



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.20**

**(21)** Номер заявки  
**201691112**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.12.24**

**(51)** Int. Cl. **C12N 5/0781** (2010.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 15/867** (2006.01)

**(54) ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ EX VIVO**

**(31)** 13199584.7

**(32)** 2013.12.24

**(33)** EP

**(43)** 2017.01.30

**(86)** PCT/NL2014/050908

**(87)** WO 2015/099534 2015.07.02

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КЛИНГ БИОТЕРАПЬЮТИКС Б.В.**  
**(NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ван Хельден Паулина Мария**  
**Вильгельмина, Кваккенбос Марк**  
**Йерун, Спитс Херген, Бомонт Тим**  
**(NL)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** WO-A1-2013076139  
WO-A1-2007067046  
MARK J KWAKKENBOS ET AL.:  
"Generation of stable monoclonal antibody-producing  
B cell receptor-positive human memory B cells by  
genetic programming", NATURE MEDICINE, vol.  
16, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages  
123-128, XP055019451, ISSN: 1078-8956, DOI:  
10.1038/nm.2071 cited in the application abstract  
methods; page 7

Y Akatsuka ET AL.: "Efficient cloning and  
expression of HLA class I cDNA in human B-

lymphoblastoid cell lines", Tissue antigens, 1 June  
2002 (2002-06-01), pages 502-2815, XP055146529,  
Denmark Retrieved from the Internet:URL:http://  
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445320 [retrieved  
on 2014-10-14] abstract

ULRIKE MOCK ET AL.: "Efficient Lentiviral  
Transduction and Transgene Expression in Primary  
Human B Cells", HUMAN GENE THERAPY  
METHODS, vol. 23, no. 6, 1 December 2012  
(2012-12-01), pages 408-415, XP055146537, ISSN:  
1946-6536, DOI:10.1089/hgtb.2012.160 abstract

J. J. HANGER ET AL.: "The Nucleotide  
Sequence of Koala (Phascolarctos cinereus)  
Retrovirus: a Novel Type C Endogenous Virus Related  
to Gibbon Ape Leukemia Virus", JOURNAL OF  
VIROLOGY, vol. 74, no. 9, 1 May 2000 (2000-05-01),  
pages 4264-4272, XP055146544, ISSN: 0022-538X,  
DOI:10.1128/JVI.74.9.4264-4272.2000 abstract table  
1

TING ET AL.: "Simian sarcoma-associated  
virus fails to infect Chinese hamster cells despite  
the presence of functional gibbon ape leukemia  
virus receptors", JOURNAL OF VIROLOGY, THE  
AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY,  
US, vol. 72, no. 12, 1 December 1998 (1998-12-01),  
pages 9453-9458, XP002114342, ISSN: 0022-538X  
abstract

HUIFENG NIU: "The proto-oncogene  
BCL-6 in normal and malignant B cell  
development", HEMATOLOGICAL ONCOLOGY,  
vol. 20, no. 4, 1 January 2002 (2002-01-01), pages  
155-166, XP055146563, ISSN: 0278-0232, DOI:  
10.1002/hon.689, the whole document

**(57)** В изобретении предложены средства и способы для образования улучшенных В-клеточных культур ex vivo с коротким временем удвоения.

Изобретение относится к области медицины, молекулярной биологии и иммунологии.

В-клеточные культуры *ex vivo* являются важными инструментами для образования антител, предпочтительно моноклональных антител. Моноклональные антитела (МАТ) представляют собой несколько идентичных копий одной молекулы антитела, которые связываются с антигенами с одинаковой аффинностью и выполняют одинаковые эффекторные функции. Среди преимуществ МАТ выделяют их специфичность по отношению к одинаковому эпитопу на антигене. Данная специфичность определяет определенные клинические преимущества МАТ по сравнению с более традиционными средствами лечения, одновременно предлагая пациентам эффективный, хорошо переносимый вариант терапии с низкими побочными эффектами в целом. Более того, МАТ являются предпочтительными для биологического и медицинского исследования.

Традиционный подход для получения МАТ представляет собой гибридную технологию, в которой В-клетку сливают с клеткой миеломы с целью формирования гибридного антитела, образуя клеточные линии (гибридомы). Тем не менее гибридная технология с В-клетками человека не была слишком успешной, так как образующиеся в результате гибридомы являются нестабильными. В то же время была разработана улучшенная технология, где получают В-клеточные культуры *ex vivo* с продолжительным репликативным жизненным циклом (WO 2007/067046). Данная технология включает в себя культуры человека *ex vivo*, при этом Vcl-6 совместно с Blimp-1 и/или антиапоптотической нуклеиновой кислотой экспрессируют в В-клетках. Это улучшает репликативный жизненный цикл данных В-клеток. Как правило, В-клетки человека культивируют с целью получения МАТ человека. МАТ человека являются предпочтительными для терапевтических введений в организм человека в связи с более низкой иммуногенностью по сравнению с антителами других видов. Применяя технологию согласно WO 2007/067046, получают В-клеточные культуры человека *ex vivo* со средним временем удвоения примерно 25-36 ч.

В целях коммерческого образования целевых МАТ, таких как терапевтических МАТ, выгодно применять В-клеточные культуры, при этом В-клетки обладают коротким временем удвоения. Короткое время удвоения также является очень важным в терапевтических подходах подобной терапии рака, к примеру, когда млекопитающее, не являющееся человеком, иммунизируют раковыми клетками пациента, после чего проводят сбор специфичных к раку В-клеток из животного и применяют для образования антител *ex vivo*. Поскольку такие антитела являются лекарственными средствами, специально приготовленными для конкретного пациента, их следует образовывать как можно быстрее, чтобы пациент смог начать его/ее АТ-терапию как можно скорее. Такие антитела, которые являются специфичными для опухоли индивидуума, не могут быть образованы заранее.

Одной из задач настоящего изобретения является предложение средств и способов для образования улучшенных В-клеточных культур *ex vivo* с более коротким временем удвоения.

В настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что В-клеточные культуры с более коротким временем удвоения по сравнению с В-клеточными культурами, описанными в WO 2007/067046, получают при применении В-клеток кролика. В то время как широко применяемые В-клетки, такие как В-клетки человека, В-клетки мыши и В-клетки ламы, обычно обладают временем удвоения 25-36 ч, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что В-клеточные культуры кролика можно получить со временем удвоения 20 ч или менее. Обнаружение данного факта обеспечивает значительно быстрое образование целевых антител, приводящее к более высокому выходу в течение определенного периода времени, что особенно ценно для коммерческого образования антител и терапевтических применений.

Соответственно в настоящем изобретении предложено применение В-клетки кролика для получения В-клеточной культуры *ex vivo* со средним временем удвоения 20 ч или менее. Согласно настоящему изобретению В-клеточные культуры кролика *ex vivo*, как правило, получают путем экспрессии Vcl-6 или его кроличьего гомолога и молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в В-клетке кролика. В этой связи также предложен способ для получения В-клеточной культуры *ex vivo* со средним временем удвоения 20 ч или менее, способ, включающий:

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Vcl-6 или его кроличьего гомолога в В-клетке и

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в указанной В-клетке, характеризующийся тем, что указанная В-клетка представляет собой В-клетку кролика.

Предпочтительно образовывать В-клеточные культуры кролика *ex vivo* со средним временем удвоения менее 20 ч. Более предпочтительно, чтобы указанное среднее время удвоения составляло менее 19 ч или даже менее 18 ч. Более короткое время удвоения обеспечивает более быстрое и более высокое образование антител, что улучшает время - и эффективность - проведения исследования и скрининга желаемого антитела и выделения и/или идентификации целевых антител. Более того, если необходимо разработать МАТ для конкретного пациента, более короткое время удвоения В-клеток кролика обеспечивает более быстрое начало специфичной для пациента МАТ терапии.

Таким образом, способ согласно настоящему изобретению с применением В-клеток кролика обеспечивает то преимущество, что антитело можно получить, исследовать, идентифицировать, выделить и/или образовать *ex vivo* в течение более короткого периода времени по сравнению с известными в на-

стоящее время культурами В-клеток человека, мыши или ламы.

Тот факт, что в настоящем изобретении предложена культура В-клеток с коротким временем удвоения, обеспечивает то преимущество, что достаточное количество антитела можно получить в течение более короткого периода времени по сравнению с существующими способами. К примеру, в способе, раскрытом в WO 2007/067046, коллекцию В-клеток, полученных от человеческого индивидуума, стабилизируют, применяя Vcl-6 и антиапоптотическую нуклеиновую кислоту (или соединения, повышающие экспрессию таких нуклеиновых кислот), а затем культивируют. Это приводит к стабилизированным В-клеткам человека, которые способны как пролиферировать, так и вырабатывать антитело. Во время культивирования стабилизированные В-клетки вырабатывают антитело, которое секретируется в культуральную среду. Впоследствии данные антитела предпочтительно исследуют на желаемую специфичность (и/или аффинность). Для существующих в настоящее время методик исследования, как правило, требуется концентрация антитела по меньшей мере 100 нг/мл культуральной среды. Такую минимальную концентрацию антитела получают через 15-20 дней культивирования стабилизированных В-клеток человека. Таким образом, применяя В-клеточные культуры человека, проводят сбор антитела по меньшей мере через 15-20 дней после начала роста культуры, как правило, около 20 дня. В-клетки ламы обладают аналогичной скоростью роста как и В-клетки человека, поэтому если применяют В-клеточную культуру ламы, сбор антитела также, как правило, проводят по меньшей мере через 15-20 дней после начала роста культуры. С В-клетками мыши, обладающими более длительным временем удвоения, антитела с минимальной концентрацией 100 нг/мл, как правило, получают спустя более 20 дней.

После исследования антител, соответствующие целевые В-клетки часто отбирают и выделяют для дальнейшего применения. Учитывая тот факт, что исследование антитела обычно занимает примерно три дня, целевые В-клетки человека или ламы обычно отбирают и выделяют после 18-23 дней с начала роста В-клеточной культуры, в то время как целевые В-клетки мыши, как правило, отбирают и выделяют после более 23 дней. Выделенные В-клетки культивируют далее. Таким образом, В-клеточную культуру с целевыми В-клетками человека, ламы или мыши обычно получают примерно через три недели после начала роста В-клеточной культуры. Тем не менее, со способом согласно настоящему изобретению концентрацию антитела по меньшей мере 100 нг/мл уже получают после 11-12 дней. Таким образом, можно проводить сбор антитела уже на 11-12 день после начала роста В-клеточной культуры, с учетом того, что необходимо поддерживать В-клеточную культуру человека (или ламы) в течение по крайней мере 15-20 дней до проведения сбора антитела. Если процедура исследования занимает три дня, целевые В-клетки кролика, таким образом, отбирают и выделяют в течение 14-15 дней с начала роста В-клеточной культуры, что значительно быстрее по сравнению с ситуацией, где культивируют В-клетки человека или мыши. Подводя итог, в то время, как получение В-клеточной культуры человека, ламы или мыши, которая вырабатывает достаточную концентрацию антитела, обычно занимает примерно три недели, с обнаруженным фактом согласно настоящему изобретению В-клеточную культуру с В-клетками кролика, вырабатывающими достаточную концентрацию АТ, уже получают после двух недель. Это является важным преимуществом по сравнению со существующими способами. В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ для получения антител, предпочтительно для применения в одном или более анализов для тестирования, требующих минимальную концентрацию антитела по меньшей мере 100 нг/мл, способ, включающий:

- индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Vcl-6 в В-клетке кролика;
- индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в указанной В-клетке;
- культивирование указанной В-клетки *ex vivo*; и
- проведение сбора антител, выработанных указанной В-клеткой в течение 10-14 дней, предпочтительно в течение 11-12 дней. Указанные собранные антитела предпочтительно исследуют с применением одного или более анализов, требующих минимальную концентрацию антитела по меньшей мере 100 нг/мл.

Как было описано выше, полученные антитела, как правило, применяют для исследования для желаемой специфичности и/или аффинности. Современные способы исследований обычно требуют минимальную концентрацию антитела 100 нг/мл, однако если применяют более чувствительные способы обнаружения, можно проводить сбор антител раньше. Вне зависимости от чувствительности способа исследования, применяя В-клетки кролика со способом согласно настоящему изобретению, требуемую минимальную концентрацию антитела получают ранее по сравнению с применением известных в настоящее время В-клеток человека, ламы или мыши в связи со значительно более быстрым временем удвоения В-клеток кролика. К примеру, если необходима минимальная концентрация антитела только 30 нг/мл вместо 100 нг/мл, данную концентрацию, как правило, достигают, применяя В-клетки человека после 13-18 дней с начала роста В-клеточной культуры, в то время как В-клеточной культуре кролика потребовалось бы только 9-10 дней, чтобы получить данную минимальную концентрацию антитела. Таким образом, опять же исследование антитела и выделение целевых В-клеток можно выполнять раньше. В настоящее время на практике изобретатели получают и исследуют антитела кролика в течение 7-14 дней с начала роста В-клеточной культуры. До настоящего изобретения В-клеточные культуры *ex vivo*, позво-

ляющие исследовать антитела на значительно ранних стадиях по сравнению с В-клеточными культурами человека *ex vivo*, не были доступны. В связи с этим также предложен способ для получения антител, способ, включающий:

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Vcl-6 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика;

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в указанной В-клетке;

культивирование указанной В-клетки *ex vivo*; и

проведение сбора антител, выработанных указанной В-клеткой в течение 7-14 дней, предпочтительно в течение 9-12 или 9-10 дней. Указанные собранные антитела предпочтительно исследуют с применением одного или более анализов, требующих минимальную концентрацию антитела примерно 30 нг/мл.

В контексте настоящего описания термин "В-клетка кролика" означает В-клетку, которую получили из кролика или В-клетки, которая происходит из В-клетки кролика.

Пример В-клеток, происходящих из В-клетки кролика, представляет собой потомство В-клетки кролика, сформированное после одного или более циклов клеточного деления. Такое потомство, к примеру, содержит культуру В-клеток кролика *ex vivo*.

В-клеточная культура кролика *ex vivo* представляет собой культуру, которая содержит В-клетки кролика и/или их потомство. Другие виды клеток также могут присутствовать в культуре. Например, клетки В-клеточных митогенов, такие как положительные L-клетки CD40 и/или клетки EL4B5, как правило, также присутствуют в В-клеточной культуре согласно настоящему изобретению. Кроме того, другие виды клеток, которые также присутствовали в образце, содержащем В-клетки, все также могли присутствовать в В-клеточной культуре. Если они присутствуют в условиях культивирования В-клеток, такие не В-клетки, как правило, в меньшей степени способны к пролиферации по сравнению с В-клетками, так что число таких загрязняющих клеток, как правило, со временем будет снижаться. Предпочтительно по меньшей мере 70% клеток В-клеточной культуры кролика представляют собой В-клетки кролика. Более предпочтительно по меньшей мере 75, 80, 85, 90 или 95% клеток указанной В-клеточной культуры кролика представляют собой В-клетки кролика. В конкретно предпочтительном варианте реализации В-клетки кролика и клетки В-клеточных митогенов, такие как положительные L-клетки CD40 и/или клетки EL4B5, по существу являются единственными видами клеток, присутствующими в В-клеточной культуре кролика.

Предпочтительно В-клетки В-клеточной культуры кролика согласно настоящему изобретению представляют собой потомство одной исходной В-клетки кролика, так что моноклональные антитела вырабатываются В-клеточной культурой.

В контексте настоящего описания термин "среднее время удвоения" определяют как требуемое среднее время, взяв за начало культуру с определенным исходным количеством В-клеток, для получения культуры с числом В-клеток, которое в два раза выше упомянутого исходного числа В-клеток. Так как не каждая В-клетка будет пролиферировать с абсолютно одинаковой скоростью, используют, как правило, средние значения для В-клеточной культуры в целом.

Vcl-6 кодирует транскрипционный репрессор, который необходим для нормального развития и созревания В-клеток и Т-клеток и который необходим для формирования зародышевых центров. В зародышевом центре В-клеток происходит сильная экспрессия Vcl-6, в то время как в плазматических клетках экспрессии почти не происходит. Vcl-6 ингибирует дифференцировку активированных В-клеток в плазматических клетках. В способе согласно настоящему изобретению продукт экспрессии Vcl-6 или продукт экспрессии его кроличьего гомолога остается присутствовать в В-клетках кролика культуры *ex vivo*. Присутствие Vcl-6 или его кроличьего гомолога совместно с присутствием антиапоптотической нуклеиновой кислоты, продлевает репликативный жизненный цикл В-клеток. Экспрессию Vcl-6 или его кроличьего гомолога предпочтительно индуцируют, улучшают или поддерживают посредством введения в В-клетку(-и) кролика, применяемую(-ых) для культивирования, соединения, способствующего экспрессии Vcl-6, или соединения, которое стимулирует экспрессию кроличьего гомолога Vcl-6, или путем культивирования В-клеток кролика в присутствии такого соединения.

В связи с этим также предложен способ согласно настоящему изобретению, включающий:

обеспечение указанных В-клеток кролика соединением, способным напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Vcl-6 или экспрессию кроличьего гомолога Vcl-6; и/или

культивирование указанной В-клетки кролика в присутствии соединения, способного напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Vcl-6 или экспрессию кроличьего гомолога Vcl-6.

В данной области техники известны различные соединения, способные напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Vcl-6 или экспрессию кроличьего гомолога Vcl-6. К примеру, такое соединение содержит белок-преобразователь сигнала и активации транскрипции 5 (STAT5) или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и/или его кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты. STAT5 представляет собой преобразователь сигнала, способный улучшать экспрессию Vcl-6. Существует две известные формы STAT5, STAT5a и STAT5b, которые

кодируются двумя различными последовательно сцепленными генами. Введение и/или активация STAT5 или его кроличьего гомолога приводит к увеличенному содержанию Bcl-6 или увеличенному содержанию кроличьего гомолога Bcl-6. Следовательно, STAT5 или его кроличий гомолог, или его функциональная часть или функциональное производное, способен напрямую увеличивать экспрессию Bcl-6 или экспрессию кроличьего гомолога Bcl-6. В связи с этим предложен способ согласно настоящему изобретению, включающий обеспечение указанной В-клетки кролика STAT5 или его кроличьим гомологом, или его функциональной частью или функциональным производным, или обеспечение указанной В-клетки кролика молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей STAT5 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, или культивирование указанной В-клетки кролика в присутствии STAT5 или в присутствии его кроличьего гомолога, или его функциональной части или функционального производного.

Присутствие STAT5 или его кроличьего гомолога, напрямую увеличивает количество Bcl-6 или количество кроличьего гомолога Bcl-6. Кроме того, можно опосредованно увеличивать экспрессию Bcl-6 или экспрессию его кроличьего гомолога. К примеру, это проводят посредством регулирования количества определенного соединения, которое, в свою очередь, способно напрямую или опосредованно активировать STAT5 или его кроличий гомолог и/или увеличивать экспрессию STAT5 или экспрессию его кроличьего гомолога. Следовательно, в одном варианте реализации увеличивают экспрессию и/или активность эндогенного и/или экзогенного STAT5 или экспрессию его кроличьего гомолога. К примеру, можно опосредованно улучшить экспрессию Bcl-6 или экспрессию его кроличьего гомолога посредством культивирования В-клетки кролика в присутствии интерлейкина (IL) 2 и/или IL4, которые способны активировать STAT5 или активировать кроличий гомолог STAT5, что, в свою очередь, увеличивает экспрессию Bcl-6 или экспрессию кроличьего гомолога Bcl-6.

В контексте настоящего описания термин "кроличий гомолог", к примеру, Bcl-6 или STAT5 означает белок кролика, аналогичный Bcl-6 или STAT5, что означает, что в В-клетках кролика он выполняет аналогичную, схожую функцию в сравнении с функцией Bcl-6 или STAT5 в В-клетках человека.

Однако предпочтительно обеспечивать В-клетку кролика молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6 или кодирующей его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное. Таким образом, можно напрямую регулировать концентрацию Bcl-6 или концентрацию его кроличьего гомолога в указанной В-клетке кролика. В связи с этим также предложен способ согласно настоящему изобретению, включающий обеспечение указанной В-клетки кролика молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6, или кодирующей его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное. В одном варианте реализации указанная молекула нуклеиновой кислоты является конститутивно активной, что означает, что происходит постоянная экспрессия Bcl-6 или его кроличьего гомолога, или его функциональной части или функционального производного, вне зависимости от присутствия регулятора. В другом варианте реализации указанная молекула нуклеиновой кислоты является индуцируемой, что означает, что ее экспрессия регулируется по крайней мере одним индуктором и/или репрессором. Таким образом, экспрессию указанной молекулы нуклеиновой кислоты регулируют по желанию. К примеру, системы экспрессии Tet-On и Tet-Off (например, улучшенные индуцибельные системы экспрессии гена Tet-on® и Tet-Off®, Clontech) можно применять для индуцибельной экспрессии целевой последовательности нуклеиновой кислоты. В данных системах экспрессию транскрипционного активатора (tTA) регулируют посредством наличия (Tet-On) или отсутствия (Tet-Off) тетрациклина (TC) или производного, подобного доксициклину (dox). В принципе, tTA состоит из Tet-репрессорного белка кишечной палочки (TetR) и трансактивирующего домена VP16 вируса простого герпеса. tTA регулирует транскрипцию целевой последовательности нуклеиновой кислоты под контролем чувствительного к тетрациклину элемента (TRE), содержащего последовательность ДНК Tet-оператора (TetO) и последовательность промотора, к примеру, промотора цитомегаловируса человека (hCMV). Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую, к примеру, Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, можно помещать после данного промотора.

В системе Tet-off tTA связывается с TRE при отсутствии TC или dox, и транскрипция целевой последовательности нуклеиновой кислоты активируется, в то время как в присутствии TC или dox tTA не может связаться с TRE, и экспрессия целевой последовательности нуклеиновой кислоты ингибируется. В отличие от этого, в системе Tet-On применяют обратный tTA (rtTA), который может связываться только с TRE в присутствии dox. Транскрипцию целевой последовательности нуклеиновой кислоты ингибируют при отсутствии dox и активируют в присутствии dox.

В другом варианте реализации индуцибельную экспрессию осуществляют, применяя гормональную индуцибельную систему экспрессии гена, к примеру, такую как экдизон-индуцибельную систему экспрессии гена (например, RheoSwitch®, New England Biolabs) (Christopherson, K.S. и др. PNAS 89, 6314-8 (1992)). Экдизон представляет собой стероидный гормон насекомых, например, от *Drosophila melanogaster*. В клетках, трансфицированных экдизонным рецептором, гетеродимер, состоящий из экдизонового рецептора (Ecr) и ретиноидного X-рецептора (RXR), образуется в присутствии агониста экдизона, вы-

бранного из экдизона, одного из его аналогов, таких как муристерона А и понастерона А, и нестероидного агониста экдизона. В присутствии агониста Ecg и RXR взаимодействуют и связываются с элементом ответа экдизона, который присутствует на каскаде экспрессии. Экспрессию целевой последовательности нуклеиновой кислоты, которую помещают в каскад экспрессии после элемента ответа экдизона, таким образом индуцируют посредством воздействия на В-клетки кролика агониста экдизона.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения индуцибельную экспрессию осуществляют, применяя арабинозо-индуцибельную систему экспрессии гена (к примеру, набор pBAD/gIII, Invitrogen) (Guzman, L.M. и др. *Bacteriol* 177, 4121-4130 (1995)). Арабиноза представляет собой моносахарид, содержащий пять атомов углерода. В клетках, трансфицированных арабинозо-индуцибельным промоторм РВАD, экспрессию целевой последовательности нуклеиновой кислоты, помещенной после РВАD, далее можно индуцировать в присутствии арабинозы.

Кроме того, также можно применять (молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую) белок Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, при этом активность указанного выше Bcl-6 или кроличьего гомолога, или функциональной части, или функционального производного регулируется по меньшей мере одним индуктором и/или репрессором. Неограничивающий пример представляет собой белок слияния, при этом регулирующий элемент слит с последовательностью, кодирующей по меньшей мере часть Bcl-6 или его кроличий гомолог. К примеру, осуществляют слияние рецептора эстрогена (ER) с Bcl-6, что в результате приводит к белку слияния ER-Bcl-6. Данный белок слияния является неактивным, так как он образует комплекс с белками теплового шока в цитозоле. После введения экзогенного индуктора 4-гидрокси-тамоксифена (4HT), белок слияния ER-Bcl-6 отделяется от белков теплового шока, так что Bcl-6 часть белка слияния становится активной.

В контексте настоящего описания термин "молекула антиапоптотической нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна задерживать и/или предотвращать апоптоз в В-клетке кролика. Предпочтительно, указанная молекула антиапоптотической нуклеиновой кислоты способна задерживать и/или предотвращать апоптоз в В-клетке кролика, подобной плазматической, которая способна как пролиферировать, так и вырабатывать антитело. Предпочтительно применять молекулу антиапоптотической нуклеиновой кислоты, которая содержит экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты. Это означает, что применяют либо последовательность нуклеиновой кислоты, которая не экспрессируется в В-клетках кролика в естественных условиях, либо применяют дополнительную копию последовательности нуклеиновой кислоты, встречающуюся в естественных условиях, так что экспрессия в образующихся в результате В-клетках кролика улучшена по сравнению с природными В-клетками кролика.

Различные молекулы антиапоптотических нуклеиновых кислот известны в данной области техники, так что различные варианты реализации доступны. Предпочтительно применять молекулу антиапоптотической нуклеиновой кислоты, которая является антиапоптотическим членом семейства Bcl-2, потому что антиапоптотические белки Bcl-2 являются хорошими ингибиторами апоптоза в В-клетках. Многие процессы, которые контролирует семейство Bcl-2 (чье семейство содержит как про-, так и антиапоптотические белки), относятся к митохондриальному пути апоптоза. Применение антиапоптотических членов семейства Bcl-2 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, белка A1, родственного Bcl-2 (также называемый Bcl2-A1 или A1), Bcl-2 подобного 10 (Bcl2L10) и Mcl-1, или их кроличьих гомологов, или их функциональной части или функционального производного, является предпочтительным, так как Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Bcl2L10 и Mcl-1 в целом интегрированы с внешней митохондриальной мембраной. Они напрямую связываются и ингибируют проапоптотические белки, которые принадлежат к семейству Bcl-2, для защиты целостности митохондриальной мембраны.

В связи с этим, в предпочтительном варианте реализации предложен способ согласно настоящему изобретению, причем указанная антиапоптотическая молекула нуклеиновой кислоты содержит антиапоптотический ген семейства Bcl-2, предпочтительно Bcl-xL или Mcl-1, или Bcl-2, или A1, или Bcl-w, или Bcl2L10, или их кроличьего гомолога, или их функциональную часть или функциональное производное.

В одном варианте реализации, экспрессию Bcl-xL или Mcl-1, или Bcl-2, или A1, или Bcl-w, или Bcl2L10, или их кроличьего гомолога, индуцируют, улучшают или поддерживают посредством введения в В-клетку(-ки) кролика по меньшей мере одного соединения, способного стимулировать экспрессию любого из данных антиапоптотических генов, или посредством культивирования В-клеток кролика в присутствии такого(-их) соединения(-ий). В связи с этим также предложен способ согласно настоящему изобретению, включающей:

обеспечение указанной В-клетки кролика соединением, способным напрямую или опосредованно улучшать экспрессию Bcl-xL и/или Mcl-1, и/или Bcl-2, и/или A1, и/или Bcl-w, и/или Bcl2L10, или их кроличьего гомолога; и/или

культивирование указанной В-клетки кролика в присутствии соединения, способного напрямую или опосредованно улучшать экспрессию Bcl-xL и/или Mcl-1, и/или Bcl-2, и/или A1, и/или Bcl-w, и/или Bcl2L10, или их кроличьего гомолога.

Тем не менее предпочтительно обеспечивать В-клетку кролика по меньшей мере одной молекулой

нуклеиновой кислоты, кодирующей антиапоптотический ген семейства Bcl-2, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 и их кроличьих гомологов, и их функциональных частей и функциональных производных. Таким образом, также можно непосредственно увеличить количество продукта экспрессии в указанной В-клетке кролика. В связи с этим также предложен способ согласно настоящему изобретению, включающий обеспечение указанных В-клеток кролика по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиапоптотический ген семейства Bcl-2, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 и их кроличьих гомологов, и их функциональных частей и функциональных производных. В одном варианте реализации указанная молекула нуклеиновой кислоты является конститутивно активной, что означает, что указанная молекула нуклеиновой кислоты непрерывно экспрессируется. В другом варианте реализации указанная молекула нуклеиновой кислоты является индуцибельной, что означает, что ее экспрессия регулируется по крайней мере одним индуктором и/или репрессором. Неограничивающие примеры индуцибельных систем экспрессии нуклеиновой кислоты, известных в данной области техники, ранее представлены в настоящем описании.

В особенно предпочтительном варианте реализации указанная молекула антиапоптотической нуклеиновой кислоты кодирует Bcl-xL или Mcl-1, или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное. Согласно настоящему изобретению комбинация Bcl-6 и Bcl-xL особенно хорошо способна увеличить репликативный жизненный цикл В-клеток кролика, тем самым формируя долговечные культуры полученных в результате В-клеток кролика, подобных лимфобластам. То же самое справедливо и для комбинации Bcl-6 и Mcl-1. Наиболее предпочтительно указанная молекула антиапоптотической нуклеиновой кислоты кодирует Bcl-xL или его функциональную часть или функциональное производное.

Функциональная часть Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 или их кроличьего гомолога представляет собой белковую молекулу, которая обладает той же возможностью - по существу, не обязательно по количеству - увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика по сравнению с природными Bcl-6, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-W или Bcl2L10, или их кроличьим гомологом соответственно. Такая функциональная часть, к примеру, лишена аминокислот, которые не участвуют, или участвуют только очень мало в указанной способности.

К примеру, функциональные части Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 или их кроличьего гомолога, определены в настоящем описании как фрагменты Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 соответственно, или их кроличьего гомолога, которые сохранили тот же самый тип антиапоптотических характеристик, как и полнодлинные Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 соответственно, или их кроличий гомолог (по существу, не обязательно по количеству). Функциональные части Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 или их кроличьего гомолога, как правило, представляют собой более короткие фрагменты Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 соответственно или их кроличьего гомолога, которые способны задерживать и/или предотвращать апоптоз в В-клетке кролика. Такие функциональные части, к примеру, лишены последовательностей, которые не вносят значительный вклад в антиапоптотическую активность Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10. Функциональная часть Bcl-6 или его кроличьего гомолога, к примеру, представляет собой более короткий фрагмент Bcl-6 или более короткий фрагмент его кроличьего гомолога, который способен увеличить репликативный жизненный цикл В-клетки кролика.

Функциональное производное Bcl-6, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w или Bcl2L10, или их кроличьего гомолога, определен в настоящем описании как белок Bcl-6, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w или Bcl2L10 соответственно, или их кроличьего гомолога, который изменили, однако сохранили его способность (по существу, не обязательно по количеству) увеличивать репликативный жизненный цикл В-клетки кролика. Функциональное производное получают многими способами, к примеру, путем замены консервативной аминокислоты, при этом одну аминокислоту заменяют другой аминокислотой в целом с аналогичными свойствами (размер, гидрофобность и т.д.) таким образом, чтобы серьезно не повлиять на общее функционирование. В качестве альтернативы, функциональное производное, к примеру, содержит белок слияния с обнаруживаемой меткой или с индуцибельным соединением.

Другой аспект настоящего изобретения разрешает проблему эффективного введения целевой молекулы нуклеиновой кислоты в В-клетки кролика. Вопреки ожиданиям, авторы настоящего изобретения обнаружили, что широко применяемый амфоретровирусный вектор, который является подходящим для инфицирования клеток грызунов, таких как клеток мышей, и который, следовательно, должен был быть также способен к трансдукции В-клетки кролика, оказался неспособным эффективно трансдуцировать В-клетки кролика; эффективность трансдукции амфовектора через 4 дня после трансдукции в В-клетках кролика оказалась ниже 1%. Таким образом, авторы настоящего изобретения были вынуждены искать другие носители доставки гена. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что носитель доставки гена, который содержит внеклеточный домен белка оболочки вируса лейкоза гиблинов (GALV), способен к трансдукции В-клеток кролика с высокой эффективностью, как правило, 80-90% в течение 3-5 дней после трансдукции. Данное свойство было довольно неожиданным, так как вирус лейкоза гиблинов в естественных условиях не инфицирует кроликов. Следовательно, не ожидали, что клетки кролика

будут содержать рецептор для белка оболочки GALV; текущий вывод был простым совпадением. Следует отметить, что эффективность трансдукции В-клеток человека с вектором, содержащим внеклеточный домен белка оболочки GALV, как правило, составляет 60-70% через 4 дня после трансдукции, которая обычно ниже, чем эффективность трансдукции В-клеток кролика с данным вектором, несмотря на то, что В-клетки человека представляют собой клетки примата. Это удивительно потому, что, так как обезьяна также является приматом, ожидалось, что вектор, содержащий белок оболочки на основе GALV, будет способен лучше инфицировать клетки приматов по сравнению с кроличьими клетками. Следует отметить, что применение вектора, содержащего внеклеточный домен белка оболочки GALV, действительно неэффективно трансдуцирует В-клетки мыши, что согласуется с тем фактом, что вирус лейкоза гиббонов не инфицирует мышей.

Теперь когда представлен обнаруженный факт настоящего изобретения, что можно эффективно трансдуцировать В-клетки кролика с применением по меньшей мере функциональной части внеклеточного домена белка оболочки GALV, и что эффективность трансдукции даже выше, чем эффективность трансдукции В-клеток человека, стали доступны новые сферы прикладных задач. Теперь стало возможным вводить целевую молекулу нуклеиновой кислоты в В-клетки кролика с высокой эффективностью, что в частности является преимущественным для образования В-клеточной культуры кролика согласно настоящему изобретению. В связи с этим в предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ для увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика, способ, включающий:

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Bcl-6 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика и

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии по меньшей мере одной антиапоптотической нуклеиновой кислоты в указанной В-клетке,

характеризующийся тем, что указанную В-клетку кролика обеспечивают молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6, или кодирующей его кроличий гомолог, или кодирующей его функциональную часть или функциональное производное, и/или по меньшей мере одной молекулой антиапоптотической нуклеиновой кислоты через трансдукцию с носителем доставки гена, который содержит внеклеточный домен белка оболочки вируса лейкоза гиббонов (GALV), или по меньшей мере функциональную часть указанного внеклеточного домена, или через трансдукцию с носителем доставки гена, содержащим белок, имеющим по меньшей мере 70% идентичность последовательности с внеклеточным доменом белка оболочки GALV, или через трансдукцию с носителем доставки гена, содержащим белок, имеющий по меньшей мере 70% идентичность последовательности с по меньшей мере функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV. В одном предпочтительном варианте реализации указанный внеклеточный домен представляет собой белок оболочки GALV штамма SEATO. Указанный внеклеточный домен предпочтительно содержит последовательность

```
MVLLPGSMLLTSNLHHLRHQMSPGSKWRLIILLSCVFGGGTSLQKNPNHPMTLTLTWQ
VLSQTGDVVWDTKAVQPPWTWWPTLKPDPVCALAASLESWDIPGTDVSSSKRVRPPDS
DYTAAYKQITWGAIGCSYPRARTRMASSTFYVCPDRGRTLSEARRCGGLESPLYCKEWD
CETTGTGYWLSKSSKDLITVKWDQNSEWTQKFQCHQTGWCNPLKIDFTDKGKLSKD
WITGKTWGLRFYVSGHPGVQFTIRLKITNMPAVAVGPDVLVEQGPRTSLALPPPLPPR
EAPPPSLPDSNSTALATSAQTPTVRKTIVTLNTPPTTGDRLFDLVQGAFTLNATNPGAT
ESCWLCLAMGPPYYEAIASSGEVAYSTDLCRCRWGTQGKLTLEVS GHGLCIGKVPFTH
QHLCNQTLSSINSSGDHQYLLPSNHSWWACSTGLTPCLSTSVFNQTRDFCIQVQLPRIYY
YPEEVLLQAYDNSHPRTKREAVSLTLAVLLGLGITAGIGTGSTALIKGPIDLQGLTSLQI
AIDADLRALQDSVSKLEDSLTSLEVVQLNRRGLDLLFLKEGGLCAALKECCFYIDHSG
AVRDSMKKLLKELDKRQLERQKSNQWYEGWFNNSPWFTLL.
```

Предпочтительно указанная идентичность последовательности составляет по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 81%, более предпочтительно по меньшей мере 82%, более предпочтительно по меньшей мере 83%, более предпочтительно по меньшей мере 84%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, указанный внеклеточный домен, который расположен на поверхности (оболочке) вируса лейкоза гиббонов дикого типа, так что он может свя-

зываются с клеткой-хозяином, также предпочтительно расположен на поверхности (оболочке) носителя доставки гена для трансдукции В-клеток кролика. В одном особенно предпочтительном варианте реализации применяют вектор или другой носитель доставки генов, который содержит белок оболочки, содержащий внеклеточный домен и трансмембранный домен белка оболочки GALV или его функциональную часть, который слит с цитоплазматическим доменом белком амфооболочки. Это позволяет осуществлять конкретную эффективную трансдукцию В-клеток кролика, как показано в примерах.

В контексте настоящего описания термин "функциональная часть внеклеточного домена белка оболочки GALV" означает часть указанного внеклеточного домена, который при этом еще способен к связыванию с В-клетками кролика, тем самым содействуя инфицированию и/или трансдукции В-клеток кролика. В такой функциональной части может отсутствовать один или несколько аминокислотных остатков, которые не являются существенными для связывания, инфицирования и/или трансдукции В-клетки кролика.

Безусловно, теперь, когда предложен обнаруженный факт настоящего изобретения, можно осуществлять трансдукцию В-клеток кролика с любой целевой молекулой нуклеиновой кислоты, применяя по меньшей мере функциональную часть внеклеточного домена белка оболочки GALV. В связи с этим также предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, связанная с внеклеточным доменом белка оболочки GALV или связанная по меньшей мере с функциональной частью указанного внеклеточного домена, или связанная с белком, имеющим по меньшей мере 70% идентичность последовательности с по меньшей мере функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV. Также при этом предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, которую связывают по меньшей мере через функциональную часть внеклеточного домена белка оболочки GALV или через белок, имеющий по меньшей мере 70% идентичность последовательности с по меньшей мере функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV, с носителем доставки гена. В одном предпочтительном варианте реализации указанный внеклеточный домен представляет собой внеклеточный домен белка оболочки GALV штамма SEATO. Указанный внеклеточный домен предпочтительно содержит последовательность

```
MVLLPGSMMLTSLNLHHLRHQMSPGSWKRLIILLSCVFGGGTSLQNKNPHPMTLTWQ
VLSQTDVVDWTKAVQPPWTWWPTLKPDPVCALAASLESWDIPGTDVSSSKRVRPPDS
DYTAAYKQITWGAIGCSYPRARTRMASSTFYVCPDRDRTLSEARRCGGLESLYCKEWD
CETTGTGYWLSKSSKDLITVKWDQNSEWTQKFQCHQTGWCNPLKIDFTDKGKLSKD
WITGKTWGLRFYVSGHPGVQFTIRLKITNMPAVAVGPDVLVEQGPRTSLALPPPLPPR
EAPPSLPDSNSTALATSQTPTVRKTIVTLNTPPTTGDRLFDLVQGAFLTLNATNPGAT
ESCWLCLAMGPPYEAIASSGEVAYSTDLDRCRWGTQGKLTLEVS GHGLCIGKVPFTH
QHLCNQTLINSNGDHQYLLPSNHSWACSTGLTPCLSTSVFNQTRDFCIQVQLPRIYY
YPEEVLLQAYDNSHPRTKREAVSLTLAVLLGLGITAGIGTGSTALIKGPIDLQGLTSLQI
AIDADLRALQDSVSKLEDSLTSLEVVQLNRRGLDLLFLKEGGCAALKECCFYIDHSG
AVRDSMKKLEKLDKRQLERQKSNWYEGWFNNSPWFTLL.
```

И в этом случае указанная идентичность последовательности предпочтительно составляет по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 81%, более предпочтительно по меньшей мере 82%, более предпочтительно по меньшей мере 83%, более предпочтительно по меньшей мере 84%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 86%, более предпочтительно по меньшей мере 87%, более предпочтительно по меньшей мере 88%, более предпочтительно по меньшей мере 89%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 91%, более предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно по меньшей мере 93%, более предпочтительно по меньшей мере 94%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно 100%. Указанный носитель доставки гена предпочтительно содержит целевую молекулу нуклеиновой кислоты, предпочтительно последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и/или последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты. С таким носителем доставки гена, можно произвести устойчивую культуру В-клетки кролика согласно настоящему изобретению. Указанная последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой антиапоптотический ген семейства Bcl2, наиболее предпочтительно выбранный из группы, состоящей из Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl2L10 и их кроличьих гомологов, и их функциональных частей и функциональных производных.

Также при этом предложено применение внеклеточного домена белка оболочки GALV или по крайней мере его функциональной части, которая способна связываться с В-клеткой кролика, для введе-

ния целевой молекулы нуклеиновой кислоты в В-клетку кролика, также как и применение белка, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с по меньшей мере функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV, для введения целевой молекулы нуклеиновой кислоты в В-клетку кролика. Также предложено применение носителя доставки гена, содержащего по меньшей мере функциональную часть внеклеточного домена белка оболочки GALV, или носителя доставки гена, содержащего белок, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с по меньшей мере функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV, указанного носителя доставки гена, дополнительно содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и по меньшей мере одну последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты для увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика. В одном предпочтительном варианте реализации указанный внеклеточный домен представляет собой внеклеточный домен белка оболочки GALV штамма SEATO. Указанный внеклеточный домен предпочтительно содержит последовательность

```
MVLLPGSMMLTNSLHHLRHQMSPGSKRLIILLSCVFGGGTSLQKNPHQPMTLTWQ
VLSQTDGVDVWDTKAVQPPWTWWPTLKPVCALAASLESWDIPGTDVSSSKRVRPPDS
DYTAAYKQITWGAIGCSYPRARTRMASSTFYVCPDGRITLSEARRCGGLESLYCKEWD
CETTGTGYWLSKSSKDLITVKWDQNSEWTQKFQCHQTGWCNPLKIDFTDKGKLSKD
WITGKTWGLRFYVSGHPGVQFTIRLKITNMPAVAVGPDVLVLEQGPRTSLALPPPLPPR
EAPPSLPDSNSTALATSAQTPTVRKTIVTLNTPPPTTGDRFLDLVQGAFLTLNATNPGAT
ESCWLCLAMGPPYYEAIASSGEVAYSTDLDRCRWGTQGKLTLEVSGHGLCIGKVPFTH
QHLCNQTLSSNGDHQYLLPSNHSWWACSTGLTPCLSTSVMFNQTRDFCIQVQLPRIYY
YPEEVLLQAYDNSHPRTKREAVSLTAVLLGLGITAGIGTGSTALIKGPIDLQOGLTSLQI
AIDADLRALQDSVSKLEDSLTSLEVVQLNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYIDHSG
AVRDSMKKLEKLDKRQLERQKSQNWYEGWFNNSPWFTTLL.
```

Предпочтительный химерный белок оболочки, который также применяют в Примерах, представлен на фиг. 9. Данный химерный белок оболочки содержит внеклеточный домен белка оболочки GALV (с последовательностью

```
MVLLPGSMMLTNSLHHLRHQMSPGSKRLIILLSCVFGGGTSLQKNPHQPMTLTWQ
VLSQTDGVDVWDTKAVQPPWTWWPTLKPVCALAASLESWDIPGTDVSSSKRVRPPDS
DYTAAYKQITWGAIGCSYPRARTRMASSTFYVCPDGRITLSEARRCGGLESLYCKEWD
CETTGTGYWLSKSSKDLITVKWDQNSEWTQKFQCHQTGWCNPLKIDFTDKGKLSKD
WITGKTWGLRFYVSGHPGVQFTIRLKITNMPAVAVGPDVLVLEQGPRTSLALPPPLPPR
EAPPSLPDSNSTALATSAQTPTVRKTIVTLNTPPPTTGDRFLDLVQGAFLTLNATNPGAT
ESCWLCLAMGPPYYEAIASSGEVAYSTDLDRCRWGTQGKLTLEVSGHGLCIGKVPFTH
QHLCNQTLSSNGDHQYLLPSNHSWWACSTGLTPCLSTSVMFNQTRDFCIQVQLPRIYY
YPEEVLLQAYDNSHPRTKREAVSLTAVLLGLGITAGIGTGSTALIKGPIDLQOGLTSLQI
AIDADLRALQDSVSKLEDSLTSLEVVQLNRRGLDLLFLKEGGLCAALKEECCFYIDHSG
AVRDSMKKLEKLDKRQLERQKSQNWYEGWFNNSPWFTTLL,
```

выделена жирным шрифтом на фиг. 9) и трансмембранный домен белка оболочки GALV (с последовательностью STIAGPLLLLLLLLLILGPCII, обозначена через подчеркивание на фиг. 9), слитый с цитоплазматическим доменом белка амфооболочки (с последовательностью NRLVQFVKDRISVVQALVLTQQYHQLKPIEYEP, выделена курсивом и подчеркнута пунктиром на фиг. 9). Вектор или другой носитель доставки гена, содержащий данный предпочтительный химерный белок оболочки, особенно хорошо способен вводить целевую молекулу нуклеиновой кислоты в В-клетки кролика.

В связи с этим также предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, связанная с химерным белком оболочки как показано на фиг. 9 или с белком, содержащим химерный белок оболочки как показано на фиг. 9, или с белком, имеющим по меньшей мере 70% идентичность последовательности с химерным белком оболочки как показано на фиг. 9. При этом также предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, которую связывают через химерный белок оболочки как показано на фиг. 9 или через белок, содержащий химерный белок оболочки как показано на фиг. 9, или через белок, имеющий по меньшей мере 70% идентичность последовательности с химерным белком оболочки как показано на фиг. 9, с вектором или другим носителем доставки гена.

Такой вектор или другой носитель доставки гена в частности является подходящим для трансдукции В-клетки кролика с целевой молекулой нуклеиновой кислоты. В связи с этим также предложено

применение химерного белка оболочки как показано на фиг. 9 или белка, содержащего химерный белок оболочки как показано на фиг. 9, или белка, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с химерным белком оболочки как показано на фиг. 9, для введения целевой молекулы нуклеиновой кислоты в В-клетку кролика.

Такой вектор или другой носитель доставки гена в частности является подходящим для увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика. В связи с этим также предложен способ для увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика, способ, включающий:

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Vcl-6 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика и

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии по меньшей мере одной антиапоптотической нуклеиновой кислоты в указанной В-клетке,

характеризующийся тем, что указанную В-клетку кролика обеспечивают молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей Vcl-6 или кодирующей его кроличий гомолог, или кодирующей его функциональную часть или функциональное производное, и/или по меньшей мере одной молекулой антиапоптотической нуклеиновой кислоты через трансдукцию с вектором или другим носителем доставки гена, содержащим химерный белок оболочки как показано на фиг. 9 или белок, содержащим химерный белок оболочки как показано на фиг. 9, или белок, имеющим по меньшей мере 70% идентичность последовательности с химерным белком оболочки как показано на фиг. 9.

Также предложено применение носителя доставки генов, содержащего химерный белок оболочки как показано на фиг. 9 или белок, содержащий химерный белок оболочки как показано на фиг. 9, или белок, имеющий по меньшей мере 70% идентичность последовательности с химерным белком оболочки как показано на фиг. 9, указанного носителя доставки гена, дополнительно содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Vcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и по меньшей мере одну последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты для увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика. Следует подчеркнуть, что хотя носитель доставки гена на основе GALV является очень подходящим для эффективной трансдукции В-клеток кролика с одной или более целевой(-ми) молекулой(-ами) нуклеиновой(-ых) кислоты(-т), такой как Vcl-6 и молекулой антиапоптотической нуклеиновой кислоты, применение носителя доставки гена на основе GALV не является обязательным для получения В-клеток кролика с коротким временем удвоения 20 ч или менее. Другие носители доставки гена можно применять для введения Vcl-6 и молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в В-клетки кролика (хотя эффективность зачастую будет ниже) с целью получения В-клеток кролика со временем удвоения 20 ч или менее. По мере того, как Vcl-6 и молекулу антиапоптотической нуклеиновой кислоты вводят в В-клетки кролика, можно получить быстрорастущую В-клеточную культуру, хотя для того, чтобы вырастить меньшее количество изначально трансдуцированных В-клеток кролика, может потребоваться больше времени. Преимущество применения носителя доставки гена, способного к эффективной трансдукции В-клеток кролика, такого как носителя доставки гена на основе GALV как представлено в настоящем описании, состоит в том, что подвергаться трансдукции будет повышенное соотношение изначально выделенных В-клеток, так что В-клетки, полученные из них, будут присутствовать в полученной в результате В-клеточной культуре. Это приводит к более высокому разнообразию В-клеток в В-клеточной культуре по сравнению с ситуацией, где применяют носитель доставки гена с более низкой эффективностью трансдукции, потому что в последнем случае подвергается трансдукции низкое соотношение исходных В-клеток. Присутствие более высокого разнообразия В-клеток в полученной в результате В-клеточной культуры повышает вероятность выделения одной или нескольких В-клеток с желаемым свойством. Следовательно, в принципе, чем выше эффективность трансдукции носителя доставки гена, тем выше разнообразие В-клеток в полученной в результате В-клеточной культуре.

Для того, чтобы индуцировать экспрессию в В-клетках кролика, целевую молекулу нуклеиновой кислоты предпочтительно функционально связывают с промотором. Неограничивающие примеры включают в себя промотор CMV и промотор CAG. В одном аспекте, такой промотор является индуцибельным, что означает, что его активность зависит по меньшей мере от одного соединения, такого, как фактора транскрипции.

В контексте настоящего описания термин "носитель доставки гена" означает любое соединение, способное переносить молекулу нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Неограничивающие примеры носителя доставки гена включают в себя (вирусные) векторы и плазмиды. Термин "носитель доставки гена, содержащий по меньшей мере функциональную часть внеклеточного домена белка оболочки GALV" означает носитель доставки гена, содержащий по меньшей мере часть внеклеточного домена белка оболочки GALV, при этом указанный внеклеточный домен или его указанная часть, способны связываться с В-клеткой кролика, так что нуклеиновую кислоту можно вводить в указанную В-клетку кролика. Как представлено выше в настоящем описании, указанный внеклеточный домен или его часть предпочтительно размещен на поверхности носителя доставки гена, так что он может связываться с рецептором на В-клетке кролика. Точно так же, если носитель доставки гена согласно настоящему изобретению содержит белок, имеющий по меньшей мере 70% идентичность последовательности по меньшей

мере с функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV, указанный белок предпочтительно размещен на поверхности носителя доставки гена, так что он может связываться с рецептором на В-клетке кролика.

Процент идентичности аминокислоты или последовательности нуклеиновой кислоты, или термин "% идентичности последовательности" в настоящем описании определен как процент остатков в потенциально подходящей аминокислоте или последовательности нуклеиновой кислоты, которая совпадает с остатками в эталонной последовательности после совмещения двух последовательностей и введения брешей, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности. Способы и компьютерные программы для совмещения хорошо известны в данной области техники, например, "Align 2".

Белок оболочки GALV представляет собой белок, который в естественных условиях присутствует в вирусной оболочке вируса лейкоза гиббонов и который участвует в инфицировании клеток-хозяев. Целевая специфичность обычно определяется белком оболочки. В одном варианте реализации, указанный белок оболочки представляет собой белок оболочки GALV штамма SEATO. Ретровирусные векторы, содержащие белок оболочки GALV, известны в данной области техники и их можно получить, применяя методики, которые широко применяются в области молекулярной биологии, к примеру, см. Lam и др., 1996.

Термин "функционально связанный с промотором" означает, что целевая последовательность нуклеиновой кислоты достаточно близко размещена к промотору, так что промотор может влиять на ее экспрессию. Как правило, такой промотор будет индуцировать или повышать экспрессию указанной целевой нуклеиновой кислоты. Термин "активность экспрессии" относится к такой индукции или усилению экспрессии.

Как было упомянуто ранее в настоящем описании, в настоящем изобретении предложен обнаруженный факт того, что В-клеточную культуру кролика можно получить с более коротким средним временем удвоения по сравнению с известными в настоящее время В-клеточными культурами человека или мыши. Это тем более неожиданно, так как некроличьи соединения, такие как последовательности нуклеиновой кислоты Vcl-6 человека, IL21 мыши и CD40L человека, применяли в настоящих Примерах. Как показано в примерах, авторы настоящего изобретения осуществляли трансдукцию В-клеток кролика с молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность Vcl-6 человека и последовательность Vcl-xL или Mcl-1 человека. Даже если применяли последовательности человека и культивировали клетки кролика в присутствии IL21 мыши и CD40L человека, В-клетки кролика неожиданно оказались способными пролиферировать быстрее и вырабатывать больше антитела по сравнению с В-клетками человека и мыши.

Следовательно, согласно настоящему изобретению, В-клетки кролика очень хорошо пролиферируют при применении соединений человека и мыши. В данных условиях реакции В-клетки кролика пролиферируют даже лучше, чем В-клетки человека и мыши. Среди прочего, это является преимуществом в том, что применяемые в настоящее время условия реакции для В-клеток человека не должны быть согласованы для В-клеток кролика. Нет необходимости в получении IL21 кролика, CD40 кролика или последовательностей нуклеиновой кислоты кролика, кодирующих Vcl-6 или антиапоптотический ген. Вместо этого можно применять доступные в настоящее время соединения человека или мыши. В связи с этим, в одном аспекте настоящего изобретения предложен способ увеличения репликативного жизненного цикла В-клетка кролика, способ, включающий:

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Vcl-6 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика и

индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в указанной В-клетке,

характеризующийся тем, что указанную В-клетку кролика обеспечивают по меньшей мере одной молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из:

молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей некроличий Vcl-6 или его функциональную часть или функциональное производное; и

молекулы некроличей антиапоптотической нуклеиновой кислоты.

Предпочтительно указанная молекула некроличей нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты человека, поскольку Vcl-6 человека и антиапоптотические последовательности человека, по-видимому, обеспечивают особенно хорошие результаты в В-клетках кролика. В особенно предпочтительном варианте реализации В-клетку кролика обеспечивают молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей Vcl-6 человека, и молекулой антиапоптотической нуклеиновой кислоты человека, предпочтительно кодирующей Vcl-xL человека или Mcl-1 человека, или Vcl-2 человека, или A1 человека, или Vcl-w человека, или Vcl2L10 человека.

Кроме того, предложен способ согласно настоящему изобретению, дополнительно включающий обеспечение указанной В-клетки кролика IL21 и CD40L. Предпочтительно применяют некроличий IL21 и/или некроличий CD40L. Предпочтительно указанный IL21 представляет собой IL21 мыши или человека, наиболее предпочтительно IL21 мыши. В другом предпочтительном варианте реализации указанный CD40L представляет собой CD40L мыши или человека, наиболее предпочтительно CD40L человека.

Помимо увеличения экспрессии Vcl-6 и экспрессии молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты, также предпочтительно индуцировать, улучшать и/или поддерживать экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика. Это улучшает выработку антитела указанной В-клеткой. Таким образом, в одном аспекте предложен способ согласно настоящему изобретению, при этом способ дополнительно включает индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Blimp-1 или его кроличьего гомолога в указанной В-клетке кролика.

Степень экспрессии Blimp-1 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика регулируют различными способами. В одном варианте реализации В-клетку кролика обеспечивают соединением, способным напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Blimp-1, или экспрессию его кроличьего гомолога. Кроме того, или в качестве альтернативы, В-клетку кролика культивируют в присутствии соединения, способного напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Blimp-1 или экспрессию его кроличьего гомолога. В связи с этим также предложен способ согласно настоящему изобретению, дополнительно включающий:

обеспечение указанной В-клетки кролика соединением, способным напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Blimp-1 или экспрессию его кроличьего гомолога; и/или

культивирование указанной В-клетки кролика в присутствии соединения, способного напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Blimp-1 или экспрессию его кроличьего гомолога.

Указанное соединение, способное увеличивать экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога, наиболее предпочтительно содержит IL21. Следовательно, в одном из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения В-клетки культивируют кролика в присутствии IL21 по крайней мере в течение части времени культивирования.

В другом варианте реализации указанное соединение, способное увеличивать экспрессию Blimp-1, содержит белок-переносчик сигнала и активатора транскрипции 3 (STAT3) или его функциональную часть или функциональное производное, и/или молекулу нуклеиновой кислоты, их кодирующую. STAT3 представляет собой переносчик сигнала, который участвует в развитии и дифференциации В-клетки. STAT3 способен к повышающей регуляции экспрессии Blimp-1. В одном предпочтительном варианте реализации В-клетку кролика обеспечивают молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей STAT3 или его функциональную часть, или функциональное производное, при этом экспрессию указанной молекулы нуклеиновой кислоты регулируют экзогенным индуктором репрессора, так что степень экспрессии STAT3 регулируют по желанию. К примеру, используют одну из ранее упомянутых индуцибельных систем экспрессии. В одном варианте реализации используют продукт слияния, содержащий STAT3 или функциональную часть, или функциональное производное, и ER. К примеру, В-клетку кролика обеспечивают молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор эстрогена (ER) и STAT3 в виде слитого белка ER-STAT3. Данный белок слияния неактивен, поскольку он образует комплекс с белками теплового шока в цитозоле. Таким образом, STAT3 не способен достигнуть ядра и экспрессия Blimp-1 не улучшается. При введении экзогенного индуктора 4-гидрокси-тамоксифена (4HT), белок слияния ER-STAT3 отделяется от белков теплового шока, так что STAT3 способен проникнуть в ядро и активировать экспрессию Blimp-1.

Используемому в настоящем описании функциональная часть STAT3 определяют как фрагмент STAT3, который обладает той же способностью - по существу, не обязательно по количеству - увеличивать экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога, по сравнению с природным STAT3. Такая функциональная часть, к примеру, лишена аминокислот, которые не участвуют или только очень мало участвуют в указанной способности.

Функциональное производное STAT3 определяют как белок STAT3, который изменили, однако сохранили его способность (по существу, не обязательно по количеству) увеличивать экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога. Функциональное производное получают многими способами, к примеру, через замену консервативной аминокислоты, при этом одну аминокислоту заменяют другой аминокислотой в целом с аналогичными свойствами (размер, гидрофобность и т.д.), таким образом, что общее функционирование серьезно не изменяется. В качестве альтернативы, функциональное производное, к примеру, содержит белок слияния с обнаруживаемой меткой или с индуцибельным соединением.

Так как STAT3 способен повышать экспрессию Blimp-1 или увеличивать экспрессию его кроличьего гомолога, также возможно опосредованно увеличить экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога посредством введения соединения, способного увеличить активность и/или экспрессию STAT3. В связи с этим в одном варианте реализации В-клетку кролика обеспечивают соединением, способным улучшить активность STAT3, так что опосредованно улучшается экспрессия Blimp-1 или его кроличьего гомолога.

STAT3 активируют различными способами. Предпочтительно STAT3 активируют посредством обеспечения В-клетки кролика цитокином. Цитокины, естественным образом участвующие в дифференциации В-клетки, являются очень эффективными в регуляции белков STAT. Очень эффективными активаторы STAT3 являются IL21 и IL6, однако также известно, что IL2, IL7, IL10, IL15 и IL27 активируют STAT3. К тому же, Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые участвуют во врожденном иммунитете, также способны к активации STAT3. В связи с этим в одном варианте реализации предложен способ согласно настоящему изобретению, при этом указанную В-клеточную культуру кролика культивируют в

присутствии IL21, IL2, IL6, IL7, IL10, IL15 и/или IL27. Наиболее предпочтительно применять IL21, поскольку IL21 в частности является подходящим для улучшения выработки антитела В-клеточными культурами кролика согласно настоящему изобретению. IL21 способен к повышающей регуляции экспрессии Blimp-1 даже если экспрессию Blimp-1 нейтрализует BCL6.

Кроме того, или в качестве альтернативы, для активации STAT3 применяют мутированную янус-киназу (JAK) или мутированный кроличий гомолог JAK. Естественно образом JAK способна к фосфорилированию STAT3 после того, как ее саму активировали по меньшей мере одним цитокином. Мутированная янус-киназа или мутированный кроличий гомолог JAK, способные к активации STAT3 независимо от присутствия цитокинов, в частности является подходящей для применения в способе согласно настоящему изобретению.

В еще одном варианте реализации экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога увеличивают посредством обеспечения В-клетки кролика белком-супрессором сигналов цитокина (SOCS) или его кроличьим гомологом, и/или посредством активации белка SOCS или его кроличьего гомолога в указанной клетке. В качестве альтернативы, или дополнительно, по меньшей мере один из Е-белков E47, E12, E2-2 и НЕВ применяют для увеличения экспрессии Blimp-1 или его кроличьего гомолога. E47 является фактором транскрипции, который принадлежит к семейству спираль-петля-спиральных белков, называемых Е-белками. Существует четыре Е-белка, E12, E47, E2-2 и НЕВ, которые участвуют в развитии лимфоцитов. E12 и E47 кодируются одним геном, называемым E2A, который по-разному сплайсируется. Е-белки были описаны в качестве супрессоров опухолей. Одной из специфических целей E47 являются гены Socs1 и Socs3.

Таким образом в одном аспекте предложен способ согласно настоящему изобретению, дополнительно увеличивающий экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога в В-клетке кролика посредством обеспечения указанной В-клетки соединением, способным напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога, и/или культивирования указанной В-клетки в присутствии соединения, способного напрямую или опосредованно увеличивать экспрессию Blimp-1 или его кроличьего гомолога, при этом указанное соединение содержит:

STAT3 или его функциональную часть или функциональное производное, и/или соединение, способное к активации STAT3, и/или

соединение, способное к увеличению экспрессии STAT3, и/или

IL21, IL2, IL6, IL7, IL10, IL15, IL27, белок SOCS, один из Е-белков E47, E12, E2-2 или НЕВ, мутированную янус-киназу и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую STAT3, или его кроличий гомолог или функциональную часть, или функциональное производное.

Наиболее предпочтительно указанное соединение представляет собой IL21.

Кроме того, в изобретении предложены выделенные или рекомбинантные В-клетки кролика, получаемые с помощью способа согласно настоящему изобретению. Такие выделенные или рекомбинантные В-клетки кролика предпочтительно содержат последовательность экзогенной антиапоптотической нуклеиновой кислоты и последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное. В связи с этим также предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, содержащая последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и последовательность экзогенной антиапоптотической нуклеиновой кислоты. Как было объяснено выше, указанная молекула экзогенной нуклеиновой кислоты содержит либо последовательность нуклеиновой кислоты, которая в естественных условиях не встречается в В-клетках кролика, либо дополнительную копию последовательности нуклеиновой кислоты природных В-клеток кролика. Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w и Bcl2L10, и их кроличьи гомологи являются предпочтительными молекулами антиапоптотических нуклеиновых кислот. В связи с этим в одном предпочтительном аспекте предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, которая содержит последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-xL или Mcl-1, или Bcl-2, или A1, или Bcl-w, или Bcl2L10, или их кроличий гомолог, или их функциональную часть или функциональное производное.

Указанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и указанная последовательность экзогенной антиапоптотической нуклеиновой кислоты могут присутствовать на одной молекуле нуклеиновой кислоты. В качестве альтернативы данные последовательности присутствуют по крайней мере на двух различных молекулах нуклеиновой кислоты.

Предпочтительно применяют некроличьи последовательности, как объяснено ранее. В связи с этим в предпочтительном варианте реализации предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, содержащая некроличью последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты и некроличью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное. Указанная некроличья последовательность нуклеиновой кислоты предпочтительно содержит последовательности человека.

В особенно предпочтительном варианте реализации предложена выделенная или рекомбинантная В-клетка кролика, которая содержит:

последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 человека или его функциональную часть или функциональное производное, и

последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты человека, предпочтительно кодирующую Bcl-xL человека или Mcl-1 человека, или Bcl-2 человека,

или A1 человека, или Bcl-w человека, или Bcl2L10 человека, или их функциональную часть или функциональное производное. В этом же случае указанная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая Bcl-6 или его функциональную часть или функциональное производное, и указанная последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты, могут присутствовать на одной молекуле нуклеиновой кислоты, или, в качестве альтернативы, данные последовательности могут присутствовать по меньшей мере на двух различных молекулах нуклеиновой кислоты.

В настоящем изобретении также предложены В-клеточные культуры кролика *ex vivo*, получаемые посредством способов согласно настоящему изобретению. Важным преимуществом является тот факт, что В-клеточные культуры кролика *ex vivo* в настоящее время получают с коротким средним временем удвоения. В связи с этим предложена В-клеточная культура кролика *ex vivo*, которая обладает средним временем удвоения 20 ч или менее. В дополнительном предпочтительном варианте реализации предложена В-клеточная культура кролика *ex vivo*, содержащая В-клетки кролика согласно настоящему изобретению. Указанные В-клетки кролика предпочтительно содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 человека или его функциональную часть или функциональное производное, и последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты. Кроме того предложена В-клеточная культура кролика *ex vivo*, содержащая В-клетки кролика в присутствии некроличьего IL21 и/или некроличьего CD40L. Предпочтительно указанный IL21 представляет собой IL21 мыши или человека, наиболее предпочтительно IL21 мыши. В другом предпочтительном варианте реализации указанный CD40L представляет собой CD40L мыши или человека, наиболее предпочтительно CD40L человека.

При этом также предложено антитело, получаемое посредством способа согласно настоящему изобретению, так же как и антитело, вырабатываемое В-клеткой кролика согласно настоящему изобретению, или посредством В-клеточной культуры кролика *ex vivo* согласно настоящему изобретению. Такое антитело в частности является предпочтительным для терапевтических или диагностических применений. Предпочтительно указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

Настоящее изобретение также описано в следующих примерах. Данные примеры не ограничивают объем настоящего изобретения, однако служат только для внесения ясности в изобретение.

### Примеры

#### Пример 1.

#### Трансдукция В-клеток.

Перенос генов в лимфоциты традиционными способами, такими как преципитация фосфатом кальция, образование липосом или электропорация, является неэффективным, однако что более важно, отсутствует стабильная интеграция гена в целом. Тем не менее, вирусная трансдукция напрямую приводит к стабильной интеграции гена в геном клетки-мишени и может быть очень эффективной, если выбрана соответствующая оболочка вируса. Как ретровирусная, так и лентивирусная трансдукция является подходящей для эффективного переноса гена. В то время как ретровирусная интеграция зависит от цитокинеза, лентивирусную трансдукцию можно применять к неделящимся клеткам, таким как В-клеткам плазмы. Можно легко получить крупномасштабный препарат рекомбинантного ретровируса посредством применения стабильных клеточных линий-продуцентов, таких как платформа экспрессии Phoenix (Kinsella and Nolan, 1996). Производство с высоким титром лентивирусов имеет тенденцию быть более громоздкими, главным образом, вследствие токсичности экспрессированных белков и оболочек вируса.

Для настоящих примеров авторы настоящего изобретения применяли платформу на основе вируса мышинного лейкоза Молони (MMLV), применяя клетки-продуценты, экспрессирующие либо амфотропную оболочку, либо оболочку вируса лейкоза гиббонов (GALV) (Wilson и др., 1995). В случае с вектором на основе GALV проводили слияние трансмембранного домена белка оболочки GALV штамма SEATO с цитоплазматическим доменом белка амфооболочки (фиг. 9).

Вектор переноса устанавливают таким образом, что Bcl-6, Bcl-xL и маркерный зеленый флуоресцентный белок (GFP) одновременно транслируются с одной и той же вирусной РНК (фиг. 8). Данный мультицистронный подход достигается путем помещения "саморасщепляющейся" пептидной последовательности 2A (Szymczak и др., 2004) между областями кодирования BCL-6 и BCL-xL и участком внутренней посадки рибосомы (IRES) перед репортерным геном GFP. Проявления вирусной трансдукции являются высокими и объективными.

Генерация иммортализованных В-клеток кролика.

Осуществляли иммортализацию В-клетки памяти человека, применяя технологию BCL-6/Bcl-xL, описанную Kwakkenbos и др., 2010, и заявкой на патент WO 2007/067046.

Вкратце, РВМС из крови кролика выделяли с применением фикольного градиента плотности и окрашивали для экспрессии Ig, применяя антитело, которое распознает Ig (IgG H+L: тяжелая цепь и легкие

цепи каппа и лямбда IgG), иногда в комбинации со специфическим антителом IgM. В-клетки выделяли (положительный Ig или положительный Ig+отрицательный IgM), применяя сортировщик FACS и стимулировали на  $\gamma$ -облученных (50 Гр) L-клеточных фибробластах мыши, стабильно экспрессирующих CD40L (L-клетки CD40L,  $10^5$  клеток  $\text{мл}^{-1}$ ), совместно с рекомбинантным интерлейкином мыши (IL)-21 в течение 36-48 ч. Клетки собирали и промывали средой без фетальной телячьей сыворотки (FCS), и далее клетки переносили в Retronectin® (Takara, Shiga, Япония) - покрытые тканевой культурой планшеты, где осуществляли их трансдукцию с ретровирусным вектором, содержащим BCL-6, Bcl-xL и GFP в качестве репортерного белка. В качестве альтернативы осуществляли трансдукцию В-клеток с ретровирусным вектором, содержащим BCL-6, Mcl-1 и GFP. Трансдуцированные В-клетки поддерживали в культуре с лигандом CD40, экспрессирующим L-клетки и IL-21. На фиг. 1 сравнивают эффективность трансдукции для ретровирусов GALV и амфотропного типа на 4 день после трансдукции. Через четыре дня после трансдукции с ретровирусом амфотропного типа 0,8% клеток оказались трансдуцированными по сравнению с 80% клеток после трансдукции с ретровирусом типа GALV. Очевидно, что ретровирус типа GALV превосходит ретровирус амфотропного типа в трансдукции В-клеток кролика.

Пример 2.

Клеточные культуры.

Авторы настоящего изобретения поддерживали В-клетки ( $2 \times 10^5$  клеток  $\text{мл}^{-1}$ ) в среде Дульбекко, модифицированной Исковым (Gibco), содержащей 8% FBS и пенициллин-стрептомицин (Roche), дополненной рекомбинантным интерлейкином мыши 21 (IL-21) (50 нг  $\text{мл}^{-1}$ ), и культивировали их на  $\gamma$ -облученных (50 Гр) L-клеточных фибробластах мыши, стабильно экспрессирующих CD40L (L-клетки CD40L,  $10^5$  клеток  $\text{мл}^{-1}$ ). Для определения клеточного времени удвоения, клетки культивировали в 24-луночных планшетах в количестве 50-100000 клеток на лунку совместно с L-клетками CD40L и IL-21. Каждые 3-4 дня клетки подсчитывали и 50-100000 клеток переносили в новую лунку. На фиг. 2 изображены кривые роста для В-клеток от двух доноров человека (89 и 93), одного образца В-клетки ламы (Llama) и одного образца В-клетки кролика, трансдукцию которого осуществляли с ретровирусом типа GALV, несущим молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность Bcl-6 человека, и Bcl-xL человека (Rb 6XL). Кроме того, изображена кривая роста для одного кроличьего образца, трансдукцию которого осуществляли с ретровирусом типа GALV, несущим молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность Bcl-6 человека, и Mcl-1 человека (Rb 6M). Трансдуцированные В-клетки кролика обладают средней величиной времени удвоения 19 ч и, таким образом, растут быстрее, чем В-клетки человека или ламы, которые обладают средней величиной времени удвоения от 26 до 32 ч. Данные средние величины времени удвоения изначально рассчитывали путем определения увеличения В-клеток в течение нескольких 3-4 дневных временных интервалов и усреднения полученных результатов. Впоследствии, подсчитывали общую среднюю величину времени удвоения в течение всего периода культивирования. Это привело к средней величине времени удвоения трансдуцированных В-клеток кролика за 18 ч, средней величине времени удвоения трансдуцированных В-клеток человека за 25-29 ч и средней величине времени удвоения трансдуцированных В-клеток ламы за 27 ч. Это подтверждает наблюдения авторов настоящего изобретения, что их способы дают выход В-клеточных культур кролика со средним временем удвоения 20 ч или менее, в то время как В-клетки человека, мыши и ламы обычно обладают временем удвоения от 25 до 36 ч.

Пример 3.

Экспрессия В-клеточного рецептора и окрашивание, специфичное к антигену.

Иммортализованные В-клетки человека экспрессируют В-клеточный рецептор. Данное качество дает возможность для антиген-специфичного окрашивания и сортировки В-клеток. Чтобы определить, существует ли также экспрессия В-клеточного рецептора на трансдуцированных В-клетках кролика, В-клеточные клоны окрашивали флуоресцентно мечеными антителами, специфически реагирующих либо с IgG кролика, IgM кролика, либо с IgA кролика. В-клетки промывали в холодной ( $4^{\circ}\text{C}$ ) среде для культивирования клеток и инкубировали на льду в темноте в среде для культивирования клеток, содержащей иммунофлуоресцентно меченые антитела, которые являются специфичными либо для IgG, IgM, IgA кролика, либо для меченого антигена. После этого избыток меченых антител или антигена вымывали и проводили анализ экспрессии В-клеточного рецептора на анализаторе FACS; Guava easycyte (Millipore) или FACS Aria3 (BD).

На фиг. 3 три различных В-клеточных клон различных изоформ окрашены флуоресцентно мечеными антителами, специфически распознающими изоформ антитела кролика IgG, IgA или IgM. Очевидно, что В-клеточный рецептор можно эффективно окрасить для различных изоформ антитела кролика. В связи с этим авторы настоящего изобретения делают вывод, что иммортализованные В-клетки кролика также экспрессируют В-клеточный рецептор.

Кроме того, флуоресцентно меченые белки гриппа также применяли для окрашивания специфичных к гриппу В-клеток от кроликов, которые иммунизировали вакциной против гриппа человека или необработанным контролем кроликов (фиг. 4). В-клетки кролика окрашивали флуоресцентно мечеными H1, H3 или гриппом В и сортировали по принципу 1 клетка/лунка, применяя сортировщик FACS.

## Пример 4.

Развитие клональных В-клеточных культур кролика, полученных из одной клетки.

Трансдуцированные В-клетки сортировали по принципу одна клетка/лунка, применяя сортировщик FACS, и культивировали в присутствии  $\gamma$ -облученных (50 Гр) L-клеточных фибробластах мыши, стабильно экспрессирующих CD40L (L-клетки CD40L,  $10^5$  клеток  $\text{мл}^{-1}$ ) совместно с рекомбинантными IL-21 мыши. Каждые 3-4 дня добавляли свежие L-клетки CD40L и IL-21. Начиная с 9 дня после посева клеток (одна клетка на лунку), супернатанты анализировали в ELISA на выработку иммуноглобулина G кролика (IgG). Для сравнения также параллельно проводили анализ для IgG человека в супернатанте В-клеточных клонов человека.

На фиг. 7 представлена концентрация антитела в супернатанте в динамике, начиная с 9 дня после инициации одноклеточных культур. Концентрацию антитела определяли для двух доноров человека и одного В-клеточного образца кролика, трансдукцию которых осуществляли с ретровирусом типа GALV, несущим молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность Bcl-6 человека, и Bcl-xL человека, и для одного В-клеточного образца кролика, трансдукцию которого осуществляли с ретровирусом типа GALV, несущим молекулу нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность Bcl-6 человека, и Mcl-1 человека. В-клеточные клоны от кроликов вырабатывали IgG в концентрациях 30 нг/мл и 100 нг/мл в течение более короткого периода времени (9-10 дней и 11-12 дней соответственно), чем В-клеточные клоны человека (13-18 и 15-20 дней соответственно). Данный факт обеспечивает важное преимущество в том, что он допускает более ранний скрининг на целевые антитела В-клеточных клонов кролика в сравнении с В-клеточными клонами человека.

## Пример 5.

Иммунизация кроликов.

2 новозеландских белых кролика иммунизировали вакциной против гриппа человека, содержащей 15 мкг H1N1, 15 мкг H3N2 и 15 мкг гриппа В в полных адьювантах Фрейнда. После 3 недель кроликов повторно иммунизировали той же вакциной в неполных адьювантах Фрейнда. Через пять дней после бустера, кроликам спускали кровь, выделяли из крови В-клетки и осуществляли трансдукцию с ретровирусом типа GALV (содержащим внеклеточный домен и трансмембранный домен белка оболочки GALV штамма SEATO, слитых с цитоплазматическим доменом белка амфооболочки), несущим молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность Bcl-6 человека, и Bcl-xL человека. Трансдуцированные В-клетки высевали при различных плотностях клеток в культуральные планшеты и культивировали как описано в примере 4. Кроме того, трансдуцированные В-клетки помечали флуоресцентно меченными компонентами вакцины; H1, H3 или гриппом В и сортировали по принципу 1 клетка/лунка, применяя сортировщик FACS, и культивировали как описано в примере 4. Анализировали супернатанты культивированных клеток на связывание с целой вакциной или ее отдельными компонентами. Результаты, представленные на фиг. 4-6, показывают, что В-клетки, специфичные к антигену, можно идентифицировать в В-клеточном пуле от вакцинированных кроликов посредством посева клеток при различной плотности (фиг. 5), а также очень эффективно посредством сортировки клеток, применяя меченые антигены (фиг. 4 и 6).

## Пример 6.

В-клетки кролика, иммортализованные посредством введения генов Bcl-6 и Bcl-xl с применением ретровируса амфотропного типа.

Иммортализации В-клеток кролика посредством введения генов Bcl-6 и Bcl-xl можно достигнуть за счет применения различных типов векторов, к примеру, таких как ретровирусов типа GALV и амфотропного типа, как это показано в примере 1. Рост В-клеток, трансдуцированных ретровирусом амфотропного типа осуществляли далее, чтобы подтвердить, что интродукция Bcl-6 и Bcl-xl посредством амфотропного ретровируса также приводит к иммортализации В-клеток кролика. Через четыре дня после трансдукции с ретровирусом амфотропного типа, оказались трансдуцированными 0,8% клеток по сравнению с 80% клеток после трансдукции с ретровирусом типа GALV (фиг. 1 и 10). Через десять дней после трансдукции, 94% клеточной популяции, трансдуцированной с амфотропным ретровирусом, оказались GFP-положительными, демонстрируя, трансдуцированные клетки растут быстрее нетрансдуцированных клеток (фиг. 10).

Для того чтобы определить время удвоения клетки, клетки культивировали так, как это сделано в примере 2, в 24-луночных планшетах в количестве 50-100000 клеток на лунку совместно с L-клетками CD40L и IL-21. Каждые 3-4 дня клетки подсчитывали и 50-100000 клеток переносили в новую лунку. На фиг. 11 изображена кривая роста для В-клеток кролика, трансдуцированных амфотропным вирусом. Расчетное время удвоения составляет 19 ч, которое сопоставимо для В-клеток кролика, трансдуцированных с ретровирусом типа GALV (18 ч). В заключение, введение Bcl-6 и Bcl-xl в В-клетки кролика посредством амфотропного ретровируса также приводит к иммортализации В-клеток кролика, хотя эффективность трансдукции оказывается значительно ниже по сравнению с вектором на основе GALV.

**Краткое описание чертежей**

Фиг. 1. Трансдукция В-клеток памяти кролика. В-клетки кролика выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs) по результатам экспрессии Ig. Клетки активировали в течение

36-40 ч на L-клетках CD40L с gm-IL-21. Трансдукцию клеток осуществляли с ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Vcl-xL. Исследовали ретровирусы как типа GALV, так и амфотропного типа. Далее трансдуцированные клетки культивировали на L-клетках CD40L в присутствии рекомбинантного IL-21 мыши. После четырех дней культивирования эффективность трансдукции определяли по результатам экспрессии GFP. Ретровирус типа GALV продемонстрировал более высокую эффективность (80%) трансдукции по сравнению с ретровирусом (0,8%) амфотропного типа.

Фиг. 2. Анализировали кривые роста для В-клеток кролика, трансдуцированных с ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Vcl-xL, или ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Mcl-1. Для сравнения кривые роста параллельно анализировали для В-клеток из клеток ламы и клеток человека от двух разных доноров, трансдукцию которых осуществляли с аналогичным ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Vcl-xL.

Фиг. 3. Экспрессию поверхностных иммуноглобулинов IgG, IgM и IgA определяли, применяя FACS на трех различных Vcl-6, Vcl-xL-трансдуцированных В-клеточных клонах кролика.

Фиг. 4. Идентификация В-клеток кролика, специфичных к антигену, в пуле В-клеток кролика с различной специфичностью.

Фиг. 5. Антитела кролика, специфичные к антигену, получили относительно различных компонентов вакцины против гриппа человека, содержащей 15 мкг H1N1, 15 мкг H3N2 и 15 мкг гриппа В. Кроликов первично и вторично иммунизировали вакциной против гриппа человека. Проводили иммортализацию В-клеток и производили посев при различных плотностях в 384-луночные планшеты на L-клетки CD40L в присутствии рекомбинантного IL-21 мыши. Антитела, присутствующие в супернатантах В-клеточной культуры кролика, подвергали скринингу в ELISA на специфичность к гриппу. Антитела, специфичные к антигену, наблюдали для всех компонентов вакцины.

Фиг. 6. Иммортализованные В-клетки от кроликов, иммунизированных вакциной против гриппа человека, содержащей 15 мкг H1N1, 15 мкг H3N2 и 15 мкг гриппа В, окрашивали флуоресцентно мечеными белками гриппа. В-клетки, демонстрирующие связывание с белками гриппа, сортировали по принципу 1 клетка/луночка в 384-луночных планшетах на L-клетки CD40L в присутствии рекомбинантного IL-21 мыши, применяя сортировщик FACSaria. Супернатанты подвергали скринингу в ELISA на гриппо-специфичные антитела. Антитела, специфичные к антигену, обнаружили с высокой частотой для компонентов вакцины, которые применяли для антиген-специфичной сортировки.

Фиг. 7. Концентрация антитела в супернатанте клоновых В-клеток в различные моменты времени. Производили посев трансдуцированных В-клеток человека, ламы и мыши по принципу 1 клетка/луночка в присутствии облученных L-клеток CD40L, и дополняли IL-21 мыши. L-клетки CD40L и IL-21 обновляли через каждые 3-4 дня. Концентрацию IgG анализировали в ELISA для отдельных лунок в различные моменты времени в течение культивирования. Каждое измерение проводили на разных лунках. Трансдукцию В-клеток осуществляли либо с ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Vcl-xL, или с ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Mcl-1. Трансдукцию всех остальных клеток (человека и ламы) осуществляли с BCL6 и Vcl-xL.

Фиг. 8. Схематическое изображение вектора, применяемого для трансдукции В-клеток кролика и человека.

Фиг. 9. Последовательность внеклеточного домена белка оболочки GALV SEATO (выделено жирным) и трансмембранного домена белка оболочки GALV SEATO (подчеркнуто), слитых с цитоплазматическим доменом белка амфооболочки (выделено курсивом и точно подчеркнуто).

Фиг. 10. Трансдукция В-клеток памяти кролика и бурный рост В-клеток кролика, трансдуцированных с ретровирусом амфотропного типа. В-клетки кролика выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs) по результатам экспрессии Ig. Клетки активировали в течение 36-40 ч на L-клетках CD40L с gm-IL-21. Трансдукцию клеток осуществляли с ретровирусным вектором, содержащим BCL6 и Vcl-xL. Исследовали ретровирусы как типа GALV, так и амфотропного типа. Далее трансдуцированные клетки культивировали на L-клетках CD40L в присутствии рекомбинантного IL-21 мыши. После четырех дней культивирования эффективность трансдукции определяли по результатам экспрессии GFP. Ретровирус типа GALV продемонстрировал более высокую (80%) эффективность трансдукции по сравнению с ретровирусом (0,8%) амфотропного типа. Через 10 дней по результатам экспрессии GFP 94% В-клеток кролика, трансдуцированных с ретровирусом амфотропного типа, оказались иммортализованными, демонстрируя бурный рост трансдуцированных клеток над нетрансдуцированными клетками.

Фиг. 11. Кривую роста анализировали для В-клеток кролика, трансдуцированных с ретровирусным вектором амфотропного типа, содержащим BCL6 и Vcl-xL.

## Ссылки

Christopherson, K.S. и др.. PNAS 89, 6314-8 (1992)

Guzman, L. M. И др.. Bacteriol 177, 4121-4130 (1995)

T.M. Kinsella, G.P. Nolan, Hum Gene Ther 7 (1996) 1405.

Kwakkenbos и др. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. Nature Medicine (2010) vol. 16 (1) pp. 123-8

Lam и др. Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope. Human gene therapy 7 (1996) 1415-1422

A.L. Szymczak, C.J. Workman, Y. Wang, K.M. Vignali, S. Dilioglou, E.F. Vanin, D.A.A. Vignali, Nat Biotechnol 22 (2004) 589.

C.A. Wilson, M.V. Eiden, W.B. Anderson, C. Lehel, Z. Olah, J Virol 69 (1995) 534.

WO 2007/067046

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение В-клетки кролика, экспрессирующей экзогенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Bcl-6 или его кроличий гомолог, и экспрессирующей экзогенную молекулу антиапоптотической нуклеиновой кислоты, для получения В-клеточной культуры *ex vivo* со средним временем удвоения 20 ч или менее.

2. Способ получения В-клеточной культуры *ex vivo* со средним временем удвоения 20 ч или менее, включающий:

обеспечение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Bcl-6 или его кроличий гомолог, и по меньшей мере одной молекулы антиапоптотической нуклеиновой кислоты в В-клетке кролика.

3. Способ по п.2, дополнительно включающий:

культивирование указанной В-клетки *ex vivo*; и

проведение сбора антител, выработанных указанной В-клеткой в течение 7-14 дней.

4. Способ по п.3, где сбор антител осуществляют в течение 9-12 дней.

5. Способ увеличения репликативного жизненного цикла В-клетки кролика, включающий: введение в указанную В-клетку кролика молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Bcl-6 или его кроличий гомолог; и по меньшей мере одной антиапоптотической нуклеиновой кислоты, посредством трансдукции В-клетки кролика средством доставки гена, содержащим по меньшей мере функциональную часть внеклеточного домена белка оболочки вируса лейкоза гиббонов (GALV) или последовательность, которая по меньшей мере на 70% идентична функциональной части внеклеточного домена белка оболочки GALV.

6. Способ по п.5, где указанный внеклеточный домен представляет собой внеклеточный домен белка оболочки вируса GALV штамма SEATO.

7. Способ по п.5, где указанное средство доставки гена содержит химерный белок оболочки или белок, содержащий указанный химерный белок оболочки, или белок, который имеет по меньшей мере 70% идентичность последовательности с указанным химерным белком оболочки.

8. Способ по п.7, где химерный белок оболочки содержит внеклеточный домен и трансмембранный домен, слитый с цитоплазматическим доменом, и имеет последовательность:

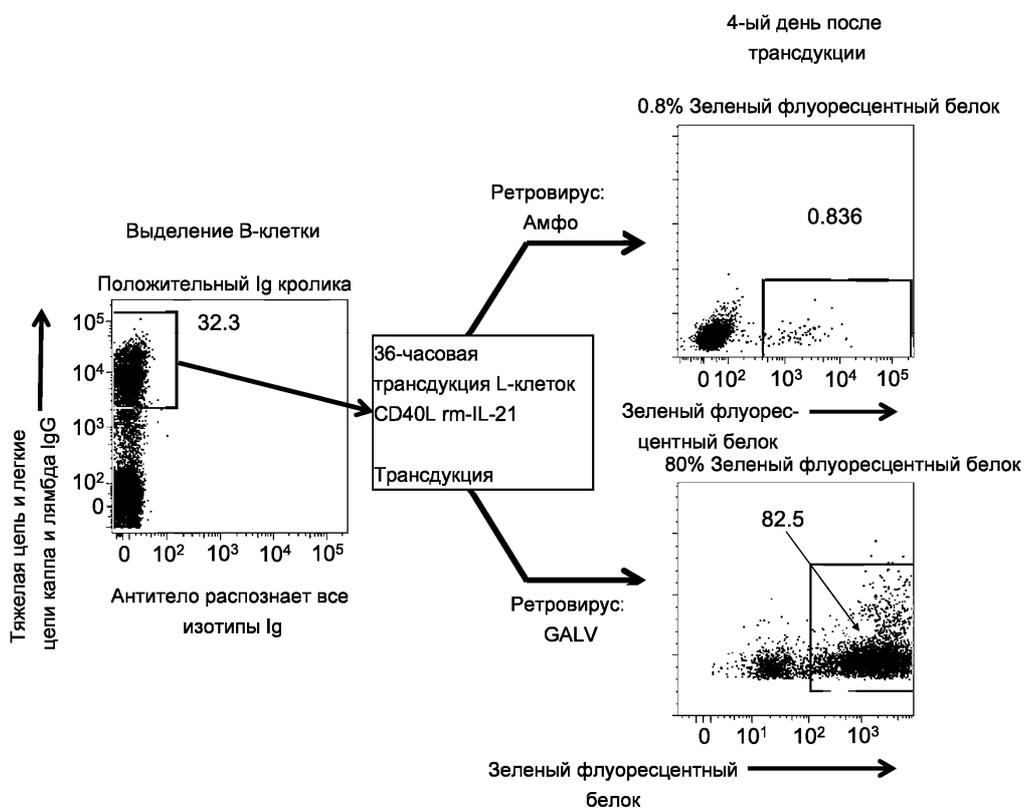
MVLLPGSMLLTNSLHHLRHQMSPGSKWRLIILLSCVFGGGTSLQNKNPQHQMTLTWQVLS  
 QTGDVVWDTKAVQPPWTWWPTLKPDCALAAASLESWDIPGTDVSSSKRVRPPDSYTAAY  
 KQITWGAIGCSYPRARTRMASSTFYVCPDRDGRTLSEARRCGGLESYCKEWDCETTGTGYW  
 LSKSSKDLITVKWDQNSEWTQKFQQCHQTEGWCNPLKIDFTDKGKLSKDWITGKTWGLRFY  
 VSGHPGVQFTIRLKITNMPAVA VGPDLVLEQGPPRTSLALPPPLPPREAPPPSLPDSNSTALA  
 TSAQTPTVRKTIIVTLNTPPTTGDRLFDLVQGAFLTLNATNPGATESCWLCLAMGPPYEA  
 ASSGEVAYSTDLDRCRWGTQGGKLTLEVSGHGLCIGKVPFTHQHLCNQTLSINSSGDHGYL  
 LPSNHSWWACSTGLTPCLSTSVFNQTRDFCIQVQLIPRIYYYPPEVLLQAYDNSHPRTKREA  
 VSLTLAVLLGLGITAGIGTGSTALIKGPIDLQOGLTSLQIAIDADLRLAQDSVSKLEDSLTLSE  
 VVLQNRRLGLDLLFLKEGGLCAALKECCFYIDHSGAVRDSMKKLEKLDKRQLERQKSN  
 WYEGWFNNSPWFTLLSTIAGPLLLLLLLLLLILGPCIINRLVQFVKDRISVVQALVLTQQYHQL  
 KPIEYEP.

9. Способ по любому из пп.2-8, отличающийся тем, что:  
 нуклеиновая кислота кодирует некроличий Bcl-6 или его функциональную часть или функциональное производное; и/или  
 по меньшей мере одна молекула антиапоптотической нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу некроличьей антиапоптотической нуклеиновой кислоты,  
 где функциональная часть и функциональное производное Bcl-6 сохраняет способность увеличивать репликативный жизненный цикл В-клетки кролика.
10. Способ по п.9, в котором указанные молекулы некроличьей нуклеиновой кислоты представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты человека.
11. Способ по любому из пп.2-10, в котором по меньшей мере одна молекула антиапоптотической нуклеиновой кислоты содержит ген семейства Bcl2.
12. Способ по п.11, в котором ген семейства Bcl2 выбран из группы, состоящей из Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl-2L10 и их кроличьих гомологов, функциональных частей и функциональных производных.
13. Способ по любому из пп.2-12, дополнительно включающий индуцирование, улучшение и/или поддержание экспрессии Blimp-1 или его кроличьего гомолога в указанной В-клетке кролика.
14. Способ по п.13, в котором: улучшение экспрессии Bcl-6 или его кроличьего гомолога осуществляется культивированием указанной В-клетки кролика в присутствии соединения, способного напрямую или опосредованно улучшать экспрессию Bcl-6 или экспрессию его кроличьего гомолога.
15. Способ по любому из пп.2-14, дополнительно включающий культивирование указанной В-клетки кролика в присутствии по меньшей мере одного соединения, способного напрямую или опосредованно улучшать экспрессию Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl-2L10 и/или их кроличьего гомолога.
16. Способ по п.15 где указанную В-клетку кролика культивируют в присутствии IL21 и CD40L.
17. Способ по п.16, где указанный IL21 представляет собой IL21 мыши или человека, и/или указанный CD40L представляет собой CD40L мыши или человека.
18. Способ по любому из пп.2-17, дополнительно включающий культивирование указанной В-клетки кролика в присутствии по меньшей мере одного соединения, способного напрямую или опосредованно улучшать экспрессию Blimp-1 или экспрессию кроличьего гомолога Blimp-1.
19. Рекомбинантная В-клетка кролика, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6 или его кроличий гомолог, или его функциональную часть или функциональное производное, и последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты, трансдуцированная по меньшей мере функциональной частью указанного внеклеточного домена белка оболочки GALV или последовательностью, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности с по меньшей мере функциональной частью внеклеточного домена белка оболочки GALV.
20. В-клетка кролика по п.19, в которой указанная последовательность антиапоптотической нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, выбранный из группы, состоящей из Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl-2L10, и их кроличьего гомолога, их функциональной части, их функционального производного и любой их комбинации, где функциональная часть или функциональное производное Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl-2L10 или их кроличий гомолог сохраняют способность к увеличению репликативного жизненного цикла В-клетки кролика.
21. Рекомбинантная В-клетка кролика, содержащая:  
 экзогенную молекулу некроличьей антиапоптотической нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w, Bcl-2L10 или их функциональную часть или функциональное производное, и  
 экзогенную молекулу некроличьей нуклеиновой кислоты, кодирующей Bcl-6 или его функциональную часть или функциональное производное, где функциональная часть или функциональное производное Bcl-6 и Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2, A1, Bcl-w или Bcl-2L10 сохраняет способность к увеличению репликативного жизненного цикла В-клетки кролика.
22. В-клетка кролика по п.21, в которой указанная последовательность некроличьей нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека.
23. В-клеточная культура кролика *ex vivo*, которая обладает средним временем удвоения 20 ч или менее, где В-клетки указанной В-клеточной культуры кролика *ex vivo* содержат экзогенную молекулу

нуклеиновой кислоты, кодирующую Bcl-6 или его кроличий гомолог, и экзогенную молекулу антиапоптотической нуклеиновой кислоты.

24. В-клеточная культура кролика *ex vivo*, содержащая В-клетки кролика по п.21 или 22.

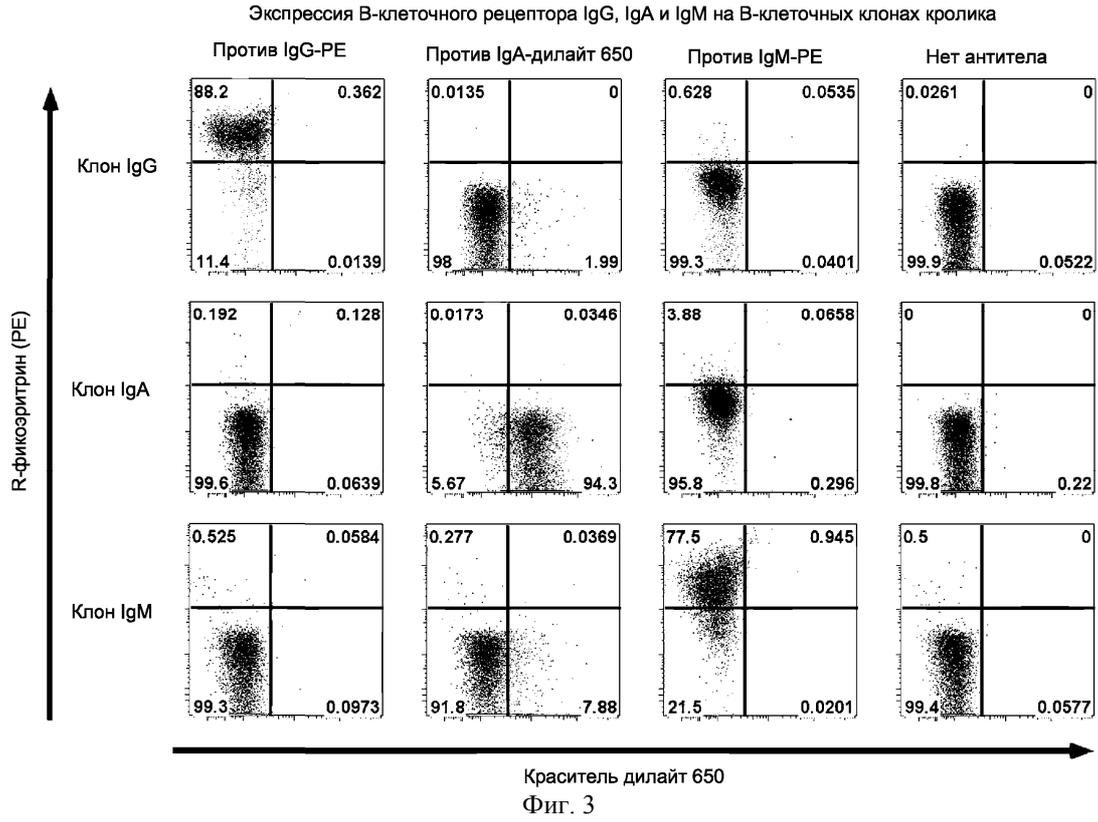
25. В-клеточная культура кролика *ex vivo*, полученная способом по п.2.



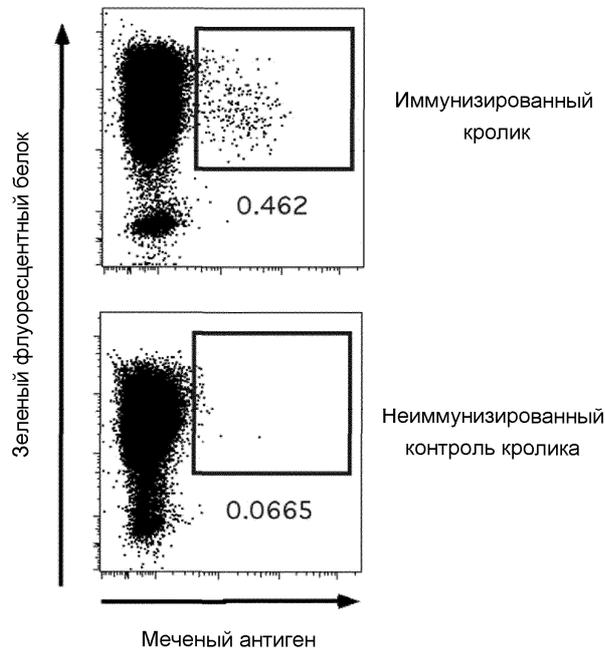
Фиг. 1



Фиг. 2



Идентификация специфичных к антигену В-клеток кролика в пуле В-клеток кролика с различной специфичностью.



Фиг. 4

Супернатант В-клеток кролика, культивированных при различной плотности клеток, исследовали на специфичность относительно антигенов вакцины против гриппа

Количество клеток/лунка	Общее количество клеток	Кролик 1 Положительные лунки (частота %)	Кролик 2 Положительные лунки (частота %)
100	38400	95 (0.25)	326 (0.85)
25	19200	39 (0.20)	>80*
10	11520	25 (0.22)	114 (0.99)
1	2304/1920	5 (0.22)	22 (1.15)

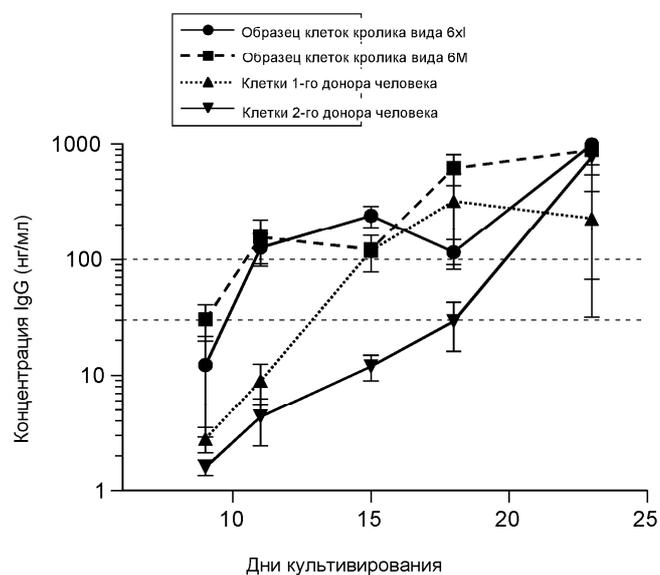
Фиг. 5

Супернатант антиген-отсортированных В-клеток кролика и культивированных по принципу одна клетка/лунка, исследовали на специфичность различных соединений вакцины против гриппа; сортировка антигена в значительной степени способствует выделению клеток, специфичных к антигену

Кролик	Антиген, применяемый для сортировки	Число анализируемых лунок	Специфичные к Н1	Специфичные к Н2	Специфичные к В	Частота клонов, специфичных к антигену (%)
1	Н1	54	30			56
1	Н3	74		17		23
1	В	75			8	11
2	Н1	78	53			68
2	Н3	93		60		65
2	В	60			16	27

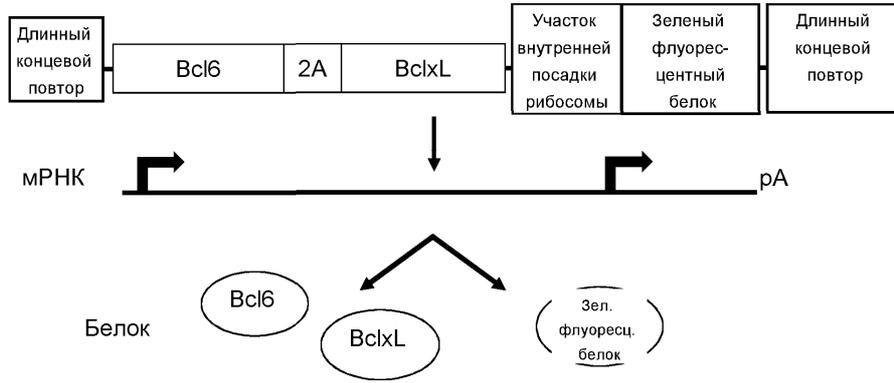
Фиг. 6

Концентрации иммуноглобулинов в В-клеточных культурах более быстро достигают более высоких уровней по сравнению с В-клеточными структурами человека



Фиг. 7

Ретровирусная мультицистронная конструкция

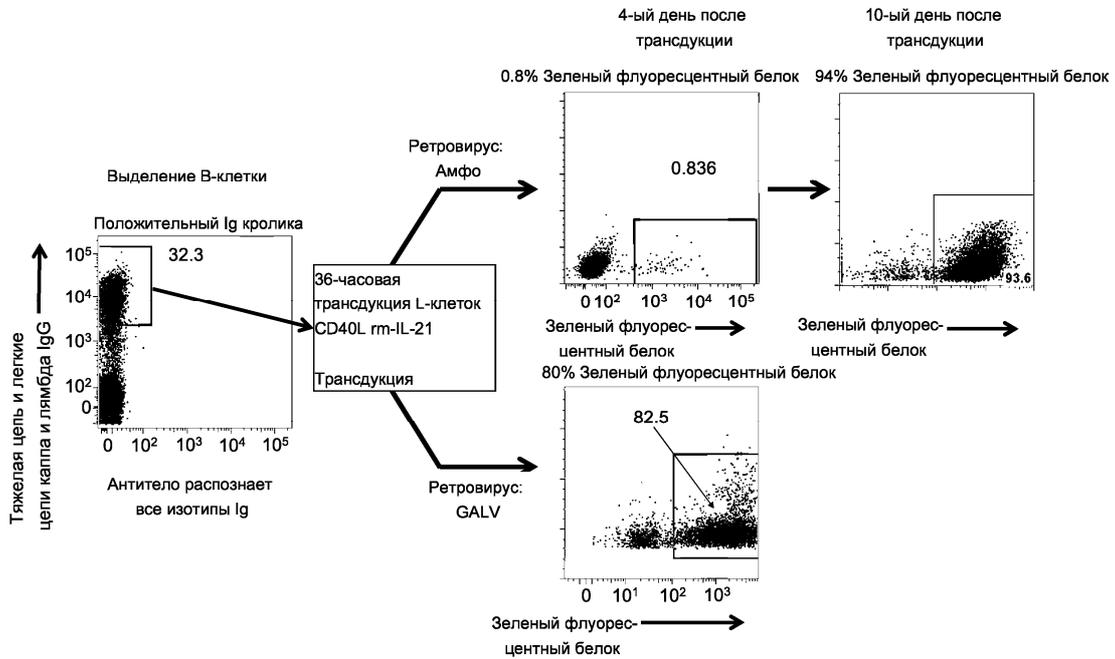


Фиг. 8

MVLLPGSMLLTSNLHHLRHQMSPGSKRLILLSCVFGGGGTSLQNKNPHPMTLWTWQVLSQTGDVV  
 WDTKAVQPPWTWWPTLKPDVCAALASLESWDIPGTDVSSSKRVRPPDSDYTAAYKQITWGAIGCSYPR  
 ARTRMASSTFYVCPRDGRTLSEARRCGGLESLYCKEWCETTGTGYWLSKSSKDLITVKWDQNSEWTQ  
 KFQQCHQTGWCNPLKIDFTDKGKLSKDWITGKTWGLRFYVSGHPGVQFTIRLKITNMPAVAVGPDVLV  
 VEQGPRTSLALPPPLPPREAPPPSLPDSNSTALATSAAQTPTVRKTIVTLNTPPPTTGDRLFDLVQGAFL  
 TLNATNPGATESCWLCAMGPPYEAIASSGEVAYSTDLDRCRWGTQGGKLTLEVSGHGLCIGKVPFTH  
 QHLCNQTLNINSSGDHQYLLPSNHSWWACSTGLTPCLSTSVFNQTRDFCIQVQLIPRIYYYYPEVLLQAY  
 DNSHPRTKREAVSLTAVLLGLGITAGIGTGSTALIKGPIDLQQGLTSLQIAIDADLRALQDSVSKLEDSL  
 TSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCAALKECCFYIDHSGAVRDSMKKLKEKLDKRLERQKSQNWYE  
 GWFNNSPWFTTLLSTIAGPLLLLLLLLLLILGPCILNRLVQFVKDRISVVQALVLTQQYHQLKPIEYEP

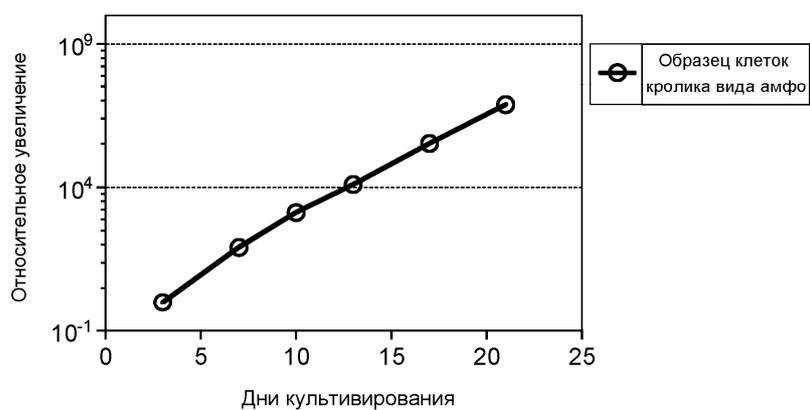
Фиг. 9

Иммортализованные клетки, трансдуцированные с помощью Bcl6 и Bcl-XL посредством вируса, покрытого амфиоболочкой



Фиг. 10

Клетки кролика, трансдуцированные с помощью вируса, покрытого амфооболочкой, растут также быстро, как и клетки, трансдуцированные посредством вируса, покрытого оболочкой GALV



Время дублирования: В-клетки кролика вида амфо 6XL: 19 часов

Фиг. 11

