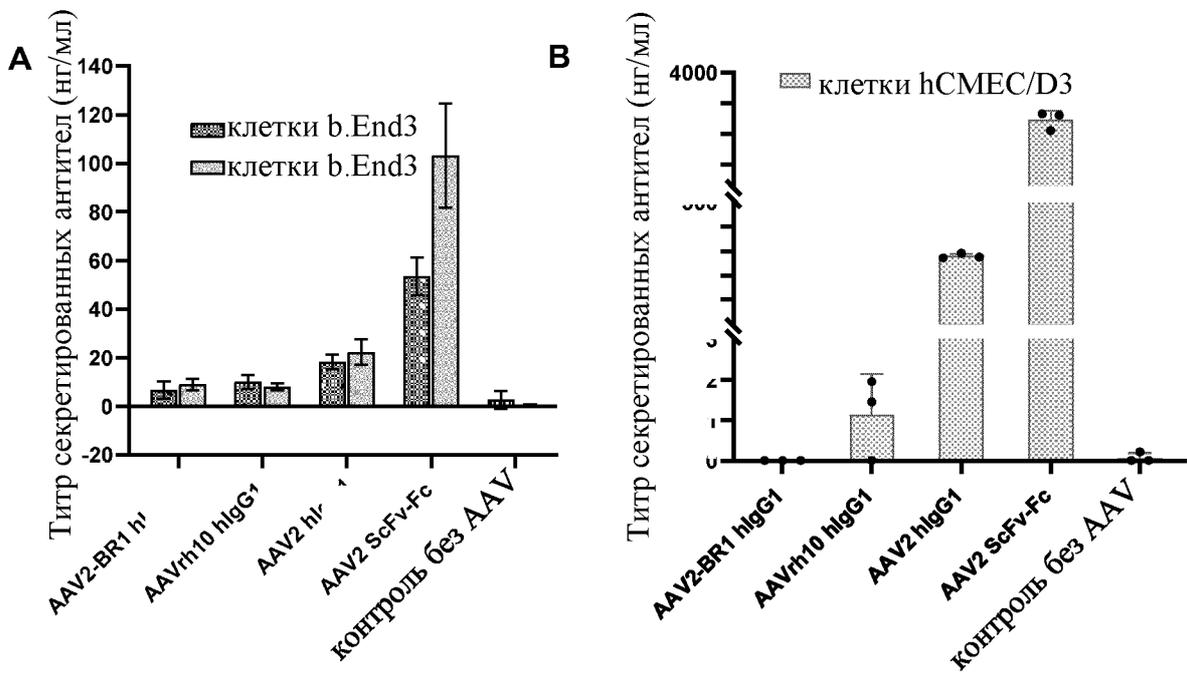
Фиг. 14



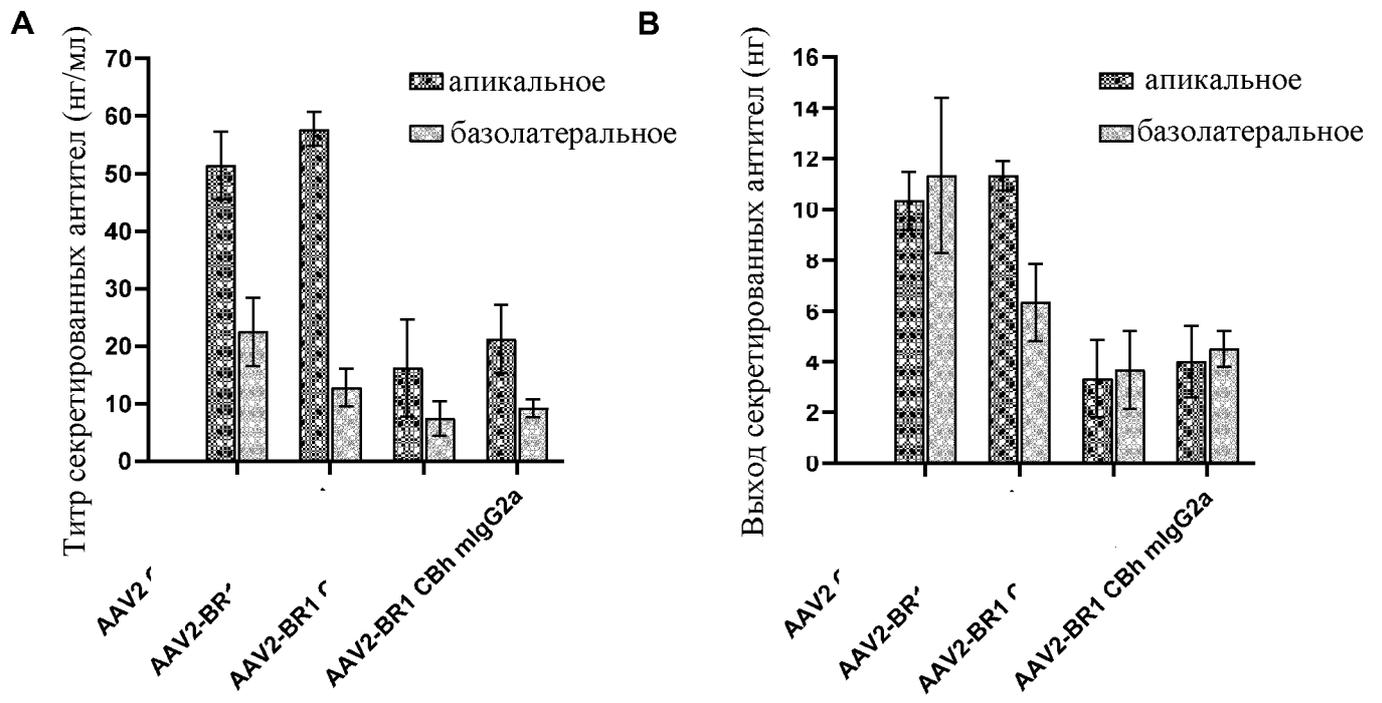
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18