

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390458** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.29**

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.05.05**

---

(54) **ДНК-МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, НАЦЕЛЕННЫЕ НА МОЛЕКУЛЫ  
КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК**

---

(31) **62/332,386**

(32) **2016.05.05**

(33) **US**

(62) **201892522; 2017.05.05**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ; ДЗЕ УИСТАР  
ИНСТИТЮТ ОФ ЭНЭТОМИ  
ЭНД БАЙОЛОДЖИ; ИНОВИО  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Уэйнер Дэвид, Мутхумани Каруппиах,  
Сардесай Нирандзан (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении раскрыта композиция, включающая в себя рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело или его фрагмент, нацеленный на молекулу контрольной точки иммунного ответа. В настоящем изобретении также раскрыт способ предотвращения и/или лечения у субъекта заболевания с использованием указанной композиции и способ ее создания.

---

**A2**

**202390458**

**202390458**

**A2**

**ДНК-МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, НАЦЕЛЕННЫЕ НА МОЛЕКУЛЫ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК**

**Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/332 386, поданной 5 мая 2016 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**Область техники**

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, для создания *in vivo* одного или более синтетических антител, включая антитела, нацеленные на молекулы контрольной точки иммунного ответа (например, PD-1, PD-L1, LAG-3, GITR, CD40, OX40, CTLA-4, TIM-3, 4-1BB, их комбинации и их функциональные фрагменты), а также к способам предотвращения и/или лечения рака, инфекционных заболеваний и других состояний у субъекта посредством введения указанной композиции.

**Уровень техники**

Вакцины используются для стимуляции иммунного ответа у индивидуума, чтобы обеспечить защиту и/или лечение конкретного заболевания. Некоторые вакцины включают антиген для индукции иммунного ответа. Некоторые антигены вызывают сильный иммунный ответ, тогда как другие антигены вызывают слабый иммунный ответ. Слабый иммунный ответ на антиген можно усилить путем включения в вакцину адъюванта. Адъюванты могут быть в разном виде, например, в виде солей алюминия, масляных эмульсий, стерильных компонентов бактерий или других патогенных микроорганизмов, цитокинов и т. п.

Белок 1 программированной гибели клеток, также известный как PD-1, представляет собой состоящую из 288 аминокислот молекулу белка клеточной поверхности, которая у человека кодируется геном PDCD1. Этот белок экспрессируется в про-B-клетках и, как считается, играет роль в их дифференцировке. PD1 представляет собой состоящий из 268 аминокислот мембранный белок I типа распространенного семейства T-клеточных регуляторов

CD28/CTLA-4. Структура белка включает внеклеточный домен IgV, за которым следует трансмембранная область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два участка фосфорилирования, расположенных в иммунорецепторном тирозиновом ингибирующем мотиве и иммунорецепторном тирозиновом переключающем мотиве, что означает, что PD-1 подавляет сигналы Т-клеточного рецептора (TCR).

PD-1 имеет два лиганда, PD-L1 и PD-L2, которые являются членами семейства B7. Белок PD-L1 активируется на макрофагах и дендритных клетках (ДК) в ответ на введение липополисахарида (ЛПС) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), а также на Т-клетках и В-клетках при передаче сигналов TCR и В-клеточного рецептора, тогда как у мышей в состоянии покоя мРНК PD-L1 может обнаруживаться в сердце, легких, тимусе, селезенке и почках. При обработке интерфероном IFN- $\gamma$  лиганд PD-L1 экспрессируется почти во всех мышечных линиях опухолевых клеток, включая линии миеломы RA1, мастоцитомы P815 и меланомы B16. Экспрессия PD-L2 более ограничена и наблюдается в основном в ДК и нескольких линиях опухолей.

Существуют исследования, дающие возможность предположить, что PD-1 и его лиганды подавляют иммунные ответы. У мышей с нокаутом PD-1 наблюдалось развитие волчаночноподобного гломерулонефрита и дилатационной кардиомиопатии на фоне C57BL/6 и BALB/c соответственно. In vitro обработка Т-клеток, стимулированных антителом к CD3, с использованием PD-L1-Ig приводит к уменьшению пролиферации Т-клеток и секреции IFN- $\gamma$ . По-видимому, стимуляция PD-L1 может позволить разным видам рака уклониться от влияния иммунной системы хозяина. Было показано, что экспрессия PD-L1 имеет обратную корреляцию с количеством внутриэпителиальных Т-лимфоцитов CD8+, что указывает на то, что PD-L1 на опухолевых клетках может подавлять противоопухолевые Т-клетки CD8+.

LAG3 и TIM3 - это некоторые из многих рецепторных молекул на поверхности Т-лимфоцитов, которые проявляют ингибирующие функции.

Домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен-3 муцина (TIM-3, также известный как HAVCR2) представляет собой белок человека, который кодируется геном HAVCR2. TIM-3 представляет собой рецептор поверхности белка, экспрессируемый активированными Т-клетками Th1 CD4, продуцирующими IFN-гамма, и цитотоксическими Т-клетками CD8. Его лигандом является галектин-9, который обильно экспрессируется в микроокружении опухоли и индуцирует гибель клеток и истощение Т-клеток CD4 и Т-клеток CD8. Доказательства того, что TIM-3 является ключевой контрольной точкой иммунного ответа при индуцированной опухолью или вирусом иммуносупрессии, проистекает из демонстрации того, что в моделях доклинических исследований Т-клетки CD8, экспрессирующие TIM-3, являются наиболее подавленной или дисфункциональной популяцией Т-клеток CD8.

Ген 3 активации лимфоцитов (LAG-3, также известный как CD223) является членом суперсемейства Ig, который экспрессируется только на активированных и толеризованных Т-клетках, которые связываются с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса II (MHC-II) и которые, как известно, передают ингибирующие сигналы. LAG-3 заметно активируется на истощенных Т-клетках по сравнению с эффекторными Т-клетками или Т-клетками памяти. LAG-3 подавляет распространение Т-клеток путем ингибирования индуцированных Т-клеточным рецептором потоков кальция, таким образом контролируя размер пула Т-клеток памяти. Исследования показали, что в контексте рака LAG3 активируется на TIL, а блокада LAG-3 может усилить противоопухолевые Т-клеточные иммунные ответы. Блокада LAG-3 в модели хронической вирусной инфекции, которая вызывает истощение Т-клеток CD8, может активировать ответы Т-клеток CD8.

В совокупности эти вышеупомянутые белки вместе с другими ингибирующими рецепторами, такими как CTLA-4, являются важными участниками истощения Т-клеток CD8, которое происходит при хронических патологических состояниях иммунной системы, таких как хроническая вирусная инфекция и рак, как в экспериментальных моделях, так и у людей. Эти известные признаки и функции PD1-1, CTLA-4, TIM-3 и LAG-3 делают их привлекательной мишенью для

иммунной модуляции в условиях вакцинации.

Таким образом, существует потребность в улучшенных композициях и способах для нацеленного воздействия на молекулы контрольных точек иммунного ответа для лечения рака, инфекционных заболеваний и других состояний.

#### **Краткое изложение предпочтительных вариантов реализации**

В одном аспекте в изобретении предложена композиция для создания синтетического антитела у субъекта, содержащая одну или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих одно или более синтетических антител или их фрагментов, причем одно или более антител или фрагментов нацеленно воздействуют по меньшей мере на одну молекулу контрольной точки иммунного ответа.

В одном варианте реализации по меньшей мере одна молекула контрольной точки иммунного ответа выбрана из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, PD-L1, GITR, CD40, OX40, CTLA-4, TIM-3, 4-1BB и их комбинаций.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи человеческого IgG1к.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий переменную область тяжелой цепи антитела; константную область тяжелой цепи человеческого IgG1к; домен расщепления; переменную область легкой цепи антитела и константную область легкой цепи IgG1к.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность.

В одном варианте реализации композиция содержит

нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 и 28.

В одном варианте реализации композиция содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 и 27.

В одном варианте реализации одна или более молекул нуклеиновых кислот сконструированы для нахождения в экспрессионном векторе.

В одном варианте реализации композиция дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген.

В одном варианте реализации композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В другом аспекте в изобретении предложен способ лечения заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту по меньшей мере одной композиции по изобретению.

В одном варианте реализации заболевание представляет собой рак. В другом варианте реализации заболевание представляет собой инфекционное заболевание.

В другом аспекте в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту композиции по изобретению.

В одном варианте реализации введение композиции включает стадию электропорации.

В другом аспекте в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения комбинации синтетического антигена и ингибитора контрольных точек иммунного ответа, причем ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой синтетическое антитело, при этом стадия введения включает: проведение субъекту прайминговой вакцинации и бустерной вакцинации синтетического антигена, и введение субъекту после бустерной вакцинации ингибитора контрольных точек иммунного ответа.

В одном варианте реализации способ дополнительно включает стадию проведения субъекту в последующем бустерной вакцинации с использованием синтетического антигена. В одном варианте

реализации любая из стадий введения включает применение в месте введения электропорации.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фигуре 1 представлено изображение, показывающее дизайн моноклональных антител на основе ДНК (dMAb).

На фигуре 2 представлен ряд изображений, показывающих (фигура 2А) неограничивающий список мишеней для использования методики dMAb и (фигура 2В) концентрацию IgG (мкг/мл) в супернатанте после трансфекции.

На фигуре 3 представлен ряд изображений, показывающих конструкцию плазмид dMAb PD-1 и LAG-3 и подтверждение продукции IgG *in vitro* и *in vivo*. (Фигура 3А): конструкция плазмид dMAb. (Фигура 3В): подтверждение продукции IgG *in vitro*. (Фигура 3С): подтверждение продукции IgG *in vivo*.

На фигуре 4 представлен ряд изображений, показывающих, что IgG, выработанные *in vivo* после введения плазмид dMAb PD-1 или LAG-3, специфически связываются со своими мишенями. (Фигура 4А): связывание с hrPD-1 или hrLAG-3. (Фигура 4В): вестерн-блоты против PD-1 или LAG-3 с использованием соответствующего dMAb, выработанного *in vivo*. (Фигура 4С): результаты анализа сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) - связывание с PD-1 или LAG-3 с использованием сыворотки с pVAX1, сыворотки с dMAb или положительного контроля.

На фигуре 5 представлен ряд изображений, показывающих, что dMAb LAG-3 препятствует росту опухоли, улучшает выживаемость и способствует менее подавляющему микроокружению опухоли. (Фигура 5А): эксперимент по стимулированию развития опухоли, демонстрирующий улучшение выживания и уменьшение размера опухоли после введения dMAb LAG-3. (Фигура 5В): график, показывающий процентную долю клеток CD25<sup>+</sup> LAG3<sup>+</sup> после введения pVax-1 (контроль) или dMAb LAG3.

На фигуре 6 представлен ряд изображений, показывающих, что антитела dMAb связываются с активированными Т-клетками. Показаны результаты анализа FACS для нестимулированных (фигура 6А) и стимулированных полигидроксиалканоатом (ПГА) (фигура 6В) Т-клеток PD-1<sup>+</sup> в разных условиях.

На фигуре 7 представлено изображение, показывающее концентрацию IgG dMAb LAG-3 у голых мышей.

На фигуре 8 представлено изображение, показывающее связывание dMAb LAG-3 с LAG-3 в анализе ELISA.

На фигуре 9 представлено изображение, показывающее вестерн-блот LAG-3, демонстрирующий специфичность dMAb LAG-3 в отношении LAG-3 человека.

На фигуре 10 представлен ряд изображений, показывающих, что антитела dMAb связываются с активированными Т-клетками. Показаны результаты анализа FACS для нестимулированных (фигура 10А) и стимулированных полигидроксиалканоатом (ПГА) (фигура 10В) Т-клеток LAG-3<sup>+</sup> в разных условиях.

На фигуре 11 представлен ряд изображений, показывающих, что антитела dMAb блокируют активированные регуляторные Т-клетки (Treg).

На фигуре 12 представлен ряд изображений, показывающих экспрессию dMAb GITR у голых мышей. (Фигура 12А): введение контрольного pVax. (Фигура 12В): введение dMAb GITR. (Фигура 12С): результаты ELISA, демонстрирующие связывание dMAb GITR с GITR.

На фигуре 13 представлен ряд изображений, показывающих результаты анализа FACS Т-клеток GITR<sup>+</sup>. Показаны результаты для нестимулированных (фигура 13А) в сравнении со стимулированными ПГА клетками (фигура 13В) в разных условиях.

На фигуре 14 представлен ряд изображений, показывающих продукцию dMAb OX40 у голых мышей.

На фигуре 15 представлен ряд изображений, показывающих продукцию dMAb 4-1BB у голых мышей и результаты анализа ELISA, демонстрирующие специфическое связывание. (Фигура 15А): введение контрольного pVax. (Фигура 15В): введение dMAb 4-1BB. (Фигура 15С): результаты ELISA, демонстрирующие связывание dMAb 4-1BB с 4-1BB.

На фигуре 16 представлен график, демонстрирующий экспрессию антител к CTLA-4 ипимумаба и тремелиумаба в клетках 293T *in vitro*.

На фигуре 17 представлен ряд изображений, показывающих *in*



vivo экспрессию и связывание антител к CTLA-4 ипилимумаба и тремелимумаба у мышей линии Balb/c.

На фигуре 18 представлен график, показывающий in vivo экспрессию ипилимумаба и тремелимумаба у мышей линии Balb/c. Доставка представляла собой одну инъекцию dMAb (100 мкг ДНК в одну область). График демонстрирует иммунный ответ на мышинное антитело к антигену человека и его клиренс.

#### **Детальное описание предпочтительных вариантов реализации**

Настоящее изобретение относится к композиции, которую можно использовать для повышения или усиления иммунного ответа, т. е. для создания более эффективного иммунного ответа посредством комбинации вакцины, во многих случаях синтетического антигена, с ингибитором контрольных точек, в частности, с антителами к PD-1, PD-L1, LAG-3, GITR, CD40, OX40, CTLA-4, TIM-3 и 4-1BB (например, сконструированными MAbs в форме синтетических ДНК-плазмид).

Соответственно, в отношении искусственно созданных моноклональных антител (MAb) в форме синтетических ДНК-плазмид, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, ее фрагмент, ее вариант или их комбинацию. Композицию можно вводить нуждающемуся в этом субъекту для облегчения in vivo экспрессии и образования синтетического антитела. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит нуклеотидную последовательность, описанную в настоящем документе. Например, в одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, или ее вариант или ее фрагмент. В другом варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, или ее вариант или ее фрагмент. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из описанной в настоящем документе последовательности ДНК. Например, в одном варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК,

транскрибированную из последовательности ДНК с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, или ее вариант или ее фрагмент. В другом варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из последовательности ДНК, кодирующей полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, или ее вариант или ее фрагмент.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность кодирует фрагмент аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 28.

В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27. В одном варианте реализации нуклеотидная

последовательность представляет собой фрагмент нуклеотидной последовательности, который имеет по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине нуклеотидной последовательности с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27.

В частности, полипептиды тяжелой цепи и легкой цепи, экспрессируемые с рекомбинантных последовательностей нуклеиновых кислот, могут быть собраны в синтетическое антитело. Полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, способного связывать заданную мишень (например, молекулу контрольной точки иммунного ответа; PD-1, PD-L1, LAG-3, GITR, CD40, OX40, CTLA-4, TIM-3, 4-1BB и т. п.), являющегося более иммуногенным по сравнению с антителом, не прошедшим описанную в данном документе сборку, и способного вызывать или индуцировать иммунный ответ против заданной мишени.

Кроме того, эти синтетические антитела более быстро генерируются в организме субъекта, чем антитела, которые вырабатываются в ответ на индуцированный антигеном иммунный ответ. Синтетические антитела способны эффективно связывать и нейтрализовать ряд мишеней. Синтетические антитела также способны эффективно защищать от и/или стимулировать выживаемость при заболевании.

В некоторых случаях антитела по изобретению можно вводить в комбинации с желаемым антигеном; тогда как в других случаях антитела можно вводить отдельно от антигена вакцины. В некоторых случаях антитела по изобретению содержат последовательность ДНК, которая кодирует такое антитело, которое включает по меньшей мере переменные области иммуноглобулина.

Композиция по настоящему изобретению может повышать иммунный ответ на антиген у субъекта путем повышения ответа Т-клеток CD8<sup>+</sup> по сравнению с ответом на вакцину, которая не

содержит ингибиторы контрольных точек. Этот повышенный ответ Т-клеток CD8<sup>+</sup> обладает цитолитической активностью и секретирует противовирусный цитокин интерферон-гамма (IFN-γ).

Аспекты настоящего изобретения включают композиции для усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, нуждающегося в этом, содержащие синтетическое антитело в комбинации с синтетическим антигеном, способным генерировать иммунный ответ у субъекта, или его биологически функциональный фрагмент или его вариант.

Синтетический антиген может представлять собой выделенную ДНК, которая кодирует антиген. В одном варианте реализации антиген представляет собой опухолеассоциированный поверхностный антиген. Иллюстративными примерами опухолеассоциированного поверхностного антигена являются CD10, CD19, CD20, CD22, CD33, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), протеогликан хондроитинсульфат 4 (CSPG4, связанный с меланомой протеогликан хондроитинсульфат), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), Her2neu, Her3, IGFR, CD133, IL3R, белок, активирующий фибробласты (FAP), CDCP1, дерлин 1, тенаascin, белки Фрайзлед 1-10, сосудистые антигены VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR-альфа (CD140a), PDGFR-бета (CD140b), эндоглин, CLEC14, Tem1-8 и Tie2. Дополнительные примеры могут включать A33, CAMPATH-1 (CDw52), карциноэмбриональный антиген (CEA), карбоангидразу IX (MN/CA IX), CD21, CD25, CD30, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, de2-7 EGFR, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, связывающий фолат белок, G250, Fms-подобную тирозинкиназу 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, IL-2 рецептор, IL3R, MCSP (связанный с меланомой протеогликан хондроитинсульфат клеточной поверхности), Muc-1, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатический специфический антиген (PSA) и TAG-72. Примерами антигенов, экспрессируемых на внеклеточной матрице опухолей, являются тенаascin и белок, активирующий фибробласты (FAP).

В одном варианте осуществления синтетический антиген может

быть выбран из группы, состоящей из: hTERT, PSA, PSMA, STEAP, PSCA и PAP, WT1, тирозиназы, NYES01, PRAME, MAGE, CMV, вируса герпеса, HIV, HPV, HCV, HBV, вируса гриппа, RSV, Plasmodium falciparum и C. difficile.

Предложенные в настоящем документе композиции также могут содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Аспекты изобретения также включают способы повышения иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту любой из предложенных в настоящем документе композиций. Способы повышения иммунного ответа также могут включать этап электропорации.

#### Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области техники. В случае противоречия, приоритет имеет настоящий документ, включая определения. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при проверке настоящего изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены посредством ссылки. Описанные в данном документе материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не подразумевают ограничения.

В контексте данного документа подразумевается, что термины «содержит (-ат)», «включает (-ют)», «имеющий», «имеет», «может» и их варианты являются открытыми переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможности наличия дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают отсылки к множественному числу, если иное четко не следует из контекста. В настоящем изобретении также предусмотрены другие варианты реализации, «содержащие», «состоящие из» и «состоящие преимущественно из» представленных в данном документе вариантов реализации или элементов, приведенных явным образом или нет.

«Антитело» может означать антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их фрагменты или производные, включая Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и одноцепочечные антитела и их фрагменты. Антитело может представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки млекопитающего, поликлональное антитело, прошедшее аффинную очистку антитело или их смеси, которые проявляют достаточную специфичность связывания с необходимым эпитопом или полученной из него последовательностью.

В контексте данного документа «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела, содержащей антигенсвязывающий участок или переменную область. Эта часть не включает константные домены тяжелой цепи (т. е. CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> или CH<sub>4</sub> в зависимости от изоформа антитела) Fc-области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты Fab'-SH, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатела, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR переменной области тяжелой цепи.

В контексте данного документа термин «адъювант» означает любую молекулу, добавленную к вакцине, описанной в данном документе, с целью повышения иммуногенности антигенов, и, в частности, относится к антителам-ингибиторам контрольной точки.

В контексте данного документа термин «ингибитор контрольных точек» означает ингибиторы или молекулы, которые блокируют контрольные точки иммунного ответа, как это обычно понимается в области иммунотерапии рака. Чаще всего ингибиторы контрольных точек представляют собой антитела, блокирующие эти контрольные точки иммунного ответа.

В контексте данного документа термины «кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота» означают нуклеиновую кислоту (молекулу РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок,

например приведенное в данном документе антитело. Кодированная последовательность может также содержать последовательность ДНК, которая кодирует последовательность РНК. Кодированная последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту.

В контексте данного документа термин «комплементарная» означает нуклеиновую кислоту, характеризующуюся спариванием оснований Уотсона - Крика (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстина между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот.

В контексте данного документа взаимозаменяемые термины «электропорация», «электропермеабилитация» или «электрокинетическое усиление» («ЭП») относятся к применению трансмембранных электрических импульсов для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране; их наличие позволяет биомолекулам, таким как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарства, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

В контексте данного документа термин «эндогенное антитело» может относиться к антителу, генерируемому у субъекта, которому вводят эффективную дозу антигена для индукции гуморального иммунного ответа.

В контексте данного документа термин «фрагмент» означает последовательность нуклеиновой кислоты или ее участок, кодирующий полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего. Фрагменты могут представлять собой фрагменты ДНК, выбранные по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют белковые фрагменты, приведенные ниже. Фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% одной или более последовательностей нуклеиновых

кислот, приведенных ниже. В некоторых вариантах реализации фрагменты могут содержать по меньшей мере 20 нуклеотидов или более, по меньшей мере 30 нуклеотидов или более, по меньшей мере 40 нуклеотидов или более, по меньшей мере 50 нуклеотидов или более, по меньшей мере 60 нуклеотидов или более, по меньшей мере 70 нуклеотидов или более, по меньшей мере 80 нуклеотидов или более, по меньшей мере 90 нуклеотидов или более, по меньшей мере 100 нуклеотидов или более, по меньшей мере 150 нуклеотидов или более, по меньшей мере 200 нуклеотидов или более, по меньшей мере 250 нуклеотидов или более, по меньшей мере 300 нуклеотидов или более, по меньшей мере 350 нуклеотидов или более, по меньшей мере 400 нуклеотидов или более, по меньшей мере 450 нуклеотидов или более, по меньшей мере 500 нуклеотидов или более, по меньшей мере 550 нуклеотидов или более, по меньшей мере 600 нуклеотидов или более, по меньшей мере 650 нуклеотидов или более, по меньшей мере 700 нуклеотидов или более, по меньшей мере 750 нуклеотидов или более, по меньшей мере 800 нуклеотидов или более, по меньшей мере 850 нуклеотидов или более, по меньшей мере 900 нуклеотидов или более, по меньшей мере 950 нуклеотидов или более или по меньшей мере 1000 нуклеотидов или более из по меньшей мере одной из приведенных ниже последовательностей нуклеиновых кислот.

В контексте данного документа термин «фрагмент» также означает полипептидную последовательность или ее участок, способные вызывать иммунный ответ у млекопитающего. Фрагменты могут представлять собой полипептидные фрагменты, выбранные по меньшей мере из одной из различных аминокислотных последовательностей, приведенных ниже. Фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% одного или более белков, приведенных ниже. В некоторых вариантах реализации фрагменты могут содержать по меньшей мере 20 аминокислот или более, по меньшей мере 30 аминокислот или более, по меньшей мере 40 аминокислот или более, по меньшей мере 50 аминокислот или более, по меньшей мере 60 аминокислот или более, по меньшей мере 70 аминокислот или более,



по меньшей мере 80 аминокислот или более, по меньшей мере 90 аминокислот или более, по меньшей мере 100 аминокислот или более, по меньшей мере 110 аминокислот или более, по меньшей мере 120 аминокислот или более, по меньшей мере 130 аминокислот или более, по меньшей мере 140 аминокислот или более, по меньшей мере 150 аминокислот или более, по меньшей мере 160 аминокислот или более, по меньшей мере 170 аминокислот или более, по меньшей мере 180 аминокислот или более, по меньшей мере 190 аминокислот или более, по меньшей мере 200 аминокислот или более, по меньшей мере 210 аминокислот или более, по меньшей мере 220 аминокислот или более, по меньшей мере 230 аминокислот или более, или по меньшей мере 240 аминокислот или более из по меньшей мере одного из приведенных ниже белков.

В контексте данного документа термин «генетическая конструкция» относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок, такой как антитело. Термин «генетическая конструкция» может также относиться к молекуле ДНК, из которой транскрибирована РНК. Кодированная последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивида, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. В контексте данного документа термин «форма с возможностью экспрессии» относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок так, что в случае присутствия в клетке индивида будет происходить экспрессия кодирующей последовательности.

Употребляемые в данном документа термины «идентичная» или «идентичность» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов означают, что последовательности имеют заданный процент остатков, являющихся одинаковыми на протяжении заданной области. Процент можно рассчитывать путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей на

протяжении заданной области, определения числа позиций, в которых в обеих последовательностях находится идентичный остаток, для получения числа совпадающих позиций, деления числа совпадающих позиций на общее число позиций в заданной области и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. В случае, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание приводит к получению одного или более ступенчатых концов и заданная область сравнения включает только одну последовательность, остатки этой одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель при расчете. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) могут считаться эквивалентными. Идентичность можно оценивать вручную или с помощью компьютерного алгоритма выравнивания последовательностей, такого как BLAST или BLAST 2.0.

В контексте данного документа термин «иммунный ответ» означает активацию иммунной системы организма-хозяина, например млекопитающего, в ответ на внесение антигена. Иммунный ответ может иметь форму клеточного или гуморального ответа или их обоих.

В контексте данного документа термины «нуклеиновая кислота», или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид» означают по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных вместе. Описание одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь описанной одной цепи. Много вариантов нуклеиновой кислоты можно использовать в тех же целях, что и заданную нуклеиновую кислоту. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает по существу идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные последовательности. Одна цепь обеспечивает зонд, который может гибридизироваться с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизируется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными или могут содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота

может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибрид, когда нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты можно получать методами химического синтеза или рекомбинантными методами.

В контексте данного документа выражение «функционально связанный» означает, что экспрессия гена находится под управлением промотора, с которым он пространственно соединен. Промотор может располагаться в направлении 5' (выше) или 3' (ниже) гена, находящегося под его управлением. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, что и расстояние между этим промотором и геном, которым он управляет, в гене, из которого получен промотор. Как известно в данной области, это расстояние можно изменять без потери функциональности промотора.

В контексте данного документа термины «пептид», «белок» или «полипептид» могут означать связанную последовательность аминокислот и могут быть природными, синтетическими или представлять собой модификацию или комбинацию природных и синтетических.

В контексте данного документа термин «промотор» означает синтетическую или полученную из природного источника молекулу, которая способна обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических транскрипционных регуляторных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии. Промотор также может содержать удаленные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от начала участка транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивным или дифференциальным образом по

отношению к клетке, ткани или органу, в которых происходит экспрессия, или по отношению к стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние стимулы, такие как физиологический стресс, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типовые примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

Термины «сигнальный пептид» и «лидерная последовательность» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть связана с амино-концом синтетического антигена, включая некоторые упомянутые в настоящем документе примеры. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности, как правило, управляют локализацией белка. Используемые в данном документе сигнальные пептиды/лидерные последовательности предпочтительно облегчают секрецию белка из клетки, в которой он вырабатывается. После секреции из клетки сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остатка белка, часто называемого зрелым белком. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности связаны с N-концом белка.

В контексте данного документа «жесткие условия гибридизации» могут означать условия, в которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизироваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в комплексной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Жесткие условия можно выбрать так, что они были на около 5-10°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH.  $T_m$  может представлять собой температуру (при определенных ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизируются с последовательностью-мишенью в

равновесном состоянии (так как последовательности-мишени присутствуют в избытке, при  $T_m$ , 50% зондов оказываются занятыми в равновесном состоянии). Жесткие условия могут быть такими, при которых концентрация соли составляет менее чем около 1,0 М ионов натрия, например, около 0,01–1,0 М концентрация ионов натрия (или других солей) при pH 7,0–8,3, а температура составляет по меньшей мере около 30°C для коротких зондов (например, около 10–50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для длинных зондов (например, более чем около 50 нуклеотидов). Жесткие условия также можно обеспечить путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал может по меньшей мере в 2–10 раз превышать фоновую гибридизацию. Примеры жестких условий гибридизации включает следующие: 50% формамид, 5x SSC и 1% ДСН, инкубация при 42°C, или 5x SSC, 1% ДСН, инкубация при 65°C с промывкой в 0,2x SSC и 0,1% ДСН при 65°C.

В контексте данного документа термин «субъект» может означать млекопитающее, которое хочет или нуждается в проведении иммунизации описанными в данном документе вакцинами. Млекопитающее может представлять собой человека, шимпанзе, собаку, кошку, лошадь, корову, свинью, курицу, мышь или крысу.

В контексте данного документа выражение «по существу комплементарная» может означать, что первая последовательность по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична комплементарной цепи второй последовательности на протяжении 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизируются в жестких условиях гибридизации.

В контексте данного документа выражение «по существу идентичные» может означать, что первая и вторая аминокислотные последовательности идентичны по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% на протяжении области из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более аминокислот. Выражение «по существу идентичные» может также означать, что первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты идентичны по меньшей мере на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% на протяжении области из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов.

В контексте данного документа термин «синтетическое антитело» относится к антителу, которое кодируется рекомбинантной последовательностью нуклеиновой кислоты.

В контексте данного документа термин «лечение» может означать защиту животного от заболевания посредством предотвращения, супрессии, подавления или полного устранения заболевания. Предотвращение заболевания включает введение животному вакцины по настоящему изобретению до начала заболевания. Супрессия заболевания включает введение животному вакцины по настоящему изобретению после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Подавление заболевания включает введение животному вакцины по настоящему изобретению после клинического проявления заболевания.

Термин «вариант», используемый в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, означает (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную цепь указанной нуклеотидной последовательности или ее часть; (iii) нуклеиновую кислоту, которая является по существу идентичной указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементарной цепи; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизируется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементарной цепью или последовательностью, по существу

идентичной ей.

Термин «вариант» может быть дополнительно определен как пептид или полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности вследствие вставки, делеции или консервативной замены аминокислот, но сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Иллюстративные примеры «биологической активности» включают способность связываться специфическим антителом или стимулировать иммунный ответ. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая является по существу идентичной указанному белку с аминокислотной последовательностью, который сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности. Консервативные замены аминокислот, т. е. замещение аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), известны в данной области техники как включающие, как правило, незначительные изменения. Эти незначительные изменения можно частично определить на основании индекса гидропатичности аминокислот, как известно в данной области техники. Kyte с соавт., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты основан на оценке ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности можно взаимно заменять с сохранением функции белка. В одном аспекте проводят замену аминокислот, имеющих индекс гидропатичности  $\pm 2$ . Гидрофильность аминокислот также можно использовать для определения замен, которые бы привели к получению белков, сохраняющих биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным показателем, который, как сообщалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Замена аминокислот, имеющих аналогичные значения гидрофильности, может привести к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например, иммуногенность, как известно в данной области техники. Замены можно проводить с

аминокислотами, имеющими значения гидрофильности в пределах  $\pm 2$  относительно друг друга. Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет конкретный тип боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением понятно, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, проявляемого в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая является по существу идентичной на протяжении всей длины последовательности всего гена или ее части. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной на протяжении всей длины последовательности гена или ее части. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая является по существу идентичной на протяжении всей длины аминокислотной последовательности или ее части. Аминокислотная последовательность может быть на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной на протяжении всей длины аминокислотной последовательности или ее части.

В контексте данного документа термин «вектор» означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой вирусный вектор, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Вектор может представлять собой ДНК- или РНК-вектор. Вектор может представлять собой самореплицирующийся внехромосомный вектор, и преимущественно является ДНК-плазмидой.

В случае перечисления в данном документе числовых диапазонов явным образом и с той же степенью точности подразумевается и каждое промежуточное число. Например, в случае диапазона 6-9, кроме чисел 6 и 9 подразумеваются числа 7 и 8, а



в случае диапазона 6,0-7,0, явным образом подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

#### Композиции

В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие антиген и ингибиторы контрольных точек, предпочтительно антитела-ингибиторы контрольных точек. Антитела предпочтительно представляют собой синтетические антитела. Синтетические антитела предпочтительно представляют собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к LAG-3, антитело к GITR, антитело к CD40, антитело к OX40, антитело к CTLA-4, антитело к TIM-3 и/или антитело к 4-1BB. Изобретение также включает новые последовательности для применения в получении антител в клетках млекопитающих или для доставки в ДНК- или РНК-векторы, включая бактериальные, дрожжевые, а также вирусные векторы.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. При введении нуждающемуся в этом субъекту композиция может приводить к генерации синтетического антитела в организме субъекта. Синтетическое антитело может связывать молекулу-мишень (т. е. PD-1, PD-L1, LAG-3, GITR, CD40, OX40, CTLA-4, TIM-3 и/или 4-1BB), присутствующую у субъекта. Такое связывание может нейтрализовать мишень, блокировать распознавание мишени другой молекулой, например белком или нуклеиновой кислотой, и вызывать или индуцировать иммунный ответ на мишень.

В одном варианте реализации композиция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую синтетическое антитело. В одном варианте реализации композиция содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую нуклеотидную последовательность, кодирующую первое синтетическое антитело, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второе синтетическое антитело. В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен расщепления.

В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к

PD-1, антитело к PD-L1, антитело к LAG-3, антитело к GITR, антитело к CD40, антитело к OX40, антитело к CTLA-4, антитело к TIM-3 и/или антитело к 4-1BB. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, содержит кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области VH и VL антитела к НА. В одном варианте реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, содержит кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие области CH и CL человеческого IgG1κ.

В одном варианте реализации первая нуклеотидная последовательность, кодирующая первое синтетическое антитело, содержит первый домен, кодирующий область тяжелой цепи, и второй домен, кодирующий область легкой цепи первого синтетического антитела. В одном варианте реализации вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая второе синтетическое антитело, содержит первый домен, кодирующий область тяжелой цепи, и второй домен, кодирующий область легкой цепи второго синтетического антитела. В одном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую первый домен, кодирующий область тяжелой цепи и второй домен, кодирующий область легкой цепи антитела, выбранного из группы, состоящей из антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к LAG-3, антитела к GITR, антитела к CD40, антитела к OX40, антитела к CTLA-4, антитела к TIM-3 и антитела к 4-1BB.

В одном варианте реализации комбинация может представлять собой единую композицию или может быть представлена в виде отдельных составов для последовательного введения (либо вначале антиген, а потом ингибитор контрольных точек, или вначале ингибитор контрольных точек, а потом антиген). Композиция может увеличивать представление антигена и общий иммунный ответ на антиген у субъекта. Комбинация антигена и ингибитора контрольных точек индуцирует иммунную систему более эффективно, чем композиция, содержащая только один антиген. Этот более

эффективный иммунный ответ обеспечивает повышенную эффективность лечения и/или профилактики любого заболевания, в частности, онкологического заболевания, заболевания, вызванного патогеном или вирусом.

Антиген и ингибиторы контрольных точек, предпочтительно представляющие собой антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к LAG-3, антитело к GITR, антитело к CD40, антитело к OX40, антитело к CTLA-4, антитело к TIM-3 и/или антитело к 4-1BB композиции, можно вводить нуждающемуся в этом субъекту вместе или по отдельности. В некоторых случаях ингибиторы контрольных точек можно вводить отдельно от антигена композиции.

В некоторых вариантах реализации ингибиторы контрольных точек можно вводить по меньшей мере с интервалом 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 84 часа или 96 часов перед или после введения субъекту антигена. В других вариантах реализации антитело к PD1 или антитело к PDL1 можно вводить с интервалом по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 60 дней или 90 дней перед или после введения субъекту антигена.

В еще других вариантах реализации ингибиторы контрольных точек можно вводить с интервалом по меньшей мере 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель или 15 недель перед или после введения субъекту антигена. В других вариантах реализации антитело или антитела можно вводить приблизительно с интервалом от 12 часов до приблизительно 15 недель, от приблизительно 12 часов до приблизительно 10 недель, от приблизительно 12 часов до приблизительно 5 недель, от приблизительно 12 часов до приблизительно 1 недели, от приблизительно 12 часов до

приблизительно 60 часов, от приблизительно 12 часов до  
 приблизительно 48 часов, от приблизительно 24 часов до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 60 часов до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 96 часов до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 1 дня до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 5 дней до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 10 дней до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 15 дней до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 20 дней до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 25 дней до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 30 дней до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 1 недель до  
 приблизительно 15 недель, от приблизительно 5 недель до  
 приблизительно 15 недель или от приблизительно 10 недель до  
 приблизительно 15 недель перед или после ведения субъекту  
 антигена.

Композиция согласно настоящему изобретению может иметь  
 характеристики, необходимые для эффективных композиций, такие  
 как обеспечение безопасности в том смысле, что сама композиция  
 не приводит к болезни или смерти; защищает от болезни в  
 результате воздействия живых патогенов, таких как вирусы или  
 бактерии; индуцирует нейтрализующие антитела для предотвращения  
 инфицирования клеток; индуцирует защитные Т-клетки против  
 внутриклеточных патогенных микроорганизмов; и обеспечивает  
 легкость введения, небольшое количество побочных явлений,  
 биологическую стабильность и низкую стоимость, приходящуюся на  
 дозу. Композиция может выполнять некоторые или все эти функции  
 путем объединения антигена с ингибиторами контрольных точек,  
 предпочтительно с антителом к PD-1, антителом к PD-L1, антителом  
 к LAG-3, антителом к GITR, антителом к CD40, антителом к OX40,  
 антителом к CTLA-4, антителом к TIM-3 и/или антителом к 4-1BB,  
 как обсуждается ниже.

Композиция может дополнительно модифицировать представление  
 эпитопа внутри антигена, чтобы индуцировать больший иммунный  
 ответ на антиген, чем композиция, содержащая только антиген.  
 Композиция может дополнительно индуцировать иммунный ответ при

введении в разные ткани, такие как мышцы или кожа.

#### Ингибиторы контрольных точек

Ингибиторы контрольных точек могут представлять собой любой антагонист различных контрольных точек иммунного ответа и предпочтительно являются антителами, которые блокируют контрольные точки иммунного ответа. Антитела могут представлять собой белок, включая Fab, моноклональный или поликлональный. Антитела также могут быть конструкцией экспрессии ДНК, которая кодирует и может экспрессировать функциональные антитела. Вакцина может дополнительно содержать антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к LAG-3, антитело к GITR, антитело к CD40, антитело к OX40, антитело к CTLA-4, антитело к TIM-3 и/или антитело к 4-1BB. Антитело может быть синтетическим антителом, состоящим из последовательности ДНК, кодирующей по меньшей мере переменные области иммуноглобулина. Такое антитело может быть создано путем определения или скрининга описанного выше антитела, которое вступает в реакцию или связывается с описанным выше антигеном. В способе определения или скрининга антитела можно использовать антиген с применением методик, известных специалистам в данной области техники, для определения или скрининга антитела. Такие методики включают, но не ограничиваются этим, выбор антитела из библиотеки (например, фагового дисплея) и иммунизацию животного с последующим выделением и/или очисткой антитела. См., например, методы, описанные в публикации Rajan, S. и Sidhu, S., Methods in Enzymology, том 502, первая глава «Simplified Synthetic антитело Libraries (2012)», включенной в настоящий документ во всей полноте.

Любые антитела по изобретению можно также комбинировать с другими антителами-ингибиторами контрольных точек, включая антитело к CTLA-4 и другие. Ингибиторы контрольных точек могут быть известным продуктом, таким как, например, ипилимумаб, тремелиумаб, ниволумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, BMS-936559 (см. веб-сайт [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov), идентификатор NCT02028403), MPDL3280A (Roche, см. веб-сайт [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov), идентификатор NCT02008227), MDX1105-01 (Bristol Myers Squibb, см. веб-сайт

ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT00729664), MEDI4736 (MedImmune, см. веб-сайт ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT01693562) и МК-3475 (Merck, см. веб-сайт ClinicalTrials.gov, идентификатор NCT02129556).

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может содержать одну или более конструкций рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более компонентов, которые более подробно описаны ниже.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид тяжелой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид легкой цепи, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует участок расщепления протеазой или пептидазой. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более лидерных последовательностей, причем лидерная последовательность кодирует сигнальный пептид. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более промоторов, один или более интронов, одну или более областей терминации транскрипции, один или более иницирующих кодонов, один или более терминирующих или стоп-кодонов и/или один или более сигналов полиаденилирования. Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты также может содержать одну или более линкерных или метящих последовательностей. Метящая последовательность может кодировать гемагглютининовую (ГА) метку.

***Полипептид тяжелой цепи***

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

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

Полипептид тяжелой цепи может содержать набор определяющих комплементарность областей («CDR»). Набор CDR может содержать три гиперпеременные области из области VH. Начиная с N-конца полипептида тяжелой цепи, эти CDR обозначаются «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида тяжелой цепи могут вносить свой вклад в связывание или распознавание антигена.

***Полипептид легкой цепи***

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

Полипептид легкой цепи может содержать набор определяющих комплементарность областей («CDR»). Набор CDR может содержать три гиперпеременные области из области VL. Начиная с N-конца полипептида легкой цепи, эти CDR обозначаются «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида легкой цепи могут вносить свой вклад в связывание или распознавание антигена.

### ***Участок расщепления протеазой***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую участок расщепления протеазой. Участок расщепления протеазой может распознаваться протеазой или пептидазой. Протеаза может представлять собой эндопептидазу или эндопротеазу, например, но не ограничиваясь этим, фурин, эластазу, HtrA, кальпаин, трипсин, химотрипсин, трипсин и пепсин. Протеаза может представлять собой фурин. В других вариантах реализации протеаза может представлять собой сериновую протеазу, треониновую протеазу, цистеиновую протеазу, аспартатную протеазу, металлопротеазу, протеазу глутаминовой кислоты или любую протеазу, которая расщепляет внутреннюю пептидную связь (т. е. не расщепляет N-концевую или C-концевую пептидную связь).

Участок расщепления протеазой может содержать одну или более аминокислотных последовательностей, которые стимулируют расщепление или повышают его эффективность. Одна или более аминокислотных последовательностей могут стимулировать или повышать эффективность образования или генерации дискретных полипептидов. Одна или более аминокислотных последовательностей могут содержать 2A пептидную последовательность.

### ***Линкерная последовательность***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более линкерных последовательностей. Линкерная последовательность может пространственно разделять или связывать один или более описанных в данном документе компонентов. В других вариантах реализации линкерная последовательность может кодировать аминокислотную последовательность, которая пространственно разделяет или связывает два или более полипептидов.

### ***Промотор***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более промоторов. Один или более промоторов могут представлять собой любой промотор, способный управлять генной экспрессией и регулировать генную



экспрессию. Такой промотор представляет собой цис-действующий элемент последовательности, необходимый для транскрипции с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Выбор промотора, применяемого для управления генной экспрессией, зависит от конкретного применения. Промотор может располагаться приблизительно на таком же расстоянии от точки начала транскрипции в конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, что и от точки начала транскрипции в своем природном окружении. При этом это расстояние можно варьировать без потери функциональности промотора.

Промотор может быть функционально связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи. Промотор может представлять собой промотор, эффективный для экспрессии в эукариотических клетках. Промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью, может представлять собой промотор ЦМВ, промотор вируса обезьян 40 (SV40), такой как ранний промотор SV40 и поздний промотор SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), такой как промотор длинных концевых повторов (ДКП) бычьего вируса иммунодефицита (БВИ), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ВЛП), промотор цитомегаловируса (ЦМВ), такой как немедленно-ранний промотор ЦМВ, промотор вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) или промотор вируса саркомы Рауса (BCP). Промотор также может представлять собой промотор из человеческого гена, такого как человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатинин, человеческий полиэдрин или человеческий металлотионеин.

Промотор может представлять собой конститутивный промотор или индуцибельный промотор, который инициирует транскрипцию, только когда клетка-хозяин подвергается воздействию некоторого внешнего стимула. В случае многоклеточного организма промотор также может быть специфическим в отношении конкретной ткани или органа, или стадии развития. Промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как промотор, специфический

в отношении мышц или кожи, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US20040175727, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Промотор может быть связан с энхансером. Энхансер может располагаться выше кодирующей последовательности. Энхансер может представлять собой энхансер человеческого актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатинина или вирусный энхансер, например, из ЦМВ, FMDV, РСВ или ВЭВ. Энхансеры полинуклеотидной функции описаны в патентах США № 5593972, 5962428 и W094/016737, содержание которых в полном объеме включено посредством ссылки.

#### ***Интрон***

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

#### ***Область терминации транскрипции***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более областей терминации транскрипции. Область терминации транскрипции может располагаться ниже кодирующей последовательности, чтобы обеспечивать эффективную терминацию. Область терминации транскрипции может быть получена из того же гена, что и вышеописанный промотор, или может быть получена из одного или более других генов.

#### ***Иницирующий кодон***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более иницирующих кодонов. Иницирующий кодон может располагаться выше кодирующей последовательности. Иницирующий кодон может находиться на каркасе с кодирующей последовательностью. Иницирующий кодон может быть связан с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной инициации трансляции, например, но не ограничиваясь

этим, участком связывания рибосомы.

#### ***Терминирующий кодон***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более терминирующих или стоп-кодонов. Терминирующий кодон может располагаться ниже кодирующей последовательности. Терминирующий кодон может находиться на каркасе с кодирующей последовательностью. Терминирующий кодон может быть связан с одним или более сигналами, необходимыми для эффективной терминации трансляции.

#### ***Сигнал полиаденилирования***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более сигналов полиаденилирования. Сигнал полиаденилирования может содержать один или более сигналов, необходимых для эффективного полиаденилирования транскрипта. Сигнал полиаденилирования может располагаться ниже кодирующей последовательности. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования ДКП, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигнал полиаденилирования человеческого  $\beta$ -глобина. Сигнал полиаденилирования SV40 может представлять собой сигнал полиаденилирования из плазмиды pCER4 (Invitrogen, San Diego, CA).

#### ***Лидерная последовательность***

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать одну или более лидерных последовательностей. Лидерная последовательность может кодировать сигнальный пептид. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина (Ig), например, но не ограничиваясь этим, сигнальный пептид IgG и сигнальный пептид IgE.

Компоновка конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

Как описано выше, рекомбинантная последовательность

нуклеиновой кислоты может содержать одну или более конструкций рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, при этом каждая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более компонентов. Один или более компонентов подробно описаны выше. Один или более компонентов, когда они включены в конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, могут располагаться в любом порядке по отношению друг к другу. В некоторых вариантах реализации один или более компонентов могут располагаться в конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты так, как описано ниже.

### ***Компоновка 1***

В одной компоновке первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, а вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи.

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

Первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать промотор, интрон, область терминации транскрипции, иницирующий кодон, терминирующий кодон и/или сигнал полиаденилирования. Первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать лидерную последовательность, причем лидерная последовательность расположена выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи. Соответственно, сигнальный пептид, кодируемый

лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом тяжелой цепи.

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

Соответственно, один пример компоновки 1 может включать первый вектор (и, таким образом, первую конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH и CH1, и второй вектор (и, таким образом, вторую конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL. Второй пример компоновки 1 может включать первый вектор (и, таким образом, первую конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и второй вектор (и, таким образом, вторую конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL.

### **Компоновка 2**

Во второй компоновке конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид тяжелой цепи, может располагаться

выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В альтернативном варианте гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид легкой цепи, может располагаться выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи.

Конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты можно помещать в вектор, как более подробно описано ниже.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок расщепления протеазой и/или линкерную последовательность. При включении в конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая участок расщепления протеазой, может располагаться между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Соответственно, участок расщепления протеазой позволяет разделять полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи на разные полипептиды после экспрессии. В других вариантах реализации при включении в конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты линкерной последовательности она может располагаться между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты также может содержать промотор, интрон, область терминации транскрипции, иницирующий кодон, терминирующий кодон и/или сигнал полиаденилирования. Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один или более промоторов. Конструкция рекомбинантной последовательности

нуклеиновой кислоты также может содержать два промотора так, что один промотор может быть связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, а второй промотор может быть связан с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать один промотор, связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать две лидерные последовательности, причем первая лидерная последовательность расположена выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, а вторая лидерная последовательность расположена выше (или на 5' конце) гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи. Соответственно, сигнальный пептид, кодируемый первой лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом тяжелой цепи, а второй сигнальный пептид, кодируемый второй лидерной последовательностью, может быть связан пептидной связью с полипептидом легкой цепи.

Соответственно, один пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором линкерная последовательность расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Второй пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким

образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH и CH1, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая участок расщепления протеазой, расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Третий пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором линкерная последовательность расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Четвертый пример компоновки 2 может включать вектор (и, таким образом, конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты), кодирующий полипептид тяжелой цепи, который содержит VH, CH1, шарнирную область, CH2 и CH3, и полипептид легкой цепи, который содержит VL и CL, в котором гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая участок расщепления протеазой, расположена между гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид тяжелой цепи, и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид легкой цепи.

Экспрессия из конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты

В других вариантах реализации конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может содержать, в числе одного или более компонентов, гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, и/или гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты,



кодирующую полипептид легкой цепи. Соответственно, конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи и/или полипептида легкой цепи.

В случае применения описанной выше компоновки 1 первая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи, а вторая конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида легкой цепи. В случае применения описанной выше компоновки 2 конструкция рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты может облегчать экспрессию полипептида тяжелой цепи и полипептида легкой цепи.

После экспрессии, например, но не ограничиваясь этим, в клетке, организме или млекопитающем, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут формировать синтетическое антитело. В частности, полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, способного связывать антиген. В других вариантах реализации полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, являющегося более иммуногенным по сравнению с антителом, не прошедшим описанную в данном документе сборку. В других вариантах реализации полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи могут взаимодействовать друг с другом так, что сборка приводит к получению синтетического антитела, способного вызывать или индуцировать иммунный ответ против антигена.

#### Векторы

Описанную выше конструкцию рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты можно помещать в один или более векторов. Один или более векторов могут содержать точку начала репликации. Один или более векторов могут представлять собой плазмиду, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Один или более векторов могут представлять собой как самореплицирующийся

внехромосомный вектор, так и вектор, который интегрируется в геном организма-хозяина.

Векторы включают, но не ограничиваются этим, плазмиды, векторы экспрессии, рекомбинантные вирусы, любую форму рекомбинантного вектора «голой ДНК» и т. п. «Вектор» содержит нуклеиновую кислоту, которая может инфицировать, трансфицировать, временно или постоянно трансдуцировать клетку. Следует понимать, что вектор может представлять собой «голую» нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту в комплексе с белком или липидом. Вектор необязательно содержит вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты, и/или белки, и/или мембраны (например, клеточную мембрану, вирусную липидную оболочку и т. д.). Векторы включают, но не ограничиваются этим, репликоны (например, репликоны РНК, бактериофаги), к которым могут быть прикреплены и становиться реплицированными фрагменты ДНК. Таким образом, векторы включают, но не ограничиваются этим, РНК, автономную самореплицирующуюся циркулярную или линейную ДНК или РНК (например, плазмиды, вирусы и т. п., см., например, патент США. № 5,217,879), и включают как экспрессионные, так и не экспрессионные плазмиды. В некоторых вариантах реализации вектор включает линейную ДНК, ферментативную ДНК или синтетическую ДНК. Когда рекомбинантный микроорганизм или клеточная культура описывается как хозяин «вектора экспрессии», это означает, что они включают как внехромосомную циркулярную, так и линейную ДНК, и ДНК, которые были включены в хромосому (-ы) хозяина. Когда вектор поддерживается в клетке-хозяине, вектор может либо стабильно реплицироваться клетками во время митоза как автономная структура, либо может быть включен в геном хозяина.

Один или более векторов могут представлять собой гетерологичную экспрессионную конструкцию, которая в общем случае является плазмидой, которую используют для внесения конкретного гена в клетку-мишень. После того, как экспрессионный вектор попадает в клетку, полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, которые кодируются конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты, начинают вырабатываться рибосомальными комплексами клеточного аппарата

транскрипции и трансляции. Один или более векторов могут экспрессировать большие количества стабильной матричной РНК и, следовательно, белков.

### **Экспрессионный вектор**

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

### **Плазида**

Один или более векторов могут представлять собой плазмиду. Плазмиду можно применять для трансфекции клеток конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Плазмиду можно применять для внесения конструкции рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты в организм субъекта. Плазида также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для генной экспрессии в клетке, в которую внесена плазида.

Плазида также может содержать точку начала репликации млекопитающего для внехромосомной поддержки плазмиды и выработки множества копий плазмиды в клетке. Плазида может представлять собой pVAX, pCEP4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), которые могут содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр и область, кодирующую ядерный антиген EBNA-1, которая может обеспечивать многокопийную эписомальную репликацию без интеграции. Скелет плазмиды может представлять собой pAV0242. Плазида может представлять собой дефективную по репликации аденовирусную плазмиду типа 5 (Ad5).

Плазида может представлять собой pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для выработки белка в *Escherichia coli* (E. coli). Плазида также может представлять собой pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно

использовать для выработки белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазмида также может принадлежать полной бакуловирусной системе экспрессии MAXVAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которую можно использовать для выработки белка в клетках насекомых. Плазмида также может представлять собой pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которые можно использовать для выработки белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO).

### ***РНК-векторы***

В одном варианте реализации нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК. В одном варианте реализации молекула РНК транскрибирована из описанной в настоящем документе последовательности ДНК. Например, в некоторых вариантах реализации молекула РНК кодируется одной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, или ее вариантом, или ее фрагментом. В другом варианте реализации нуклеотидная последовательность содержит последовательность РНК, транскрибированную из последовательности ДНК, кодирующей полипептидную последовательность с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, или ее вариант или ее фрагмент. Соответственно, в одном варианте реализации в изобретении предложена молекула РНК, кодирующая один или более ингибиторов контрольной точки, описанных в настоящем документе. РНК может иметь дополнительную цепь. Соответственно, в некоторых вариантах реализации молекула РНК может быть транслирована клетками без необходимости каких-либо промежуточных этапов репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, подходящая для использования в изобретении, может иметь 5'-кэп (например, 7-метилгуанозин). Этот кэп может усиливать трансляцию РНК *in vivo*. 5'-нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь группу трифосфата на 5'-конце. В кэппированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином через мостик 5'-к-5'. Молекула РНК может иметь поли-А хвост на 3'-конце. Около своего 3'-конца она может также включать последовательность, отвечающую за распознавание поли-А

полимеразы (например, AAUAAA). Молекула РНК, используемая в изобретении, обычно является одноцепочечной.

#### **Кольцевой и линейный векторы**

Один или более векторов могут представлять собой одну или более кольцевых плазмид, которые могут трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономно-реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации). Вектор может представлять собой pVAX, pcDNA3.0 или pprovaх, или любой другой экспрессионный вектор, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты.

Также в данном документе предложена линейная нуклеиновая кислота или линейная экспрессионная кассета («ЛЭК»), которую возможно эффективно доставлять субъекту путем электропорации и которая способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. ЛЭК может представлять собой любую линейную ДНК, в которой отсутствует какой-либо фосфатный остов. ДНК может кодировать одно или более антител. ЛЭК может содержать промотор, интрон, стоп-кодон, сигнал полиаденилирования. ЛЭК может не содержать каких-либо генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатный остов. ЛЭК может не содержать другие последовательности нуклеиновых кислот, не связанные с экспрессией необходимого гена. ЛЭК возможно эффективно доставлять субъекту путем электропорации и она способна экспрессировать одно или более необходимых антител. ЛЭК может быть получена из любой плазмиды, которую возможно линеаризовать. Их можно также синтезировать без бактериального роста, и не из линеаризованных последовательностей. Плазида может быть способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Плазида может представлять собой pNP (Пуэрто-Рико/34) или pM2 (Новая Каледония/99). Плазида может представлять собой WLV009, pVAX, pcDNA3.0 или pprovaх, или любой другой экспрессионный вектор,

способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемые конструкцией рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты.

ЛЭК может представлять собой pcrM2. ЛЭК может представлять собой pcrNP. pcrNP и pcrMR могут быть получены из pNP (Пуэрто-Рико/34) и pM2 (Новая Каледония/99) соответственно.

### **Вирусные векторы**

В одном варианте реализации предложены вирусные векторы, способные доставлять нуклеиновую кислоту настоящего изобретения в клетку. Экспрессионный вектор можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области и описаны, например, у Sambrook et al. (2001), и у Ausubel et al. (1997), и в других справочниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит участок начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров. (См., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6,326,193). Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом переноса генов в клетки млекопитающих, например клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвируса, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патент США №№ 5 350 674 и 5 585 362.

### **Способ получения вектора**

В данном документе предложен способ получения одного или более векторов, в которые была помещена рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты. После конечного этапа субклонирования вектор можно использовать для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном ферментационном чане с помощью известных в данной области техники способов.

В других вариантах реализации после конечного этапа

субклонирования вектор можно использовать с одним или более устройствами для электропорации (ЭП). Устройства для ЭП более подробно описаны ниже.

Один или более векторов можно готовить или получать, используя комбинацию известных устройств и методик, но предпочтительно их получают с помощью методики получения плазмид, описанной в лицензированной, одновременно находящейся на рассмотрении предварительной заявке США № 60/939,792, поданной 23 мая 2007 г. В некоторых примерах описанные в данном документе ДНК-плазмиды можно готовить в концентрациях, превышающих или равных 10 мг/мл. Методики получения также включают применение различных устройств и протоколов, которые являются общеизвестными для специалистов в данной области техники, в дополнение описанным в заявке на патент США, серийный № 60/939,792, включая описанные в лицензированном патенте США № 7,238,522, изданном 3 июля 2007 г. Вышеуказанные заявка и патент, серийный № 60/939,792 и патент США № 7,238,522, соответственно, в полном объеме включены в данный документ.

#### Антитело

Как описано выше, рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Антитело может связываться или вступать в реакцию с антигеном, который более подробно описан ниже.

Антитело может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания у субъекта, которому вводят композицию по изобретению. Антитело посредством связывания с антигеном может обеспечивать лечение, предотвращение и/или защиту от заболевания у субъекта, которому вводят композицию. Антитело может способствовать выживаемости при заболевании у субъекта, которому вводят композицию. В одном варианте реализации антитело может обеспечить повышенную выживаемость субъекта с заболеванием по сравнению с ожидаемой выживаемостью у имеющего заболевание субъекта, которому не вводили антитело. В различных вариантах реализации антитело может обеспечивать повышение выживаемости у субъекта с заболеванием, которому вводили композицию, по меньшей

мере на около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% больше по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии введения композиции. В одном варианте реализации антитело может обеспечить повышенную защиту от заболевания у субъекта по сравнению с ожидаемой защитой у субъекта, которому не вводили антитело. В различных вариантах реализации антитело может обеспечивать защиту от заболевания у субъекта, которому вводили композицию, по меньшей мере на около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% больше по сравнению с ожидаемой защитой при отсутствии введения композиции.

Антитело может содержать набор определяющих комплементарность областей («CDR») тяжелой цепи и легкой цепи, перемежающих соответственно набор каркасных областей («FR») тяжелой цепи и легкой цепи, которые обеспечивают поддержку CDR и определяют пространственную взаимосвязь CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельные области из V-области тяжелой или легкой цепи. Начиная с N-конца тяжелой или легкой цепи, эти CDR обозначаются «CDR1», «CDR2» и «CDR3» соответственно. Следовательно, антигенсвязывающий участок может включать шесть CDR, составляющих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

Протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, два из которых (фрагменты F(ab)) содержат ковалентный гетеродимер, который содержит интактный антигенсвязывающий участок. Фермент пепсин способен расщеплять молекулы IgG с получением нескольких фрагментов, включая фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который содержит оба антигенсвязывающих участка. Соответственно, антитело может представлять собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>. Fab может содержать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи Fab может содержать область VH и область CH1. Полипептид легкой цепи Fab может содержать область VL и область CL.



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

Антитело может представлять собой поликлональное или моноклональное антитело. Антитело может представлять собой химерное антитело, одноцепочечное антитело, антитело с созревшей аффинностью, человеческое антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Гуманизированное антитело может представлять собой антитело от отличного от человека вида, которое связывает необходимый антиген, имеющее одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) от отличного от человека вида и каркасные области из молекулы человеческого иммуноглобулина.

Антитело может представлять собой биспецифическое антитело, более подробно описанное ниже. Антитело может представлять собой бифункциональное антитело, также более подробно описанное ниже.

Как описано выше, антитело может генерироваться у субъекта после введения субъекту композиции. Антитело может характеризоваться определенным временем полужизни в организме субъекта. В некоторых вариантах реализации антитело можно модифицировать, чтобы продлить или укоротить его время полужизни в организме субъекта. Такие модификации более подробно описаны ниже.

Антитело может быть дефукозилированным, как более подробно описано ниже.

Антитело можно модифицировать, чтобы снизить или предотвратить антителозависимое усиление (АЗУ) заболевания, связанного с антигеном, как более подробно описано ниже.

#### Биспецифическое антитело

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать биспецифическое антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Биспецифическое антитело может связываться

или вступать в реакцию с двумя антигенами, например, двумя антигенами, более подробно описанными ниже. Биспецифическое антитело может состоять из фрагментов двух описанных в данном документе антител, что, таким образом, позволяет биспецифическому антителу связываться или вступать в реакцию с двумя необходимыми молекулами-мишенями, которые могут включать антиген, который более подробно описан ниже, лиганд, включая лиганд для рецептора, рецептор, включая лиганд-связывающий участок на рецепторе, комплекс лиганд-рецептор и маркер, включая раковый маркер.

#### Бифункциональное антитело

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать бифункциональное антитело, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Бифункциональное антитело может связываться или вступать в реакцию с описанным ниже антигеном. Бифункциональное антитело также можно модифицировать, чтобы придать антителу дополнительную функциональность помимо распознавания и связывания антигена. Такая модификация может включать, но не ограничивается этим, сопряжение с фактором Н или его фрагментом. Фактор Н представляет собой растворимый регулятор активации комплемента и, таким образом, может вносить свой вклад в иммунный ответ посредством комплемент-опосредованного лизиса (КОЛ).

#### Продление времени полужизни антитела

Как описано выше, антитело можно модифицировать, чтобы продлить или укоротить время полужизни антитела в организме субъекта. Модификация может продлевать или укорачивать время полужизни антитела в сыворотке субъекта.

Модификация может присутствовать в константной области антитела. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в константной области антитела, которые продлевают время полужизни антитела по сравнению со временем полужизни антитела, не содержащего одну или более аминокислотных замен. Модификация может представлять собой одну или более аминокислотных замен в домене СH2 антитела, которые продлевают время полужизни антитела по сравнению со временем полужизни

антитела, не содержащего одну или более аминокислотных замен.

В некоторых вариантах реализации одна или более аминокислотных замен в константной области могут включать замещение остатка метионина в константной области остатком тирозина, остатка серина в константной области остатком треонина, остатка треонина в константной области остатком глутамата или любую их комбинацию, продлевая, таким образом, время полужизни антитела.

В других вариантах реализации одна или более аминокислотных замен в константной области могут включать замещение остатка метионина в домене CH<sub>2</sub> остатком тирозина, остатка серина в домене CH<sub>2</sub> остатком треонина, остатка треонина в домене CH<sub>2</sub> остатком глутамата или любую их комбинацию, продлевая, таким образом, время полужизни антитела.

#### Дефукозилирование

Рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антитело, которое не является фукозилированным (т. е. дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело), его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Фукозилирование включает добавление к молекуле сахара фукозы, например, присоединение фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области. В свою очередь, это отсутствие фукозилирования может улучшать связывание FcγRIIIa и антителозависимую клеточную цитотоксическую (АЗКЦ) активность антитела по сравнению с фукозилированным антителом. Следовательно, в некоторых вариантах реализации нефукозилированное антитело может проявлять повышенную активность АЗКЦ по сравнению с фукозилированным антителом.

Антитело можно модифицировать так, чтобы предотвратить или ингибировать фукозилирование антитела. В некоторых вариантах реализации такое модифицированное антитело может проявлять повышенную активность АЗКЦ по сравнению с немодифицированным антителом. Модификация может присутствовать в тяжелой цепи, легкой цепи или их комбинации. Модификация может представлять

собой одну или более аминокислотных замен в тяжелой цепи, одну или более аминокислотных замен в легкой цепи или их комбинацию.

#### Сниженный ответ АЗУ

Антитело можно модифицировать, чтобы снизить или предотвратить антителозависимое усиление (АЗУ) заболевания, связанного с антигеном, но при этом нейтрализовать антиген.

В некоторых вариантах реализации антитело можно модифицировать так, чтобы оно содержало одну или более аминокислотных замен, которые снижают или предотвращают связывание антитела с FcyR1a. Одна или более аминокислотных замен могут присутствовать в константной области антитела. Одна или более аминокислотных замен могут включать замещение остатка лейцина остатком аланина в константной области антитела, т. е. также называемое в данном документе LA, мутацией LA или заменой LA. Одна или более аминокислотных замен могут включать замещение каждого из двух остатков лейцина остатком аланина в константной области антитела, которое также называется в данном документе LALA, мутацией LALA или заменой LALA. Присутствие замен LALA может предотвращать или блокировать связывание антитела с FcyR1a и, таким образом, модифицированное антитело не усиливает заболевание или не вызывает АЗУ заболевания, связанного с антигеном, но при этом нейтрализует антиген.

#### Способ получения синтетического антитела

Настоящее изобретение также относится к способу генерации синтетического антитела. Этот способ может включать введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, применяя способ доставки, более подробно описанный ниже. Соответственно, синтетическое антитело генерируется в организме субъекта или *in vivo* после введения субъекту композиции.

Этот способ также может включать внесение композиции в одну или более клеток и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или вырабатываться в одной или более клетках. Этот способ также может включать внесение композиции в одну или более тканей, например, но без ограничений, кожу и мышцы, и, следовательно, синтетическое антитело может генерироваться или вырабатываться в одной или более тканях.

## Раковый антиген

Композиции и способы по изобретению могут быть использованы в комбинации с вакциной, содержащей антиген, или его фрагмент, или его вариант.

Маркеры представляют собой известные белки, которые присутствуют или стимулируются при встрече с некоторыми раковыми клетками. При помощи методики генерации антигенов, представляющих такие маркеры, таким образом, чтобы нарушить толерантность к самим себе, может быть создана вакцина от рака. Такие вакцины против рака могут содержать ингибиторы контрольных точек для усиления иммунного ответа. Ниже приведены некоторые антигены рака.

### а. hTERT

hTERT представляет собой обратную транскриптазу теломеразы человека, которая синтезирует метку TTAGGG на конце теломеров с целью предотвращения гибели клеток из-за укорачивания хромосом. Гиперпролиферативные клетки с аномально высоким уровнем экспрессии hTERT могут быть мишенями для иммунотерапии. Недавно проведенные исследования демонстрируют, что экспрессия hTERT в дендритных клетках, трансфицированных генами hTERT, может индуцировать цитотоксические Т-клетки CD8<sup>+</sup> и выявлять Т-клетки CD4<sup>+</sup> антиген-специфическим образом.

hTERT можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

### б. Антигены предстательной железы

Ниже представлены антигены, способные вызывать иммунный ответ у млекопитающего против антигена предстательной железы. Консенсусный антиген может содержать эпитопы, которые делают его особенно эффективным, поскольку могут индуцировать иммуногены против клеток рака предстательной железы. Консенсусный антиген предстательной железы может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Антигены предстательной железы могут включать один или более из следующих: антиген PSA, антиген PSMA, антиген STEAP,

антиген PSCA, антиген простатической кислой фосфатазы (PAP) и другие маркеры рака предстательной железы. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам предстательной железы, фрагменты антигенов предстательной железы и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов предстательной железы.

Антигены предстательной железы можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

#### с. WT1

Антиген может представлять собой ген-супрессор опухоли Вильмса 1 (WT1), его фрагмент, его вариант или их комбинацию. WT1 является транскрипционным фактором, содержащим в N-конце богатый пролином/глутамином ДНК-связывающий домен и четыре цинк-пальцевых мотива в C-конце. WT1 играет роль в нормальном развитии уrogenитальной системы и взаимодействует с многочисленными факторами, например, p53, известным опухолевым супрессором, и сериновой протеазой HtrA2, которая расщепляет WT1 в нескольких участках после обработки цитотоксическим препаратом.

Мутация WT1 может приводить к образованию опухоли или рака, например, опухоли Вильмса или опухолей, экспрессирующих WT1. Опухоль Вильмса часто образуется в одной или обеих почках до метастазирования в другие ткани, например, без ограничения, в ткань печени, ткань мочевыводящей системы, лимфатическую ткань и ткань легких. Соответственно, опухоль Вильмса можно считать метастатической опухолью. Опухоль Вильмса, как правило, встречается у детей младшего возраста (например, в возрасте до 5 лет), как в спорадической, так и наследственной форме. Соответственно, данная вакцина может быть использована для лечения субъектов, страдающих опухолью Вильмса. Вакцина также может быть использована для лечения субъектов, страдающих раком или опухолями, которые экспрессируют WT1 для предотвращения развития таких опухолей у субъектов. Антиген WT1 может отличаться от нативного, «нормального» гена WT1, и, таким

образом, обеспечивать терапию или профилактику опухоли, экспрессирующей антиген WT1. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам WT1, фрагменты антигенов WT1 и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов WT1.

Антигены WT1 можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

#### d. Антиген тирозиназа

Антиген тирозиназа (Tyr) является важной мишенью для иммуноопосредованного клиренса посредством индуцирования (1) гуморального иммунитета за счет ответов В-клеток с получением антител, которые блокируют образование моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), тем самым замедляя супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя развитие опухоли; (2) увеличения цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8<sup>+</sup> (CTL), чтобы атаковать и уничтожать опухолевые клетки; (3) увеличения ответов клеток Т-хелперов; (4) и усиления воспалительных реакций за счет IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , или, предпочтительно, всего из упомянутого выше.

Тирозиназа представляет собой медьсодержащий фермент, который встречается в тканях растений и животных. Тирозиназа катализирует образование меланина и других пигментов посредством окисления фенолов, таких как тирозин. При меланоме тирозиназа может стать нерегулируемой, что приводит к повышенному синтезу меланина. У субъектов, страдающих меланомой, тирозиназа также является мишенью цитотоксического Т-клеточного распознавания. Соответственно, тирозиназа может быть антигеном, связанным с меланомой.

Антиген может содержать эпитопы белков, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, на которые могут индуцироваться иммунные ответы к Tyr. Антиген Tyr может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Антиген Tyr может содержать консенсусный белок. Антиген Tyr индуцирует антигенспецифический Т-клеточный и интенсивный гуморальный иммунные ответы, как системно против рака в целом, так и против клеток, связанных с опухолью. Таким образом, вакцины, содержащие консенсусный антиген Tyr, обеспечивают защитный иммунный ответ против образования опухоли. Соответственно, любой пользователь может разработать вакцину по настоящему изобретению с включением антигена Tyr для обеспечения широкого иммунитета против образования опухолей, метастазирования опухолей и роста опухоли. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам Tyr, фрагменты антигенов Tyr и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов Tyr.

Антигены Tyr можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

e. NYES01

NY-ESO-1 представляет собой антиген рака яичка, экспрессируемый при различных видах рака, где он может индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Исследования экспрессии генов продемонстрировали активацию гена NY-ESO-1, STAG1B, при миксоидных и круглоклеточных липосаркомах. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам NYES01, фрагменты антигенов NYES01 и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов NYES01.

Антигены NYES01 можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

f. PRAME

Антиген меланомы, преимущественно экспрессируемый в опухолях (антиген PRAME), представляет собой белок, который у людей кодируется геном PRAME. Этот ген кодирует антиген, который преимущественно экспрессируется в меланомах человека и распознается цитолитическими Т-лимфоцитами. Он не экспрессируется



в нормальных тканях, за исключением ткани яичка. Этот ген также экспрессируется при острых лейкозах. Для этого гена наблюдали пять вариантов транскрипции с альтернативным сплайсингом, кодирующих один и тот же белок. Белки могут содержать последовательности, гомологичные антигенам PRAME, фрагменты антигенов PRAME и белки с последовательностями, гомологичными фрагментам антигенов PRAME.

Антигены PRAME можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

#### г. MAGE

MAGE означает ассоциированный с меланомой антиген и, в частности, ассоциированный с меланомой антиген 4 (MAGEA4). MAGE-A4 экспрессируется в мужских половых клетках и опухолевых клетках различных гистологических типов, таких как карциномы желудочно-кишечного тракта, пищевода и легких. MAGE-A4 связывается с онкобелком ганкирином. Это специфическое связывание MAGE-A4 опосредуется его С-концом. Исследования показали, что экзогенный MAGE-A4 может *in vitro* частично ингибировать независимый от адгезии рост клеток, сверхэкспрессирующих ганкирин, и подавлять образование мигрирующих опухолей из этих клеток у голых мышей. Это ингибирование зависит от связывания между MAGE-A4 и ганкирином, давая основание предполагать, что взаимодействия между ганкирином и MAGE-A4 ингибирует опосредованный ганкирином канцерогенез. Вероятно, экспрессия MAGE в опухолевой ткани является не причиной, а следствием онкогенеза, и гены MAGE принимают участие в иммунном процессе посредством направленного воздействия на ранние опухолевые клетки с целью уничтожения.

Белок ассоциированного с меланомой антигена 4 (MAGEA4) может принимать участие в эмбриональном развитии, а также трансформации и/или прогрессировании опухоли. MAGEA4 обычно экспрессируется в семенниках и плаценте. Тем не менее, MAGEA4 может экспрессироваться во многих различных типах опухолей, например, меланоме, плоскоклеточной карциноме головы и шеи,

карциноме легкого и карциноме молочной железы. Соответственно, MAGEA4 может представлять собой антиген, ассоциированный с различными опухолями.

Антиген MAGEA4 способен индуцировать антигенспецифический Т-клеточный и/или интенсивный гуморальный иммунные ответы, тем самым индуцируя или вызывая иммунный ответ, который направлен или реагирует на рак или опухоль с экспрессией антигена. В некоторых вариантах реализации индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунные ответы. В некоторых вариантах реализации индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ) и/или фактора некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ). В других вариантах реализации индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов супрессии иммунной системы, которые стимулируют развитие опухоли или рака, экспрессирующих антиген, например, без ограничения, факторов, подавляющих презентацию МНС, факторов, активирующих антигенспецифические регуляторные Т-клетки (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- $\beta$ , ассоциированные с опухолью макрофаги, ассоциированные с опухолью фибробласты.

Антиген MAGEA4 может содержать эпитопы белков, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, на которые могут индуцироваться иммунные ответы к MAGEA4. Антиген MAGEA4 может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген MAGEA4 может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую консенсусный антиген MAGEA4, можно оптимизировать в отношении частоты использования кодона и соответствующих РНК-транскриптов. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может быть кодон- и РНК-оптимизированной для экспрессии. В некоторых вариантах реализации последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может содержать

последовательность Козак (например, GCC ACC) для увеличения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может содержать множество стоп-кодонов (например, TGA TGA) для увеличения эффективности терминации трансляции.

Антигены MAGE можно вводить в векторах, описанных в настоящем документе, и комбинировать с ингибиторами контрольных точек в различных схемах вакцинации, включая приведенные в разделе «Примеры» ниже.

#### h. Опухолевый антиген

В контексте настоящего изобретения термин «опухолевый антиген», или «антиген гиперпролиферативного расстройства», или «антиген, связанный с гиперпролиферативным расстройством» относится к антигенам, которые являются обычными для специфических гиперпролиферативных расстройств, таких как рак. Обсуждаемые в настоящем документе антигены приведены лишь в качестве примера. Список не предназначен для того, чтобы быть исключительным, и специалистам в данной области будут очевидны дополнительные примеры.

Опухолевые антигены представляют собой белки, которые продуцируются опухолевыми клетками, вызывающими иммунный ответ, в частности, иммунные ответы, опосредуемые Т-клетками. Выбор антигенсвязывающего фрагмента по изобретению будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области и включают, например, глиома-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA),  $\beta$ -хорионический гонадотропин человека, альфафетопротейн (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, человеческую теломеразную обратную транскриптазу, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, простатический специфический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простейин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломеразу, опухолевый антиген-1 рака предстательной железы (PSTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофил-эластазу, эфринB2, CD22, инсулиноподобный фактор роста (IGF)-I, IGF-II, IGF-I рецептор и мезотелин.

В одном варианте реализации опухолевый антиген содержит один или более раковых антигенных эпитопов, связанных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить в качестве антигенов-мишеней для иммунной атаки. Эти молекулы включают, без ограничений, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназа и GP 100 при меланоме, и простатическая кислая фосфатаза (PAP) и простатический специфический антиген (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени относятся к группе молекул, связанных с трансформацией, таких как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одной группой антигенов-мишеней являются онко-фетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме иммуноглобулин опухолеспецифического идиотипа представляет собой истинный антиген - опухолеспецифический иммуноглобулин, который является уникальным для отдельной опухоли. Антигены В-клеточной дифференциации, такие как CD19, CD20 и CD37 являются другими кандидатами целевых антигенов при В-клеточной лимфоме. Некоторые из этих антигенов (CEA, HER-2, CD19, CD20, идиотип) были использованы в качестве мишеней для пассивной иммунотерапии посредством моноклональных антител с ограниченной эффективностью.

Типом опухолевого антигена, описываемого в настоящем изобретении, может также быть опухолеспецифический антиген (TSA) или опухолеассоциированный антиген (TAA). TSA уникален для опухолевых клеток и не встречается на других клетках в организме. TAA-ассоциированный антиген не является уникальным для опухолевой клетки, вместо этого он также экспрессируется на нормальной клетке в условиях, которые не позволяют индуцировать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоли может происходить в условиях, дающих возможность иммунной системе отвечать на данный антиген. TAA могут представлять собой антигены, экспрессирующиеся на нормальных клетках во время эмбрионального развития, когда иммунная система является незрелой и неспособной реагировать, или они могут представлять собой антигены, в нормальном

состоянии представленные на низких уровнях на нормальных клетках, но экспрессирующихся на намного больших уровнях на опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры антигенов TSA или TAA включают следующие: антигены дифференциации, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические линиенеспецифические антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как СЕА; сверхэкспрессированные онкогены и мутированные гены-супрессоры опухоли, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, полученные в результате хромосомных транслокаций, такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейна - Барр EBVA и антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7. Другие многочисленные антигены на основе белков включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротейн, бета-НСГ, ВСА225, ВТАА, СА 125, СА 15-3\СА 27.29\ВСАА, СА 195, СА 242, СА-50, САМ43, CD68\Р1, СО-029, FGF-5, G250, Ga733\ЕрСАМ, НТgp-175, М344, МА-50, МG7-Аg, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, ТА-90\Mac-2-связывающий белок\циклофилин С-ассоциированный белок, ТААL6, TAG72, TLR и TPS.

Вспомогательные вещества и другие компоненты вакцины

Вакцина может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой функциональные молекулы, такие как молекулы несущей среды, адъювантов, носителей или разбавителей. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой облегчающий трансфекцию агент, который может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИМКОМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и

сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию агенты.

Облегчающий трансфекцию агент представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Облегчающий трансфекцию агент представляет собой поли-L-глутамат, а поли-L-глутамат может присутствовать в вакцине в концентрации менее 6 мг/мл. Облегчающий трансфекцию агент, который также может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИМКМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, и гиалуроновую кислоту, также можно использовать для введения в сочетании с генетической конструкцией. Вакцины на основе ДНК-плазмиды также могут содержать облегчающий трансфекцию агент, такой как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосом (смотрите, например, W09324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные облегчающие трансфекцию агенты. Облегчающий трансфекцию агент представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрация трансфекционного агента в вакцине составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой адъювант, дополняющий антитела-ингибиторы контрольных точек по изобретению. Дополнительным адъювантом могут быть другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде или доставляются в виде белков в комбинации с плазмидой, указанной выше, в вакцине. Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из:  $\alpha$ -интерферона (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -интерферона (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -интерферона, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, эпидермального фактора роста (EGF), кожного

привлекающего Т-клетки хемокина (STACK), эпителиального, экспрессируемого вилочковой железой хемокина (TECK), мукозального эпителиального хемокина (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, включая IL-15, имеющий удаленную сигнальную последовательность и необязательно имеющий сигнальный пептид из IgE. Адъювант может представлять собой IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, PD-1, IL-10, IL-12, IL-18 или их комбинацию.

Другие гены, которые могут использоваться в качестве адъювантов в дополнение к антителам по изобретению, включают гены, кодирующие: MCP-1, MIP-1a, MIP-1p, IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, IL-22, фактор роста нервов, фактор роста сосудистого эндотелия, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены отклика интерферона, NF $\kappa$ B, Вах, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Oх40, Oх40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

Вакцина может дополнительно содержать генетический вспомогательный агент для вакцины, как описано в заявке на патент США № 021,579, поданной 1 апреля 1994 г., содержание которой в полном объеме включено путем ссылки.

Вакцина может быть приготовлена в соответствии с применяемым режимом введения. Инъекционная фармацевтическая композиция вакцины может быть стерильной, апиrogenной и не содержать частиц. Можно использовать изотонический состав или раствор. Добавки для придания изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Вакцина

может содержать сосудосуживающий агент. Изотонические растворы могут включать фосфатно-солевой буфер. Вакцина может дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизаторы могут обеспечивать стабильность состава при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение длительных периодов времени, включая LGS или поликатионы или полианионы.

#### Способ вакцинации

Настоящее изобретение также относится к способу повышения иммунного ответа у субъекта. Повышение иммунного ответа может быть использовано для лечения и/или профилактики заболевания у субъекта. Способ может включать введение описанной в настоящем документе вакцины субъекту. Субъект, которому вводят вакцину, может иметь повышенный или вторичный иммунный ответ по сравнению с субъектом, которому ввели только антиген. В некоторых вариантах реализации иммунный ответ может быть повышен от приблизительно в 0,5 раза до приблизительно в 15 раз, от приблизительно в 0,5 раза до приблизительно в 10 раз или от приблизительно 0,5 раза до приблизительно 8 раз. Альтернативно иммунный ответ у субъекта, которому ввели вакцину, может повыситься по меньшей мере приблизительно в 0,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 6,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 7,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 7,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 8,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 8,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 9,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 9,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 10,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 10,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 11,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 11,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 12,0



раза, по меньшей мере приблизительно 12,5 раза, по меньшей мере приблизительно 13,0 раза, по меньшей мере приблизительно 13,5 раза, по меньшей мере приблизительно 14,0 раза, по меньшей мере приблизительно 14,5 раза, или по меньшей мере приблизительно 15,0 раза.

В других альтернативных вариантах реализации иммунный ответ у субъекта, которому ввели вакцину, может повыситься от приблизительно 50% до приблизительно 1500%, от приблизительно 50% до приблизительно 1000% или от приблизительно 50% до приблизительно 800%. В других вариантах реализации иммунный ответ у субъекта, которому ввели вакцину, может повыситься по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 100%, по меньшей мере приблизительно на 150%, по меньшей мере приблизительно на 200%, по меньшей мере приблизительно на 250%, по меньшей мере приблизительно на 300%, по меньшей мере приблизительно на 350%, по меньшей мере приблизительно на 400%, по меньшей мере приблизительно на 450%, по меньшей мере приблизительно на 500%, по меньшей мере приблизительно на 550%, по меньшей мере приблизительно на 600%, по меньшей мере приблизительно на 650%, по меньшей мере приблизительно на 700%, по меньшей мере приблизительно на 750%, по меньшей мере приблизительно на 800%, по меньшей мере приблизительно на 850%, по меньшей мере приблизительно на 900%, по меньшей мере приблизительно на 950%, по меньшей мере приблизительно на 1000%, по меньшей мере приблизительно на 1050%, по меньшей мере приблизительно на 1100%, по меньшей мере приблизительно на 1150%, по меньшей мере приблизительно на 1200%, по меньшей мере приблизительно на 1250%, по меньшей мере приблизительно на 1300%, по меньшей мере приблизительно на 1350%, по меньшей мере приблизительно на 1450% или по меньшей мере приблизительно на 1500%.

Доза вакцины может составлять от 1 мкг до 10 мг активного компонента/кг массы тела/время и может составлять от 20 мкг до 10 мг компонента/кг массы тела/время. Вакцину можно вводить каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31

дня. Число доз вакцины для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

#### Введение

Композиция по изобретению может быть приготовлена в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Такие композиции можно вводить в дозах и способами, хорошо известными специалистам в области медицины, с учетом таких факторов, как возраст, пол, масса тела и состояние конкретного субъекта, а также путь введения. Субъект может представлять собой млекопитающее, такое как человек, лошадь, корова, свинья, овца, кошка, собака, крыса или мышь.

Композицию по изобретению можно вводить профилактически или терапевтически. При профилактическом введении вакцины можно вводить в количестве, достаточном для индуцирования иммунного ответа. При терапевтических применениях композиции по изобретению вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать терапевтический эффект. Количество, достаточное для достижения этой цели, определяется как «терапевтически эффективная доза». Количества, эффективные для такого применения, будут зависеть, например, от конкретной композиции и схемы введения вакцины, способа введения, стадии и степени тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента и решения назначающего врача.

Композицию по изобретению можно вводить способами, хорошо известными в данной области, как описано в публикациях Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner et al. (патент США № 5,580,859, выданный 3 декабря 1996 г.); Felgner (патент США № 5,703,055, выданный 30 декабря 1997 г.); и Carson et al. (патент США № 5,679,647, выданный 21 октября 1997 г.), содержание всех из них включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. ДНК в композиции по изобретению может быть скомбинирована с частицами или гранулами, которые можно вводить индивидууму, например, с использованием вакцинного пистолета. Специалист в данной области должен знать, что выбор фармацевтически приемлемого носителя, включая физиологически

приемлемое соединение, зависит, например, от пути введения экспрессирующего вектора.

Композиция по изобретению может быть доставлена разными путями. Типичные пути доставки включают парентеральное введение, например, внутрикожную, внутримышечную или подкожную доставку. Другие пути включают пероральное введение, интраназальный и интравагинальный пути. Для ДНК в композиции по изобретению, в частности, композицию можно доставлять в интерстициальные пространства тканей индивидуума (Felgner et al., патенты США №№ 5,580,859 и 5,703,055, содержание всех из них включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Композицию можно также вводить в мышцу или вводить путем внутрикожной или подкожной инъекций, или трансдермально, например, с помощью ионтофореза. Также можно использовать эпидермальное введение композиции. Эпидермальное введение может включать механическое или химическое раздражение внешнего слоя эпидермиса для стимуляции иммунного ответа на раздражитель (Carson et al., патент США № 5,679,647, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Композицию по изобретению можно также приготовить для введения через носовые ходы. Составы, подходящие для назального введения, в которых носитель представляет собой твердое вещество, могут включать грубый порошок, имеющий размер частиц, например, в диапазоне от около 10 до около 500 микрон, и вводятся таким образом, при котором осуществляется вдыхание через нос, т. е. посредством быстрой ингаляции через носовой проход из контейнера с порошком, поднесенного близко к носу. Состав может представлять собой назальный спрей, капли для носа или препарат для аэрозольного введения с помощью распылителя. Состав может включать водные или масляные растворы вакцины.

Композиция по изобретению может представлять собой жидкий препарат, такой как суспензия, сироп или эликсир. Композиция по изобретению также может представлять собой препарат для парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного или внутривенного введения (например, для инъекционного введения), такой как стерильная суспензия или эмульсия.

Композиция по изобретению может быть включена в липосомы, микросферы или другие полимерные матрицы (Felgner et al., патент США No. 5,703,055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. Ito III (2nd ed. 1993), содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Липосомы могут состоять из фосфолипидов или других липидов и могут быть нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в приготовлении и введении.

Композицию по изобретению можно вводить путем электропорации, например, с помощью способа, описанного в патенте США № 7,664,545, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Электропорацию можно выполнять посредством способа и/или устройства, описанного в патентах США №№ 6,302,874; 5,676,646; 6,241,701; 6,233,482; 6,216,034; 6,208,893; 6,192,270; 6,181,964; 6,150,148; 6,120,493; 6,096,020; 6,068,650 и 5,702,359, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Электропорацию можно осуществлять с помощью малоинвазивного устройства.

Малоинвазивное устройство (МИУ) для электропорации может представлять собой устройство для инъекции описанной выше вакцины и связанной с ней жидкости в ткани тела. Устройство может содержать полую иглу, кассету ДНК и средство для доставки жидкости, причем устройство приспособлено для приведения в действие средства для доставки жидкости при одновременном (например, автоматическом) введении ДНК в ткань тела во время введения иглы в указанную ткань тела. Это имеет преимущество возможности постепенного введения ДНК и связанной с ней жидкости при введении иглы, что приводит к более равномерному распределению жидкости в ткани тела. Благодаря распределению ДНК, вводимой в большую область, может быть уменьшена боль, испытываемая во время инъекции.

МИУ может вводить вакцину в ткань без использования иглы. МИУ может вводить вакцину в виде небольшого потока или струи с такой силой, что вакцина проникает через поверхность ткани и

входит в нижележащую ткань и/или мышцу. Усилие позади небольшого потока или струи может быть обеспечено посредством расширения сжатого газа, такого как диоксид углерода, через микротоверстие в течение доли секунды. Примеры малоинвазивных устройств для электропорации и способы их использования описаны в опубликованной заявке на патент США № 20080234655; патенте США № 6,520,950; патенте США № 7,171,264; патенте США № 6,208,893; патенте США № 6,009,347; патенте США № 6,120,493; патенте США № 7,245,963; патенте США № 7,328,064; и патенте США № 6,763,264, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

МИУ может содержать инжектор, который создает высокоскоростную струю жидкости, которая безболезненно проникает через ткань. Такие безыгольные инжекторы доступны в продаже. Примеры безыгольных инжекторов, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают те, которые описаны в патентах США №№ 3,805,783; 4,447,223; 5,505,697; и 4,342,310, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Желаемая композиция по изобретению в форме, подходящей для прямого или непрямого электротранспорта, может быть введена (например, посредством инъекции) с использованием безыгольного инжектора в подлежащую лечению ткань, обычно путем приведения в контакт поверхности ткани с инжектором так, чтобы привести в действие доставку струи агента с достаточной силой, чтобы вызвать проникновение вакцины в ткань. Например, если подлежащая лечению ткань представляет собой слизистую оболочку, кожу или мышцу, агент прижимают к поверхности слизистой оболочки или кожи с достаточной силой, чтобы вызвать проникновение агента через роговой слой и в слои дермы или в нижележащую ткань и мышцы, соответственно.

Безыгольные инжекторы хорошо подходят для доставки вакцин во все типы тканей, особенно в кожу и слизистую оболочку. В некоторых вариантах реализации безыгольный инжектор может использоваться для продвижения жидкости, содержащей вакцину, на поверхность и в кожу или слизистую субъекта. Типичные примеры

различных типов тканей, которые можно лечить с использованием способов по изобретению, включают поджелудочную железу, гортань, носоглотку, гортанную часть глотки, ротоглотку, губу, горло, легкие, сердце, почку, мышцы, молочную железу, толстую кишку, предстательную железу, вилочковую железу, яички, кожу, слизистую оболочку, яичники, кровеносные сосуды или любую их комбинацию.

МИУ может иметь игольчатые электроды для электропорации ткани. Путем подачи импульсов между множеством пар электродов в матрице из множества электродов, например, созданной с прямоугольными или квадратными схемами, обеспечивается улучшенный результат по сравнению с подачей импульсов между парой электродов. Например, в патенте США № 5,702,359, озаглавленном «Needle Electrodes for Mediated Delivery of Drugs and Genes» описана матрица из игл, в которой во время терапевтического лечения импульсы могут подаваться на множество пар игл. В этой заявке, которая включена в настоящее описание посредством ссылки, как если бы она была изложена полностью, иглы были расположены в круговой матрице, но имели соединители и переключающее устройство, обеспечивающие подачу импульсов между противоположными парами игольчатых электродов. Можно использовать пару игольчатых электродов для доставки рекомбинантных векторов экспрессии в клетки. Такое устройство и система описаны в патенте США № 6,763,264, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы можно использовать одноигльное устройство, которое позволяет вводить инъекцию ДНК и проводить электропорацию с помощью одной иглы, напоминающей обычную иглу для инъекции, и применять импульсы с более низким напряжением, чем те, которые применяются в используемых в настоящее время устройствах, тем самым уменьшая ощущение электротока, испытываемое пациентом.

МИУ может содержать одну или более электродных матриц. Матрицы могут содержать две или более игл одинакового диаметра или разных диаметров. Иглы могут быть равномерно или неравномерно разнесены на расстоянии друг от друга. Размер игл может составлять от 0,005 дюйма до 0,03 дюйма, от 0,01 дюйма до 0,025 дюйма; или от 0,015 дюйма до 0,020 дюйма. Диаметр иглы

может составлять 0,0175 дюйма. Иглы могут быть разнесены на расстоянии 0,5 мм, 1,0 мм, 1,5 мм, 2,0 мм, 2,5 мм, 3,0 мм, 3,5 мм, 4,0 мм или больше друг от друга.

МИУ может состоять из генератора импульсов и двух- или более-игольных инжекторов для вакцины, которые доставляют вакцину и импульсы электропорации за один этап. Генератор импульсов может обеспечивать гибкое программирование параметров импульсов и инъекции с помощью персонального компьютера, управляемого с флэш-карты, а также полную запись и хранение данных об электропорации и о пациентах. Генератор импульсов может подавать импульсы различного напряжения (вольт) в течение коротких промежутков времени. Например, генератор импульсов может подавать три 15-вольтных импульса длительностью 100 мс. Примером такого МИУ является система Elgen 1000 производства компании Inovio Biomedical Corporation, описанная в патенте США № 7,328,064, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

МИУ может представлять собой устройство и систему CELLECTRA (Inovio Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA), которые представляют собой модульную систему электродов, облегчающую введение макромолекулы, такой как ДНК, в клетки выбранной ткани в теле или в растении. Модульная система электродов может содержать некоторое количество игольчатых электродов; гиподермическую иглу; электрический соединитель, который обеспечивает проводящее соединение программируемого импульсного контроллера постоянного тока с некоторым количеством игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может брать некоторое количество игольчатых электродов, которые находятся на опорной конструкции и плотно вставлять их в выбранную ткань в организме или растении. Затем происходит доставка макромолекул в выбранную ткань через гиподермическую иглу. Происходит активация программируемого импульсного контроллера постоянного тока и применение электрического импульса постоянного тока к некоторому количеству игольчатых электродов. Применяемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение макромолекулы в клетку между множеством электродов. Гибель клеток из-за

перегрева сводится к минимуму посредством ограничения рассеивания мощности в ткани за счет импульсов постоянного тока. Устройство и система Celectra описаны в патенте США № 7,245,963, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

МИУ может представлять собой систему Elgen 1000 (Inovio Pharmaceuticals). Система Elgen 1000 может содержать устройство, которое имеет полую иглу и средство для доставки жидкости, причем устройство приспособлено для приведения в действие средства для доставки жидкости при одновременном (например, автоматическом) введении инъекции жидкости и находящейся в ней вакцины в ткань тела во время введения иглы в указанную ткань тела. Преимущество заключается в возможности постепенного введения жидкости при введении иглы, что приводит к более равномерному распределению жидкости в ткани тела. Считается, что благодаря распределению объема жидкости, вводимой в большую область, уменьшается испытываемая во время инъекции боль.

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

Следует понимать, что скорость инъекции может быть либо линейной, либо нелинейной, и что инъекция может быть выполнена после введения игл через кожу субъекта, подлежащего лечению, и во время их дальнейшего введения в ткань тела.

Подходящие ткани, в которые можно вводить инъекцию жидкости с помощью устройства по настоящему изобретению, включают опухолевую ткань, ткань кожи или печени, но это может быть и мышечная ткань.

Устройство дополнительно содержит средство для введения иглы для направления введения иглы в ткань тела. Скорость инъекционного введения жидкости контролируется скоростью введения иглы. Преимущество этого заключается в том, что как введение иглы, так и инъекция жидкости может контролироваться таким образом, что скорость введения иглы может быть, при необходимости, согласована со скоростью введения инъекции. Это



также облегчает пользователю управление устройством. При желании можно предусмотреть средство автоматического введения иглы в ткань тела.

Пользователь может выбрать время начала инъекции жидкости. В идеале, однако, инъекция начинается, когда кончик иглы достигает мышечной ткани, причем устройство может включать в себя средство для восприятия, распознающее момент, когда игла была вставлена на достаточную глубину для начала введения жидкости. Это означает, что инъекция жидкости может быть начата автоматически после достижения иглой желаемой глубины (которая обычно будет глубиной, на которой начинается залегание мышечной ткани). Глубина, на которой начинается залегание мышечной ткани, может быть, например, принята за заданную глубину вставки иглы, такую как величина 4 мм, которая будет считаться достаточной для прохождения иглы через слой кожи.

Средство восприятия может содержать ультразвуковой зонд. Средство восприятия может содержать средство для распознавания изменения импеданса или сопротивления. В этом случае средства могут не быть предназначены для регистрации глубины иглы в ткани тела, но скорее могут быть приспособлены для восприятия изменения импеданса или сопротивления по мере перемещения иглы из ткани тела другого типа в мышцу. Любой из этих альтернативных вариантов обеспечивает относительно точные и простые в эксплуатации средства восприятия возможности начать инъекцию. Глубина введения иглы при желании может быть дополнительно зарегистрирована и может быть использована для управления инъекцией жидкости так, что объем вводимой жидкости определяется при регистрации глубины введения иглы.

Устройство может дополнительно содержать: основание для поддержки иглы; и корпус для приема в нем основания, причем основание выполнено с возможностью перемещения относительно корпуса таким образом, что игла втягивается внутрь корпуса, когда основание находится в первом заднем положении относительно корпуса, и при этом игла выступает из корпуса, когда основание находится во втором переднем положении внутри корпуса. Это является преимуществом для пользователя, поскольку корпус может

быть выровнен на коже пациента, после чего посредством перемещения корпуса относительно основания в кожу пациента могут быть введены иглы.

Как указано выше, желательно достичь контролируемой скорости инъекции жидкости, чтобы при введении иглы в кожу жидкость равномерно распределялась по длине иглы. Средство доставки жидкости может содержать средство привода поршня, выполненное с возможностью введения инъекции жидкости с контролируемой скоростью. Средство привода поршня может быть активировано, например, сервомотором. Однако средство привода поршня может приводиться в действие посредством перемещения основания в осевом направлении относительно корпуса. Следует понимать, что могут быть предусмотрены альтернативные способы доставки жидкости. Таким образом, например, вместо шприца и поршневой системы может быть предусмотрен закрытый контейнер, который может быть сжат для подачи жидкости с контролируемой или неконтролируемой скоростью.

Устройство, описанное выше, может быть использовано для любого типа инъекции. Однако представляется, что оно особенно подходит для использования в области электропорации, и поэтому может дополнительно содержать средство для приложения к игле напряжения. Это позволяет использовать иглу не только для инъекций, но и в качестве электрода во время проведения электропорации. Это обеспечивает особенное преимущество, поскольку означает, что электрическое поле прикладывается к той же области, в которую вводят жидкость. Традиционно проведение электропорации являлось проблемой из-за того, что очень сложно точно выровнять электрод с предварительно введенной жидкостью, и поэтому пользователь стремится ввести больший объем жидкости, чем требуется, и в большую область, и приложить электрическое поле над большей площадью, чтобы попытаться гарантировать перекрытие между введенным веществом и электрическим полем. Используя настоящее изобретение, как объем вводимой жидкости, так и размер приложенного электрического поля могут быть уменьшены при достижении хорошего соответствия между электрическим полем и жидкостью.

## Терапия рака

В изобретении предложены способы лечения или предотвращения рака или лечения или предотвращения метастазирования опухолей. Связанные аспекты изобретения обеспечивают способы предотвращения, оказания помощи в предотвращении и/или уменьшения метастазирования гиперпластических или опухолевых клеток у индивидуума.

В одном аспекте изобретения предложен способ ингибирования метастазов у нуждающегося в этом индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества композиции по изобретению. В изобретении дополнительно предложен способ ингибирования метастазов у нуждающегося в этом индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного для ингибирования метастазов количества любой одной из описанных в настоящем документе композиций.

В некоторых вариантах реализации лечения или предотвращения рака или лечения или предотвращения метастазирования опухолей у нуждающегося в этом индивидуума, индивидууму вводят второй агент, такой как противоопухолевый агент. В некоторых вариантах реализации второй агент содержит второй ингибирующий метастазирование агент, такой как антагонист плазминогена или антагонист аденозиндезаминазы. В других вариантах реализации второй агент представляет собой ингибитор ангиогенеза.

Композиции по изобретению можно использовать для предотвращения, ослабления, минимизации, контроля и/или уменьшения рака у людей и животных. Композиции по изобретению можно также использовать для замедления скорости роста первичной опухоли. Композиции по изобретению при введении субъекту, нуждающемуся в лечении, могут использоваться для остановки распространения раковых клеток. Таким образом, композиции по изобретению можно вводить как часть комбинированной терапии одним или более лекарственными средствами или другими фармацевтическими агентами. При использовании как части комбинированной терапии снижение метастазирования и снижение роста первичной опухоли, обеспечиваемое композициями по изобретению, позволяет более рационально и эффективно

использовать любую фармацевтическую или лекарственную терапию, используемую для лечения пациента. Кроме того, контроль метастазирования посредством применения композиций по изобретению дает субъекту большую способность концентрации заболевание в одном местоположении.

В одном варианте реализации в изобретении предложены способы предотвращения метастазов злокачественных опухолей или других злокачественных клеток, а также снижения скорости роста опухоли. Способы включают введение эффективного количества одной или более композиций по изобретению субъекту, у которого диагностировано наличие злокачественной опухоли или раковых клеток, или субъекту, имеющему опухоль или раковые клетки.

Ниже приведены неограничивающие примеры онкологических заболеваний, которые можно лечить способами и композициями по изобретению: острый лимфобластный лейкоз; острый миелоидный лейкоз; аденокарцинома; аденокарцинома у детей; рак червеобразного отростка; базально-клеточная карцинома; внепеченочный рак желчного протока; рак мочевого пузыря; рак костей, остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома; глиома ствола головного мозга у детей; опухоль головного мозга у взрослых; опухоль головного мозга, глиома ствола головного мозга у детей; опухоль головного мозга, атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль центральной нервной системы у детей; эмбриональные опухоли центральной нервной системы; астроциты мозжечка; астроциты головного мозга/злокачественная глиома; краниофарингиома; эпендимобластома; эпендимома; медуллобластома; медуллоэпителиома; паренхиматозные опухоли шишковидной железы с промежуточной дифференцировкой; супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластома; глиома зрительного тракта и гипоталамуса; опухоли головного мозга и спинного мозга; рак молочной железы; бронхиальные опухоли; лимфома Беркитта; карциноидная опухоль; карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта; атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль центральной нервной системы; эмбриональные опухоли центральной нервной системы; лимфома центральной нервной системы; астроциты

мозжечка, астроцитомы головного мозга/злокачественная глиома детского возраста; рак шейки матки; хордома детского возраста; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелоидный лейкоз; хронические миелопролиферативные расстройства; рак толстой кишки; колоректальный рак; краниофарингиома; Т-клеточная лимфома кожи; рак пищевода; опухоли семейства саркомы Юинга; экстрагонададная опухоль из зародышевых клеток; внепеченочный рак желчных протоков; рак глаза, внутриглазная меланома; рак глаза, ретинобластома; рак желчного пузыря; гастральный рак (рак желудка); желудочно-кишечная карциноидная опухоль; желудочно-кишечная стромальная опухоль (GIST); внечерепная опухоль из зародышевых клеток; экстрагонададная опухоль из зародышевых клеток; опухоли яичников из зародышевых клеток; гестационная трофобластная опухоль; глиома; глиома ствола головного мозга детского возраста; глиома, астроцитомы мозжечка детского возраста; глиома зрительного тракта и гипоталамуса детского возраста; волосатоклеточный лейкоз; рак головы и шеи; гепатоцеллюлярный рак (печени); гистиоцитоз клеток Лангерганса; лимфома Ходжкина; гипофарингеальный рак; глиома зрительного тракта и гипоталамуса; внутриглазная меланома; опухоли островковых клеток поджелудочной железы; почечно-клеточный рак (почки); гистиоцитоз клеток Лангерганса; рак гортани; острый лимфобластный лейкоз; острый миелоидный лейкоз; хронический лимфоцитарный лейкоз; хронический миелолейкоз; волосатоклеточный лейкоз; рак губ и ротовой полости; рак печени; немелкоклеточный рак легких; мелкоклеточный рак легких; лимфома, связанная со СПИД; лимфома Беркитта; Т-клеточная лимфома кожи; лимфома Ходжкина; неходжкинская лимфома; первичная лимфома центральной нервной системы; макроглобулинемия Вальденстрема; злокачественная фиброзная гистиоцитомы костей и остеосаркома; медуллобластома; меланома; внутриглазная меланома (глаза); карцинома из клеток Меркеля; мезотелиома; метастатический плоскоклеточный рак шеи с невыявленной первичной опухолью; рак ротовой полости; множественный эндокринный неопластический синдром (детского возраста); множественная миелома/плазмноклеточная опухоль; грибовидный микоз;

миелодиспластические синдромы;  
миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания;  
хронический миелоидный лейкоз; острый миелоидный лейкоз  
взрослых; острый миелоидный лейкоз детского возраста;  
множественная миелома; хронические миелопролиферативные  
расстройства; рак носовой полости и придаточных пазух носа;  
назофарингеальный рак; нейробластома; немелкоклеточный рак  
легких; рак рта; рак ротовой полости; орофарингеальный рак;  
остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома костей;  
рак яичников; эпителиальный рак яичников; опухоль яичников из  
зародышевых клеток; опухоль яичников с низким потенциалом  
злокачественности; рак поджелудочной железы; рак поджелудочной  
железы с опухолью из островковых клеток; папилломатоз; рак  
паращитовидной железы; паренхиматозные опухоли шишковидной  
железы с промежуточной дифференцировкой; пинеобластома и  
супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли;  
опухоль гипофиза; плазмноклеточная опухоль/множественная миелома;  
плеврорлегочная бластома, первичная лимфома центральной нервной  
системы; рак предстательной железы; рак прямой кишки; почечно-  
клеточный рак (почки); переходноклеточный рак почечной лоханки и  
уретры; карцинома респираторного тракта с вовлечением гена NUT  
на хромосоме 15; ретинобластома; рабдомиосаркома; рак слюнной  
железы; саркома, опухоли семейства саркомы Юинга, саркома  
Капоши; саркома мягких тканей; саркома матки; синдром Сезари;  
рак кожи (немеланомный); рак кожи (меланома); карцинома кожи из  
клеток Меркеля; мелкоклеточный рак легких; рак тонкого  
кишечника; саркома мягких тканей; плоскоклеточная карцинома,  
метастатический плоскоклеточный рак шеи с невыявленной первичной  
опухолью; рак желудка (гастральный); супратенториальные  
примитивные нейроэктодермальные опухоли; Т-клеточная лимфома  
кожи; рак яичек; рак горла; тимомы и карцинома тимуса; рак  
щитовидной железы; переходноклеточный рак почечной лоханки и  
уретры; гестационная трофобластная опухоль; рак уретры; рак  
эндометрия матки; саркома матки; вагинальный рак; рак вульвы;  
макроглобулинемия Вальденстрема; и опухоли Вильмса.

В одном варианте реализации в изобретении предложен способ

лечения метастазирования рака, включающий лечение субъекта перед, одновременно с или после лечения композицией по изобретению, с применением дополнительной терапии для лечения рака, такой как хирургическое вмешательство, химиотерапия, химиотерапевтический препарат, лучевая терапия или гормональная терапия или их комбинация.

Химиотерапевтические агенты включают цитотоксические агенты (например, 5-фторурацил, цисплатин, карбоплатин, метотрексат, даунорубицин, доксорубицин, винкристин, винбластин, оксорубицин, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), цитарабин USP, циклофосфамид, эстрамуцин фосфат натрия, альтретамин, гидроксимочевина, ифосфамид, прокарбазин, митомицин, бусульфан, циклофосфамид, митоксантрон, карбоплатин, цисплатин, рекомбинантный интерферон альфа-2а, паклитаксел, тенипозид и стрептозоци), цитотоксические алкилирующие агенты (например, бусульфан, хлорамбуцил, циклофосфамид, мелфалан или этилсульфоновая кислота), алкилирующие агенты (например, азапи, AZQ, BCNU, бусульфан, бисульфан, карбоксифталатоплатина, CBDCA, CCNU, CNIP, хлорамбуцил, хлорозотоцин, цис-платина, кломесон, цианоморфолинодоксорубицин, циклодизон, циклофосфамид, диангидрогалактит, фтордопан, гепсульфам, гикантон, ифосфамид, мелфалан, метил CCNU, митомицин С, митозоламид, хлорметин, PCNU, пиперазин, пиперазиндион, пипоброман, порфирамицин, гормон спироустин, тероксирон, тетраплатин, тиотепа, триэтиленмеламин, урамустин и Йоши-864), антимитотические агенты (например, аллоколхицин, галихондрин М, колхицин, производные колхицина, доластатин 10, майтанзин, ризоксин, производные паклитаксела, паклитаксел, тиоколхицин, тритилцистеин, винбластин сульфат и винкристин сульфат), растительные алкалоиды (например, актиномицин D, блеомицин, L-аспарагиназа, идарубицин, винбластин сульфат, винкристина сульфат, митрамицин, митомицин, даунорубицин, VP-16-213, VM-26, навелбин и таксотер), биопрепараты (например, альфа-интерферон, ВЦЖ, G-CSF, GM-CSF и интерлейкин-2), ингибиторы топоизомеразы I (например, камптотецин, производные камптотецина и морфолинодоксорубицин), ингибиторы топоизомеразы II (например, митоксантрон, амонафид,

м-АМСА, производные антрапиразола, пиразолоакридин, бисантрен HCL, даунорубицин, дезоксидоксорубицин, меногарил, N, N-дибензил дауномицин, оксантазол, рубидазон, VM-26 и VP-16) и синтетические препараты (например, гидроксимочевина, прокарбазин, ортопара ДДД, дакарбазин, CCNU, BCNU, цис-диаминдихлороплатинун, митоксантрон, CBDCA, левамизол, гексаметилмеламин, полностью транс-ретиноевая кислота, глиадель и порфирин натрия).

Антипролиферативные агенты представляют собой соединения, которые уменьшают пролиферацию клеток. Антипролиферативные агенты включают алкилирующие агенты, антиметаболиты, ферменты, модификаторы биологического ответа, различные агенты, гормоны и антагонисты, ингибиторы андрогенов (например, флутамид и ацетат лейпролида), антиэстрогены (например, цитрат тамоксифена и его аналоги, торемифен, дролоксифен и ролоксифен). Дополнительные примеры специфических антипролиферативных агентов включают, но не ограничиваются ими, левамизол, нитрат галлия, гранисетрон, сарграмостим хлорид стронция-89, филграстим, пилокарпин, дексразоксан и ондансетрон.

Соединения по изобретению можно вводить самостоятельно или в комбинации с другими противоопухолевыми агентами, включая цитотоксические/antineoplastические агенты и антиангиогенные средства. Цитотоксические/antineoplastические агенты определяют как агенты, которые атакуют и убивают раковые клетки. Некоторые цитотоксические/antineoplastические агенты представляют собой алкилирующие агенты, которые алкилируют генетический материал в опухолевых клетках, например, цисплатин, циклофосфамид, азотистый иприт, триметилентиофосфорамида, кармустин, бусульфан, хлорамбуцил, белустин, урамустин, кломафазин и дакарбазин. Другие цитотоксические/antineoplastические агенты представляют собой антиметаболиты для опухолевых клеток, например, цитозинарабинозид, фторурацил, метотрексат, меркаптопурин, азатиоприм и прокарбазин. Другие цитотоксические/antineoplastические агенты представляют собой антибиотики, например, доксорубицин, блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, митрамицин, митомицин, митомицин С и дауномицин.



Существуют многочисленные липосомальные составы, коммерчески доступные для данных соединений. Еще другие цитотоксические/противоопухолевые агенты представляют собой ингибиторы митоза (алкалоиды барвинка). К ним относятся винкристин, винбластин и этопозид. Другие цитотоксические/противоопухолевые агенты включают таксол и его производные, L-аспарагиназу, противоопухолевые антитела, дакарбазин, азацитидин, амсакрин, мелфалан, VM-26, ифосфамид, митоксантрон и виндезин.

Антиангиогенные агенты хорошо известны специалистам в данной области. Подходящие антиангиогенные агенты для использования в способах и композициях по изобретению включают антитела к VEGF, включая гуманизированные и химерные антитела, аптамеры против VEGF и антисмысловые олигонуклеотиды. Другие известные ингибиторы ангиогенеза включают ангиостатин, эндостатин, интерфероны, интерлейкин 1 (включая альфа и бета), интерлейкин 12, ретиноевую кислоту и тканевые ингибиторы металлопротеиназы-1 и -2. (TIMP-1 и -2). Также могут быть использованы малые молекулы, включая топоизомеразы, такие как разоксан, ингибитор топоизомеразы II с антиангиогенной активностью.

Другие противораковые агенты, которые могут использоваться в комбинации с композициями по изобретению, включают, но не ограничиваются перечисленным: ацивирин; акларубицин; акодазола гидрохлорид; акронин; адозелезин; алдеслейкин; альтретамин; амбомицин; аметантрона ацетат; аминоклотеимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназу; асперлин; азацитидин; азетепа; азотомидин; батимастат; бензодепа; бикалутаид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропинимин; бусульфан; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубицина гидрохлорид; карзелезин; цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; криснатола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормаплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазиквон; доцетаксел;



вертепорфин; винбластин сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндезина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлейпрозина сульфат; винорелбина тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностатин; зорубицина гидрохлорид. Другие противораковые лекарства включают, но не ограничиваются ими: 20-эпи-1,25 дигидроксивитамин D3; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубицин; ацилфульвен; адеципенол; адозелезин; алдеслейкин; антагонисты ОЛЛ-ТК; альтретамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновая кислота; амрубицин; амсакрин; анагрелид; анастрозол; андрографолид; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; анти-дорсализующий морфогенетический белок-1; антиандроген, простатическая карцинома; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; глицинат афидиколина; модуляторы гена апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновая кислота; ара-CDP-DL-PTBA; аргининдезаминаза; азулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азасетрон; азатоксин; азатирозин; производные баккатина III; баланол; батимаSTAT; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; производные бета-лактама; бета-алетин; бетакламицин В; бетулиновая кислота; ингибитор bFGF; бикалутаамид; бизантрен; бисазиридининспермин; биснафид; бистратен А; бизелезин; брефлат; бропиримин; будотитан; бутионина сульфоксимин; кальципотриол; кальфостин С; производные камптотецина; канарипокс IL-2 капецитабин; карбоксамид-амино-триазол; карбоксиамидотриазол; CaRest M3; CARN 700; ингибитор, получаемый из хряща; карзелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин В; цетрореликс; хлорины; хлорохиноксалинсульфонамид; цикапрост; цис-порфирин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмицин А; коллисмицин В; комбретастатин А4; аналог комбретастатина; конагенин; крамбесцидин 816; криснатол; криптофицин 8; производные криптофицина А; курацин А; циклопентантрахинона; циклоплатам; ципемидин; цитарабина оксфосфат; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин В; деслорелин; дексаметазон; дексифосфамид; дексразоксан;

дексверапамил; диазиквон; дидемнин В; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азацитидин; дигидротаксол, 9-; диоксамицин; дифенилспиромустин; доцетаксел; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицин SA; эбселен; экомустин; эдельфозин; эдреколомаб; эфлорнитин; элемен; эмитефур; эпирубицин; эпристерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогенов; этанидазол; этопозидфосфат; экземестан; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; финастерид; флавопиридол; флезеластин; флуастерон; флюдарабин; гидрохлорид фтордауноруницина; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; тексафирин гадолиния; нитрат галлия; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; херегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперидин; ибандроновая кислота; идаруцибин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазоакридоны; имиквимод; иммуностимулирующие пептиды; инсулиноподобный ингибитор фактора роста-1; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; йобенгуан; йододоксорубицин; ипомеанол, 4-; ироплакт; ирсогладин; изобенгазол; изогомоаликондрин В; итазетрон; джасплакинолид; кахалалид F; ламелларин-N триацетат; ланреотид; лейнамицин; ленограстим; лантинан сульфат; лептолстатин; летрозол; ингибирующий лейкоз фактор; альфа-интерферон лейкоцитов; лейпролид+эстроген+прогестерон; лейпрорелин; левамизол; лиарозол; линейный полиаминовый аналог; липофильный дисахаридный пептид; липофильные соединения платины; лиссоклинамид 7; лобаплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; ловастатин; локсорибин; луртотекан; лютеций тексафирин; лизофил; литические пептиды; майтанзин; манностатин А; маримастат; мазопрокол; маспин; ингибиторы матрилизина; матричные ингибиторы металлопротеиназы; меногарил; мербарон; метерелин; метиониназа; метоклопрамид; ингибитор MIF; мифепристон; мильтефозин; миримостим; несовпадающая двухцепочечная РНК; митогуазон; митолактол; аналоги митомицина; митонафид; митотоксиновый фактор роста фибробластов сапорин; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональное антитело, человеческий хорионический гонадотропин; монофосфорильный липид

А+стрептокиназа клеточной оболочки микобактерии; мопидамол; ингибитор гена множественной устойчивости к лекарственным препаратам; терапия, основанная на применении супрессора множества опухолей-1; противоопухолевое средство иприт; микапероксид В; экстракт микобактериальной клеточной стенки; мириапорон; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновая кислота; нейтральная эндопептидаза; нилютамид; низамицин; модуляторы оксида азота; нитроксидный антиоксидант; нитруллин; Об-бензилгуанин; октреотид; окиценон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; пероральный индуцирующий фактор цитокинов; ормаплатин; озатерон; оксалиплатин; оксауномицин; паклитаксел; аналоги паклитаксела; производные паклитаксела; палауамин; пальмитоилтризоксин; памидроновая кислота; панакситроил; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргаз; пелдезин; пентозанполисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплексы платины; соединения платины; комплекс платина-триамин; порфимер натрия; порфиномицин; преднизон; пропил-бис-акридон; простагландин J2; ингибиторы протеасомы; иммунный модулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроводоросли; ингибиторы белковой тирозинфосфатазы; ингибитор пурин-нуклеозидфосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; пиридокселированный конъюгат полиоксиэтилена и гемоглобина; антагонисты raf; ралтитрексед; рамосетрон; ингибитор фарнезил-протеинтрансферазы ras; ингибиторы ras; ингибитор ras-GAP; ретеллиптин деметилированный; этидронат рения Re 186; ризоксин; рибозимы; ретинамид RII; роглетимид; рогитукин; ромуртид; рохинимекс; рубигинон В1; рубоксил; сафингол; саинтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; семустин; ингибитор 1, получаемый при старении; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы передачи

сигналов; модуляторы передачи сигналов; одноцепочечный антигенсвязывающий белок; сизофуран; собузоксан; борокапнат натрия; фенилацетат натрия; солверол; соматомедин связывающий белок; сонермин; спарфозиновая кислота; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингибитор стволовых клеток; ингибиторы деления стволовых клеток; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; антагонист суперактивного вазоактивного интестинального пептида; сурадиста; сурамин; свайнсонин; синтетические гликозаминогликаны; таллимустин; метиодид тамоксифена; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур; теллурапирилий; ингибиторы теломеразы; темопорфин; темозоломид; тенипозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбopoэтин; миметик тромбopoэтина; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан; тиреотропный гормон; олова этилэтиопурпурин; тирапазамин; титаноценовый бихлорид; топсентин; торемифен; фактор тотипотентных стволовых клеток; ингибиторы трансляции; третиноин; триацетилуридин; трицирибин; триметрексам; трипторелин; трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC; убенимекс; урогенитальный синусовый фактор ингибирования роста; антагонисты рецепторов урокиназы; вапреотид; вариолин В; векторная система, эритроцитарная генная терапия; веларезол; верамин; вердины; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; и циностатин стималамер. В одном варианте реализации противораковое лекарственное средство представляет собой 5-фторурацил, таксол или лейковорин.

Настоящее изобретение имеет множество аспектов, проиллюстрированных следующими неограничивающими примерами.

Примеры

#### **Пример 1**

Экспрессия *in vivo* кодируемого плазмидой IgG к PD-1 или LAG-3 с помощью синтетической ДНК в качестве нового инструмента иммунотерапии рака

Раковые заболевания используют различные стратегии, чтобы избежать иммунного надзора, включая эксплуатацию контрольных

точек иммунного ответа. Контрольные точки иммунного ответа представляют собой рецепторы, обнаруженные на иммунных и стромальных клетках, функция которых может влиять на продолжительность или эффективность иммунного ответа. Опухолевые клетки часто активируют лиганды этих рецепторов, чтобы защитить себя от иммунного ответа хозяина. Терапевтические средства в виде моноклональных антител (MAb), которые блокируют взаимодействия контрольных точек иммунного ответа и лигандов, возобновляют разрушение раковых клеток Т-клетками *in vivo*. MAb, которые нацелены на передачу сигналов ингибирующих Т-клеток, опосредованную CTLA-4 и/или PD-1, недавно получили одобрение для лечения некоторых видов рака на основании замечательных клинических результатов. Результаты, представленные в настоящем документе, сосредоточены на новом способе улучшения доставки MAb посредством прямой инженерии MAb в форме синтетических плазмид ДНК. Эта технология может улучшить многие аспекты такой терапии, снижая стоимость, увеличивая время экспрессии *in vivo* и позволяя простым образом создавать комбинированные препараты в отсутствие иммунного ответа хозяина на вектор, расширяя использование этих новаторских методов лечения для групп пациентов с неблагоприятными прогнозами.

Результаты демонстрируют, что технология «улучшенной и оптимизированной» плазмидной ДНК может быть использована для направления *in vivo* производства тяжелых и легких цепей иммуноглобулина из установленных моноклональных антител, которые могут оказывать нацеленное воздействие на контрольные точки иммунного ответа LAG3 и PD-1, как определено по результатам анализов проточной цитометрии, ELISA и вестерн-блот. Оба антитела продуцируются на физиологически значимых уровнях в крови и других тканях мышей с использованием улучшенной доставки посредством электропорации плазмид ДНК, кодирующих гены для каждого антитела. Сывороточные антитела от инокулированных животных сохраняют способность связываться со своими мишенями, являются биологически активными *in vivo* и проявляют иммуностимулирующее действие в отношении Т-клеток-хозяев. Эти исследования имеют важное значение для профилактических и

терапевтических стратегий лечения рака и других важных заболеваний.

Конструкции плазмид dMAb к PD-1, PD-L1, LAG-3, GITR, CD40, OX40, CTLA-4, TIM-3, и 4-1BB и подтверждение *in vitro* и *in vivo* продукции IgG

Плазмиды ДНК-моноклональное антитело (dMAb) конструировали путем клонирования последовательностей тяжелых и легких цепей человеческих моноклональных антител в плазмиду pVAX1.

Таблица 1. Последовательности

SEQ ID	Идентификатор	SEQ ID	Идентификатор
SEQ ID NO:1	Оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК) антитела к hPD-1	SEQ ID NO:15	GITR человека (клон 36E5) (ДНК)
SEQ ID NO:2	Оптимизированная аминокислотная последовательность антитела к hPD-1 (белок)	SEQ ID NO:16	GITR человека (белок)
SEQ ID NO:3	Последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК) антитела к hLAG3	SEQ ID NO:17	CD40 человека (клон № G12) (ДНК)
SEQ ID NO:4	Аминокислотная последовательность антитела к hLAG3 (белок)	SEQ ID NO:18	CD40 человека (клон № G12) (белок)
SEQ ID NO:5	Последовательность нуклеиновой кислоты (ДНК) DMAb TIM-3	SEQ ID NO:19	CD27 человека (агонистическ.) (ДНК)
SEQ ID NO:6	TIM-3 человека (белок)	SEQ ID NO:20	Аминокислотная последовательность CD27 человека (белок)
SEQ ID NO:7	Последовательность	SEQ ID	Тремелимумаб



	нуклеиновой кислоты (ДНК) D Mab PD-1 человека	NO:21	(полноразмерный) (ДНК)
SEQ ID NO:8	PD-1 человека (белок)	SEQ ID NO:22	Тремелимумаб (полноразмерный) , аминокислотная последовательность (белок)
SEQ ID NO:9	Мышиный LAG3-IgG1 (ДНК)	SEQ ID NO:23	Тремелимумаб (каркас) (ДНК)
SEQ ID NO:10	Мышиный Lag3-IgG1 (белок)	SEQ ID NO:24	Тремелимумаб (каркас), аминокислотная последовательность (белок)
SEQ ID NO:11	Человеческий 4- 1BB-IgG1 (ДНК)	SEQ ID NO:25	Ипилимумаб (полноразмерный) (ДНК)
SEQ ID NO:12	Аминокислота 4- 1BB-IgG1 человека (белок)	SEQ ID NO:26	Ипилимумаб (полноразмерный) , аминокислотная последовательность (белок)
SEQ ID NO:13	Человеческий OX40- IgG1-агонист (гуманизирован из мышинного антитела к человеческому OX-40) (ДНК)	SEQ ID NO:27	Ипилимумаб (каркас) (ДНК)
SEQ ID NO:14	Человеческий OX- 40-IgG1 (белок)	SEQ ID NO:28	Ипилимумаб (каркас), аминокислотная последовательность (белок)

Супернатанты из трансфицированных плазмидой клеток 293Т собирали через 48 часов после трансфекции, и анализировали уровни человеческого IgG с использованием твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA).

Мышам линии Nu/J (n=4, PD-1 или n=5, LAG-3) вводили инъекционно 100 мкг плазмиды с последующим проведением электропорации (ЭП). У мышей брали сыворотку в течение периода до 35 дней, и с помощью анализа ELISA проводили количественное определение уровней человеческого IgG.

IgG, выработанные *in vivo* после введения плазмид dMAb PD-1 или LAG-3, специфически связываются со своими мишенями.

Разведения сыворотки, полученной от мышей, которым вводили инъекцию плазмид pVAX1, dMAb к PD-1 или dMAb к LAG-3 оценивали в анализе связывания ELISA с использованием рекомбинантного белка PD-1 или LAG-3.

Специфическое связывание dMAb к PD-1 и dMAb к LAG-3 с рекомбинантным PD-1 или рекомбинантным белком LAG-3 оценивали с помощью анализов вестерн-блот.

T-лимфоциты, стимулированные ПГА, инкубировали с сывороткой, полученной от мышей, которым вводили pVAX1 или плазмиду dMAb а потом со вторичным антителом к человеческому IgG, конъюгированным с флуорофором. Окрашенные клетки оценивали с помощью проточной цитометрией со стробированием на живых клетках CD3+. В качестве положительного контроля использовали доступные в продаже антитела к PD1 и к LAG-3.

dMAb LAG-3 препятствует росту опухоли, улучшает выживаемость и способствует менее подавляющему микроокружению опухоли.

Когортам самок мышей линии C57BL/6 подкожно имплантировали в правый бок  $5 \times 10^5$  клеток меланомы B16 F10 и через 5 дней вводили путем инъекции пустой pVAX1 или плазмиду dMAb к LAG-3. Измерение размера опухолей толщиномером и оценку выживаемости мышей проводили в течение периода до одного месяца после имплантации опухоли.

Через 23 дня после инокуляции мышам линии C57BL/6 клеток меланомы B16, для выяснения роли dMAb к LAG-3 в регуляции иммуносупрессии, опосредованной T-клетками (Treg), была проведена проточная цитометрия для анализа популяции клеток LAG3+FoxP3+CD25+Treg в опухоли и в околоопухолевых тканях.

Плазмиды, кодирующие генетическую последовательность антител, нацеленных на молекулы контрольных точек иммунного ответа, были способны управлять продуцированием антител *in vitro* и *in vivo*.

Человеческие антитела dMAb к PD-1, к LAG-3, к GITR и к 4-1BB, выработанные в организме мыши, специфически связываются со своими мишенями.

dMAb к LAG-3 были способны замедлять рост опухоли, улучшать выживаемость и стимулировать менее ингибирующее микроокружение опухоли в модели заражения меланомой B16.

ДНК-плазмиды, доставляемые внутримышечно с помощью электропорации, могут стимулировать устойчивую выработку антител *in vivo* и обеспечивают серологически независимую, экономически выгодную платформу для доставки лекарственных средств в виде моноклональных антител, предназначенных для лечения рака, инфекционных заболеваний и других состояний.

Раскрытия всех и каждого патента, патентной заявки и публикации, цитируемой в настоящем документе, включены в него посредством ссылки во всей их полноте.

Хотя изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные варианты реализации, очевидно, что другие варианты реализации и изменения этого изобретения могут быть разработаны специалистами в данной области техники без отхода от истинного духа и объема настоящего изобретения. В прилагаемой формуле изобретения подразумевается, что она включает все такие варианты реализации и эквивалентные варианты.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Плазмида для получения синтетического антитела LAG-3 у индивида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело LAG-3, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:10, аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична по всей длине SEQ ID NO:4, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична по всей длине SEQ ID NO:10.

2. Плазмида по п.1, где нуклеотидная последовательность содержит лидерную последовательность.

3. Плазмида по п.1, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 4 и 10.

4. Плазмида по п.1, содержащая нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична по всей длине последовательности нуклеиновой кислоты из по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы SEQ ID NO: 3 и 9.

5. Плазмида по любому из пп.1-3, где плазмида содержит вектор экспрессии.

6. Композиция для усиления иммунного ответа у больного, содержащая плазмиду по п.1, для получения синтетического антитела LAG-3 у индивида и дополнительно содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген, где антиген выбран из группы, состоящей из опухолеспецифического антигена и опухолеассоциированного антигена.

7. Композиция по п.6, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент.

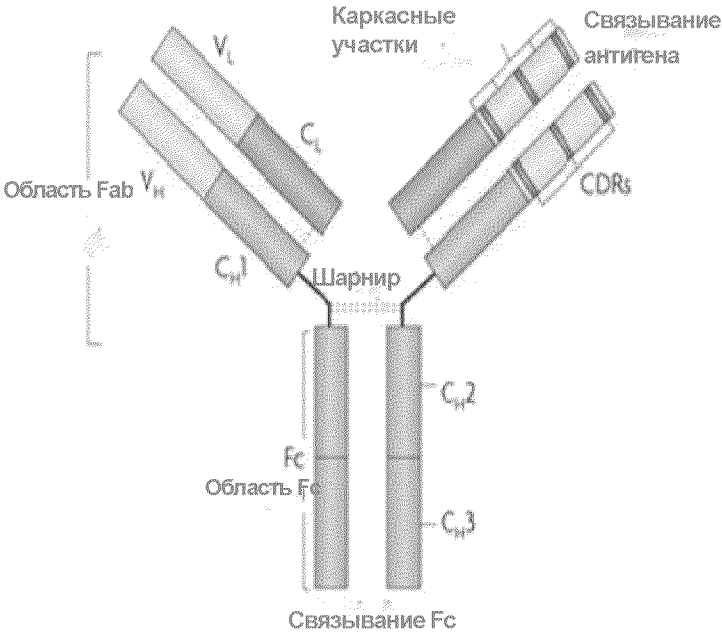
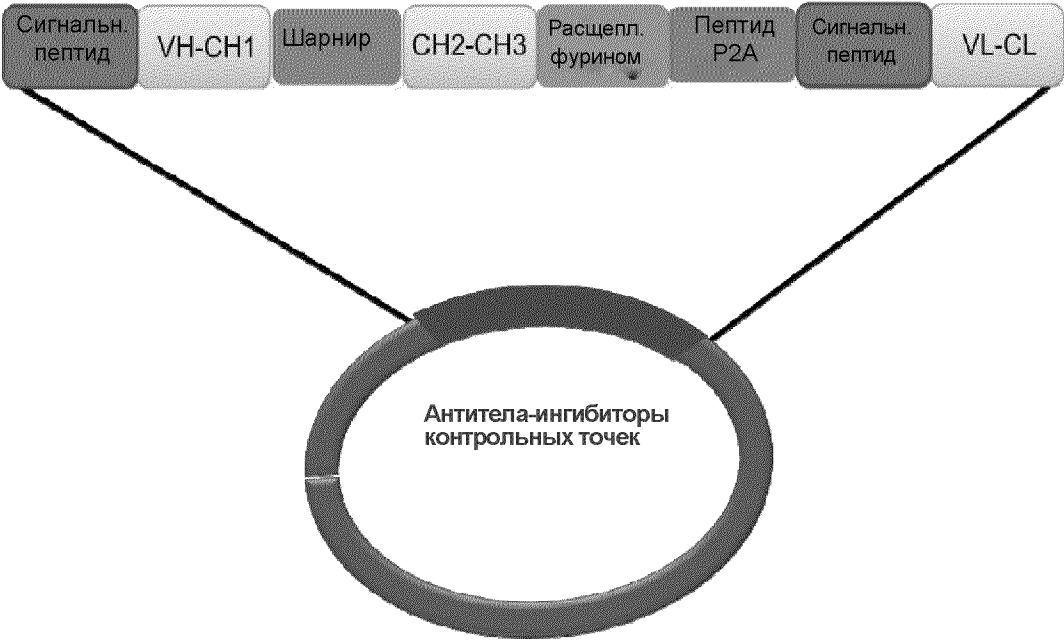
8. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту композиции по п.6.

9. Способ усиления иммунного ответа у больного, включающий введение больному молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5 или композиции по любому из пп. 6-7.

10. Способ по п.10, где введение композиции включает стадию электропорации.

По доверенности

# Моноклональное антитело на основе ДНК (dMAb)

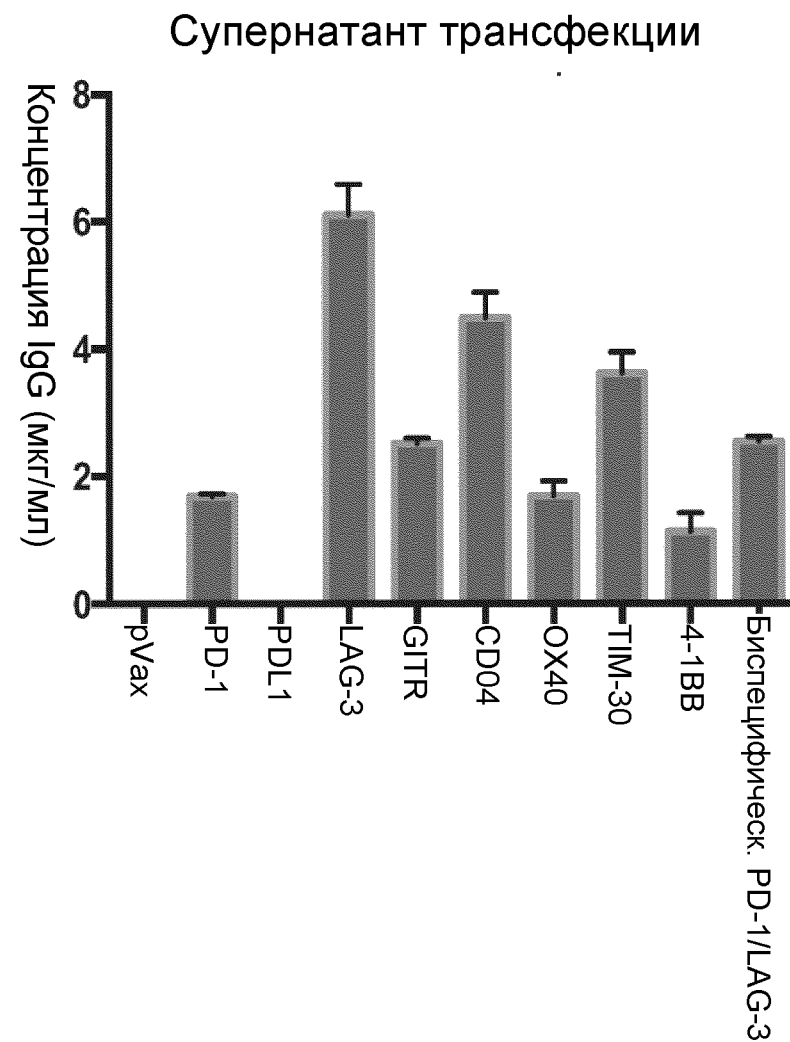


Фигура 1

A

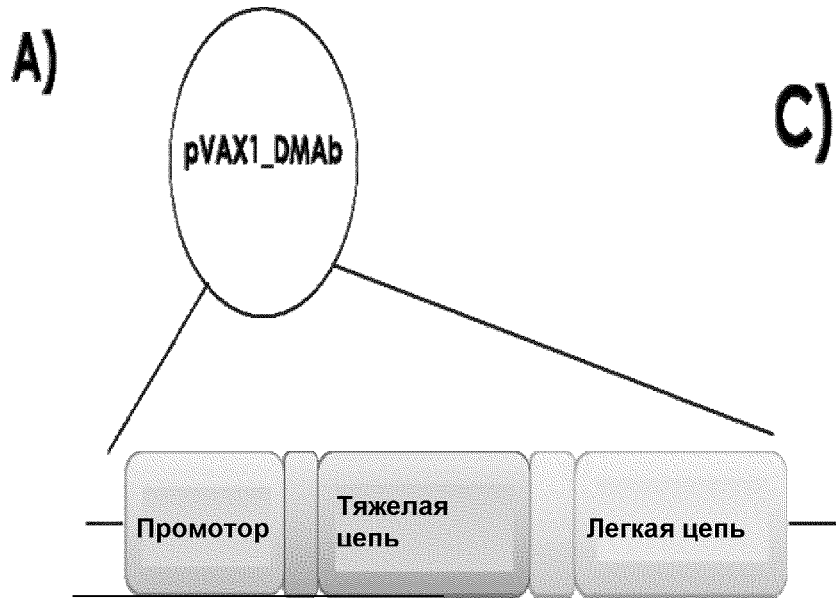
Мишень	Подкласс IgG	Легкая цепь
PD-1	IgG4	каппа
PD-L1	IgG4	каппа
LAG-3	IgG4	каппа
GITR	IgG4	каппа
CD40	IgG1	каппа
Ox40	IgG4	каппа
TIM-3	IgG1	каппа
4-1BB	IgG4	каппа
Биспецифическ. PD-1/LAG-3	IgG2	каппа

B

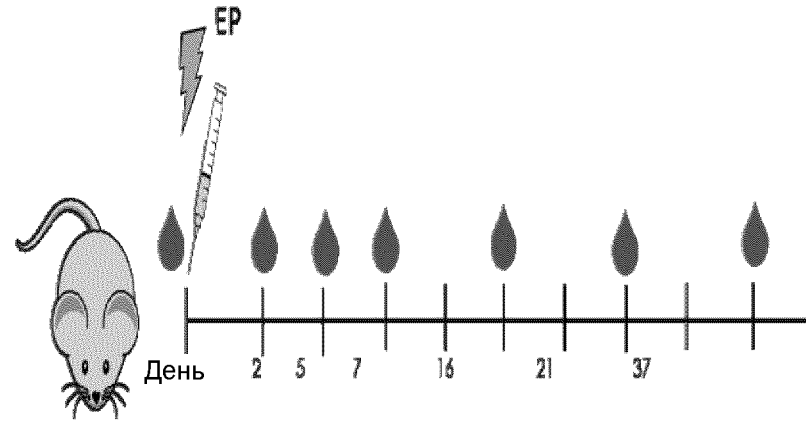


2/23

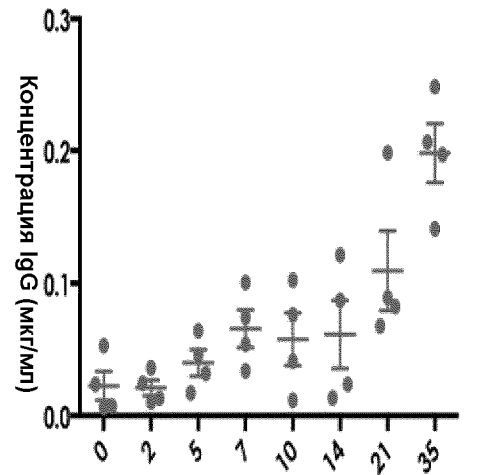
Фигура 2А-2В



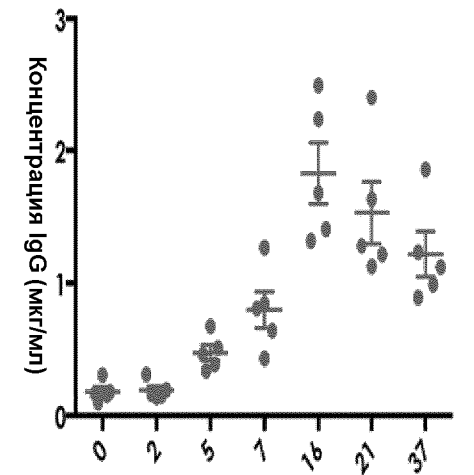
**C)**



Уровни DMAb PD-1 в сыворотке

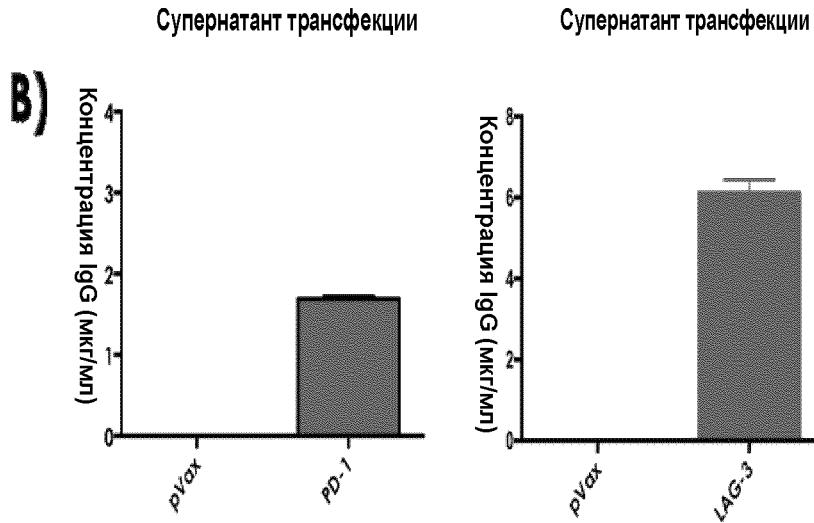


Уровни DMAb LAG-3 в сыворотке



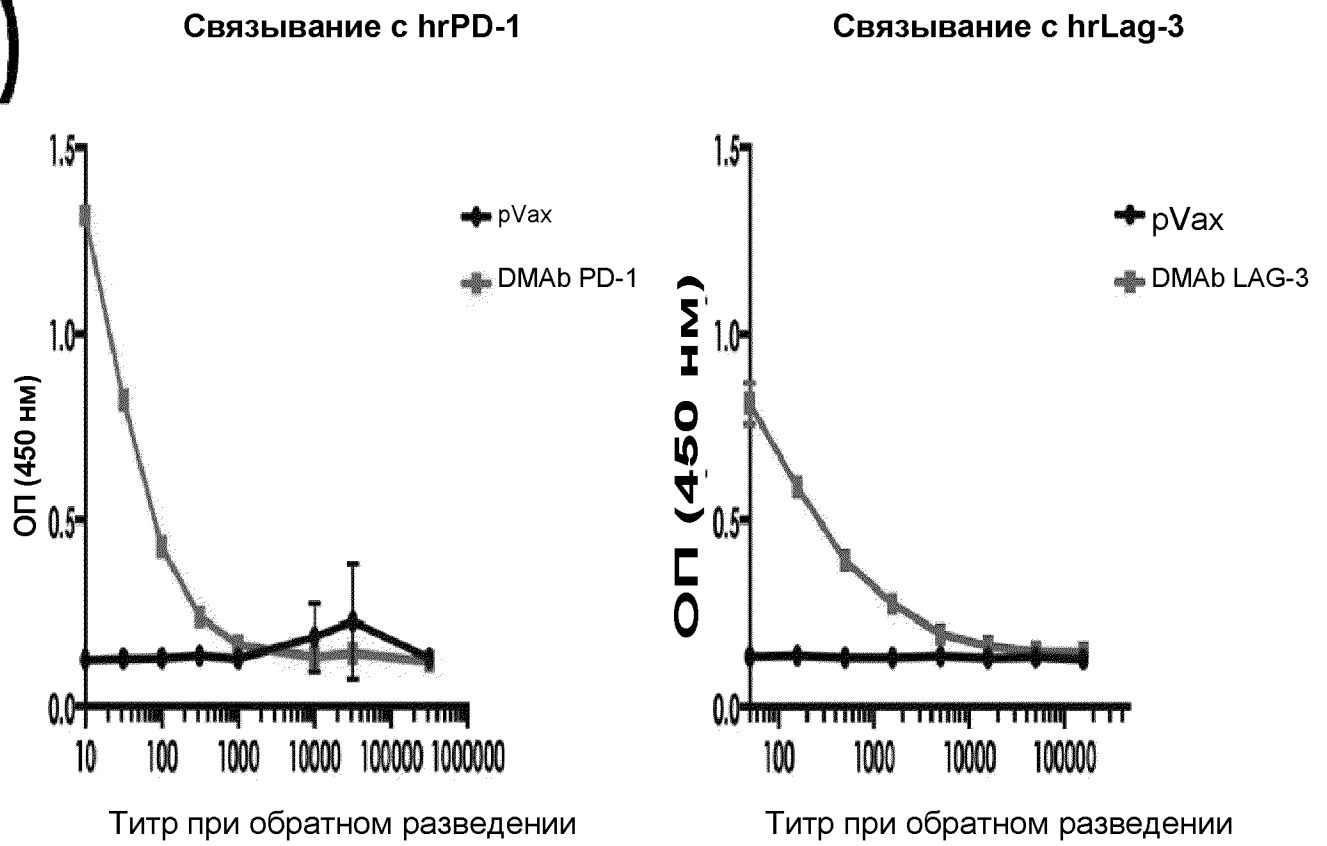
Дней после инокуляции плазмиды

Дней после инокуляции плазмиды



Фигура 3А-3С

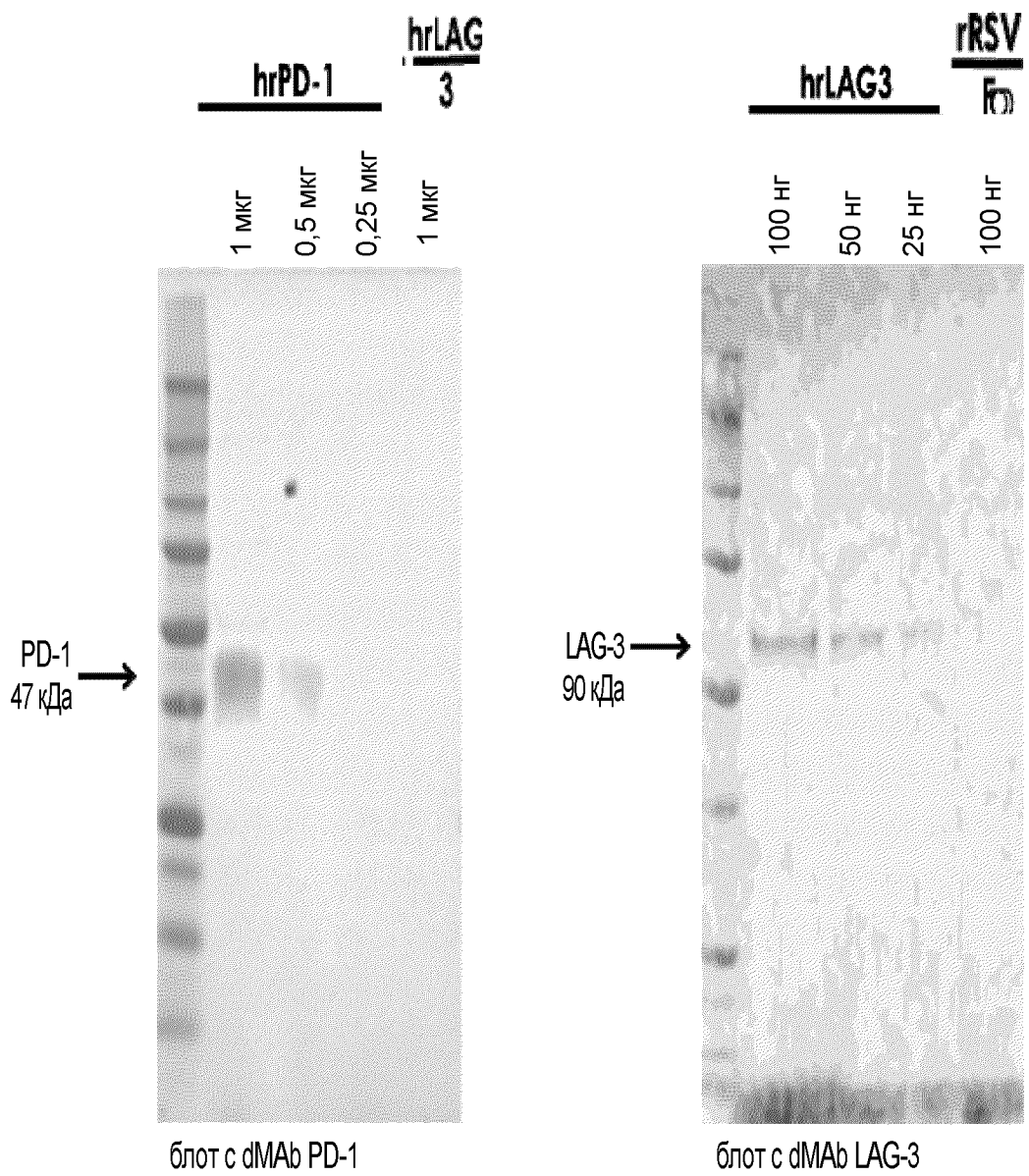
A)



Фиг. 4А

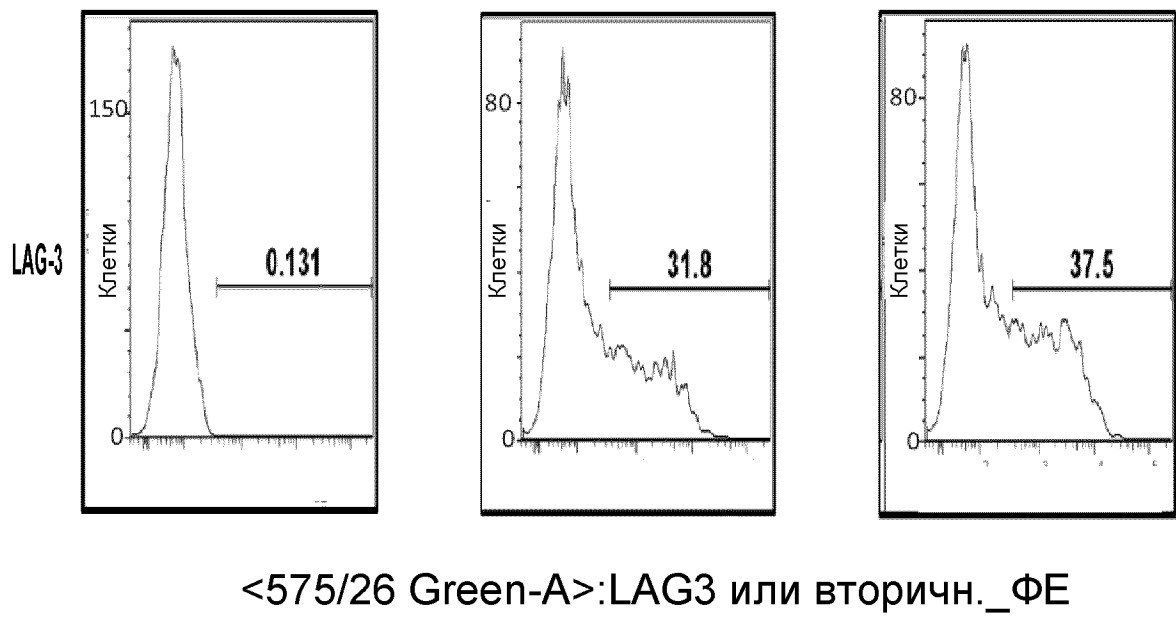
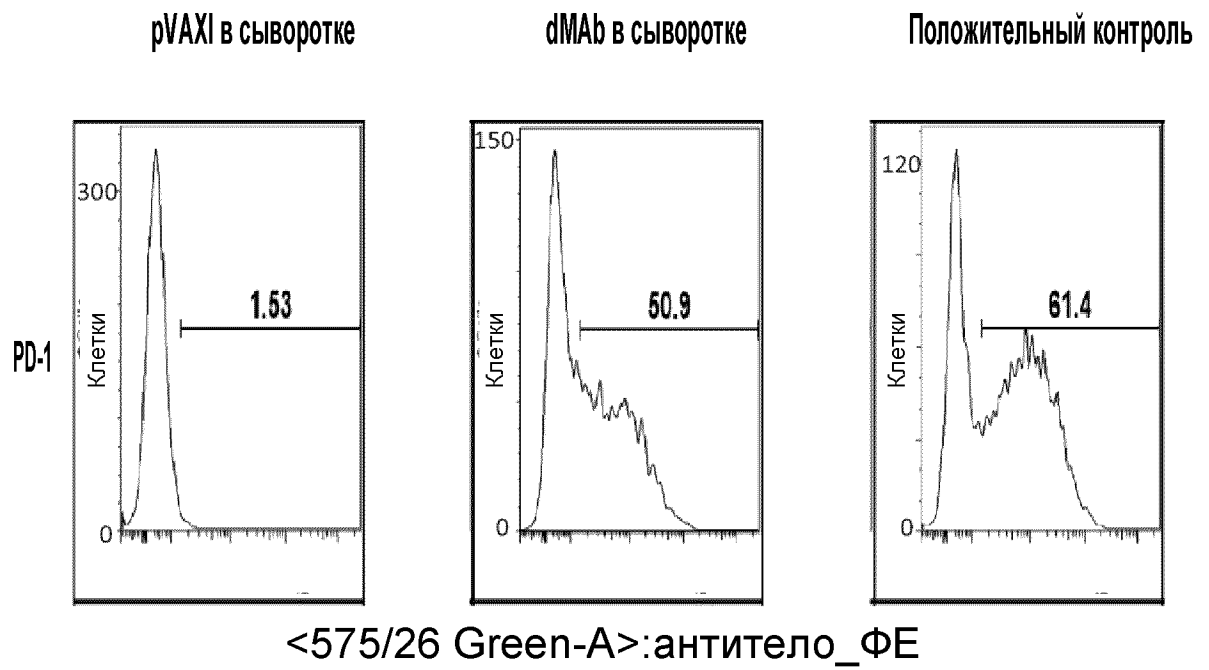


**B)**



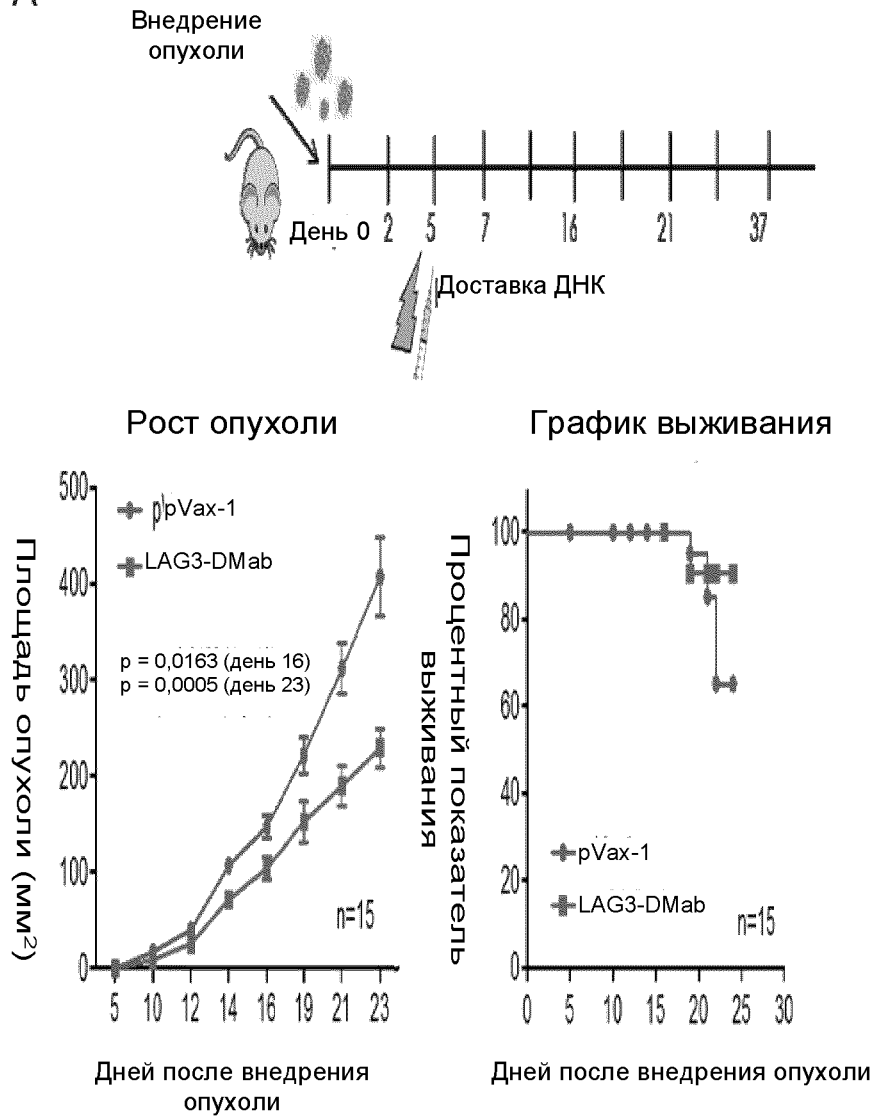
Фиг. 4В

C)

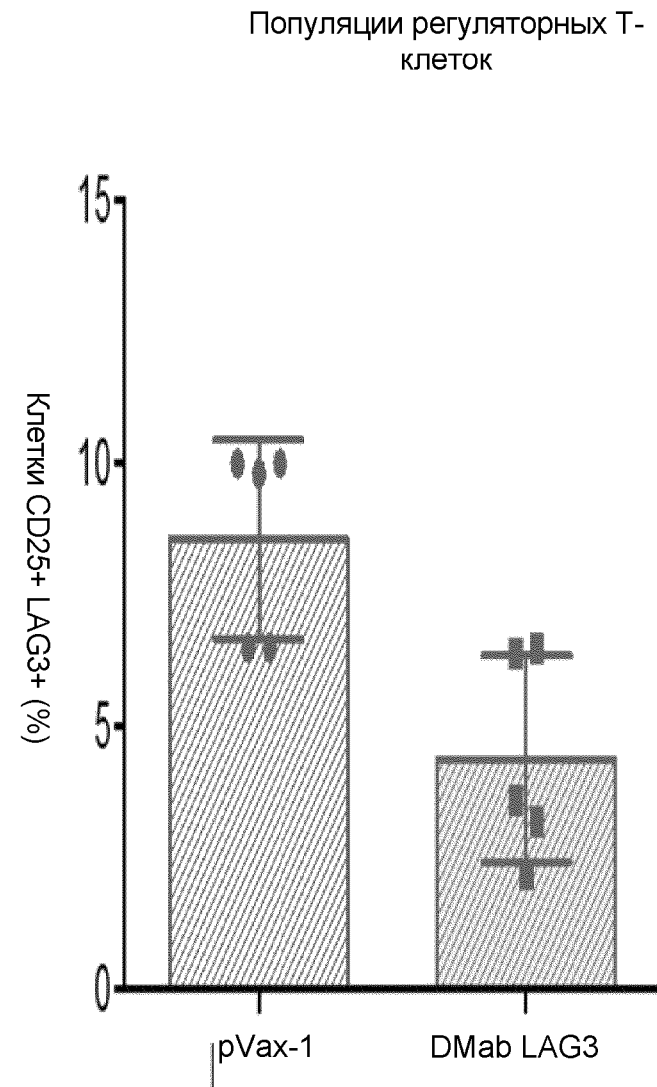


Фигура 4С

A



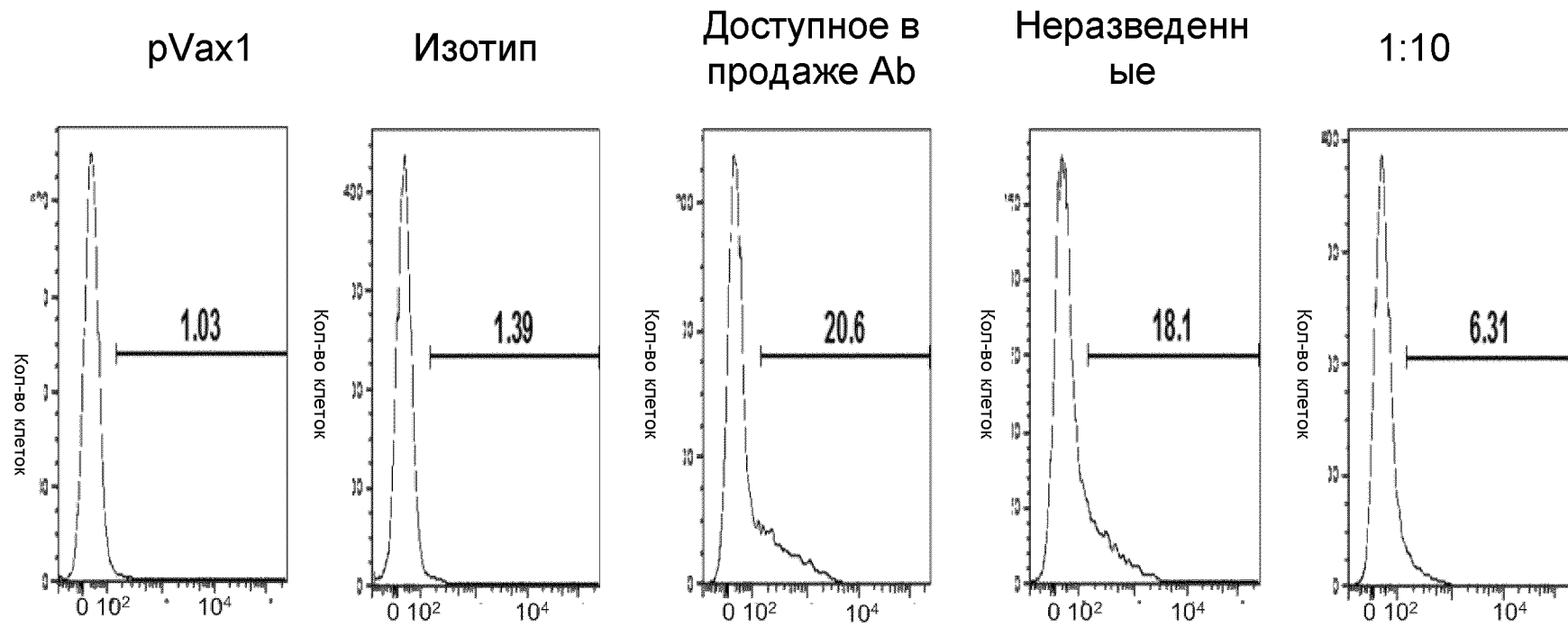
B



Фигура 5А-5В

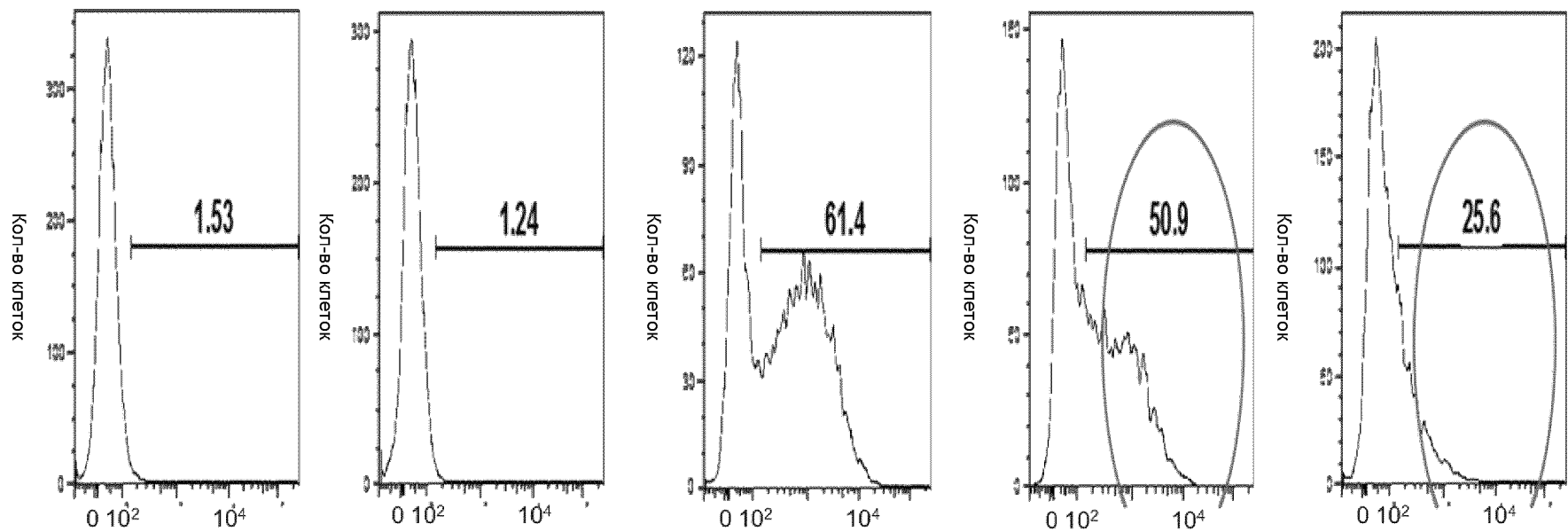
Нестимулированные

Мышиная сыворотка



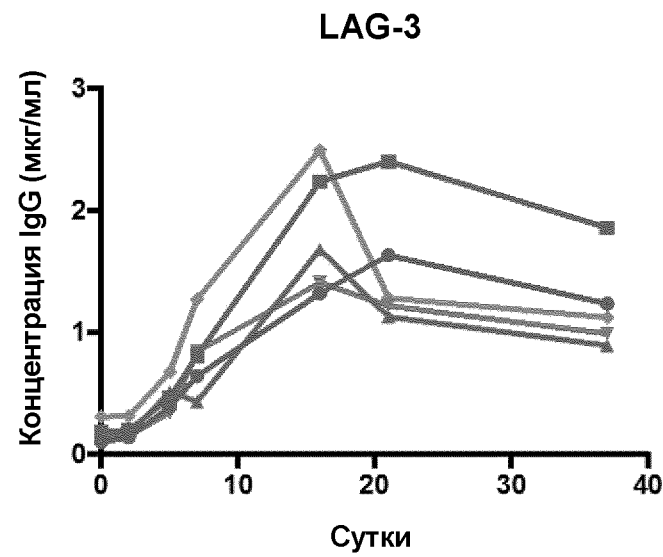
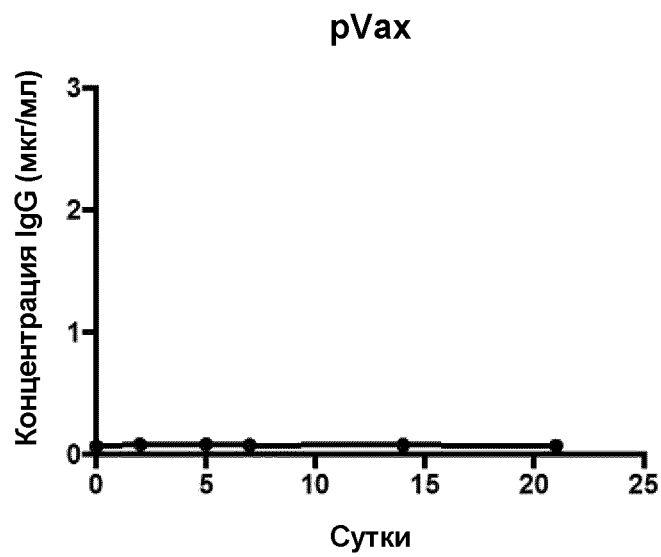
<575/26 Green-A>:антитело\_ФЕ

Фиг. 6А

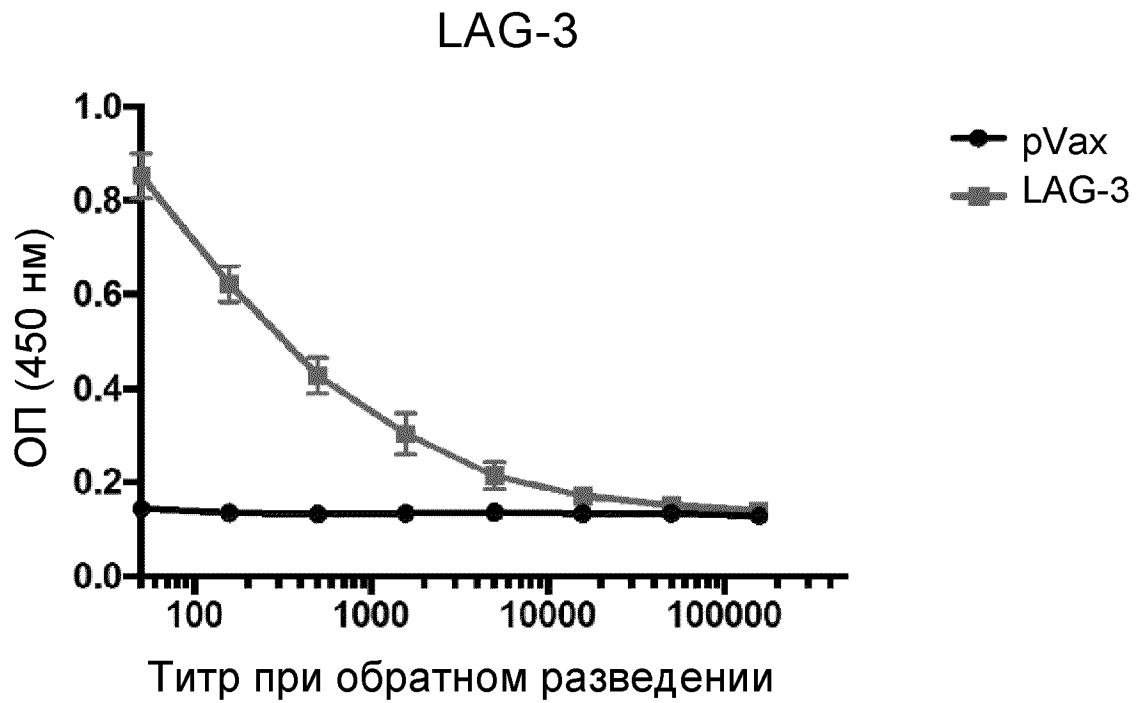


<575/26 Green-A>:антитело\_ФЕ

Фиг. 6В

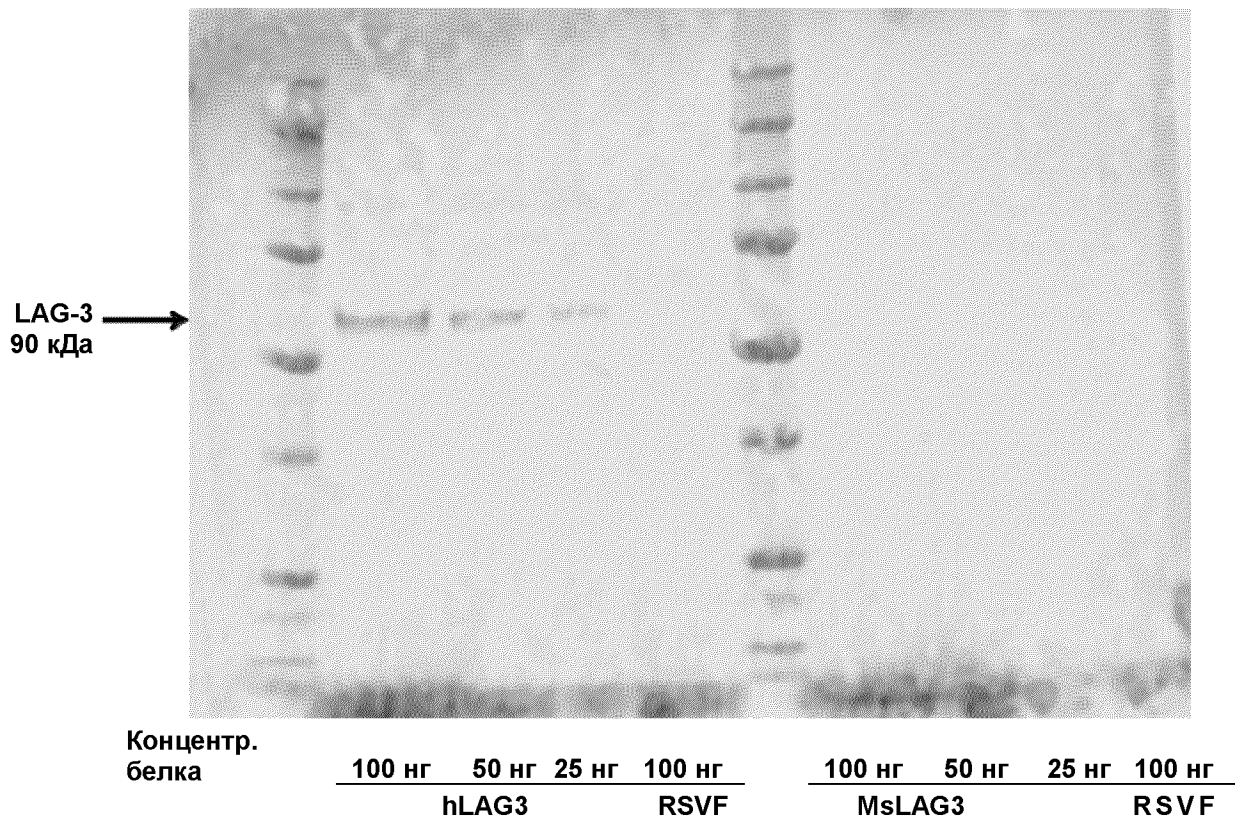


Фигура 7



\* Объединенная сыворотка

Фигура 8

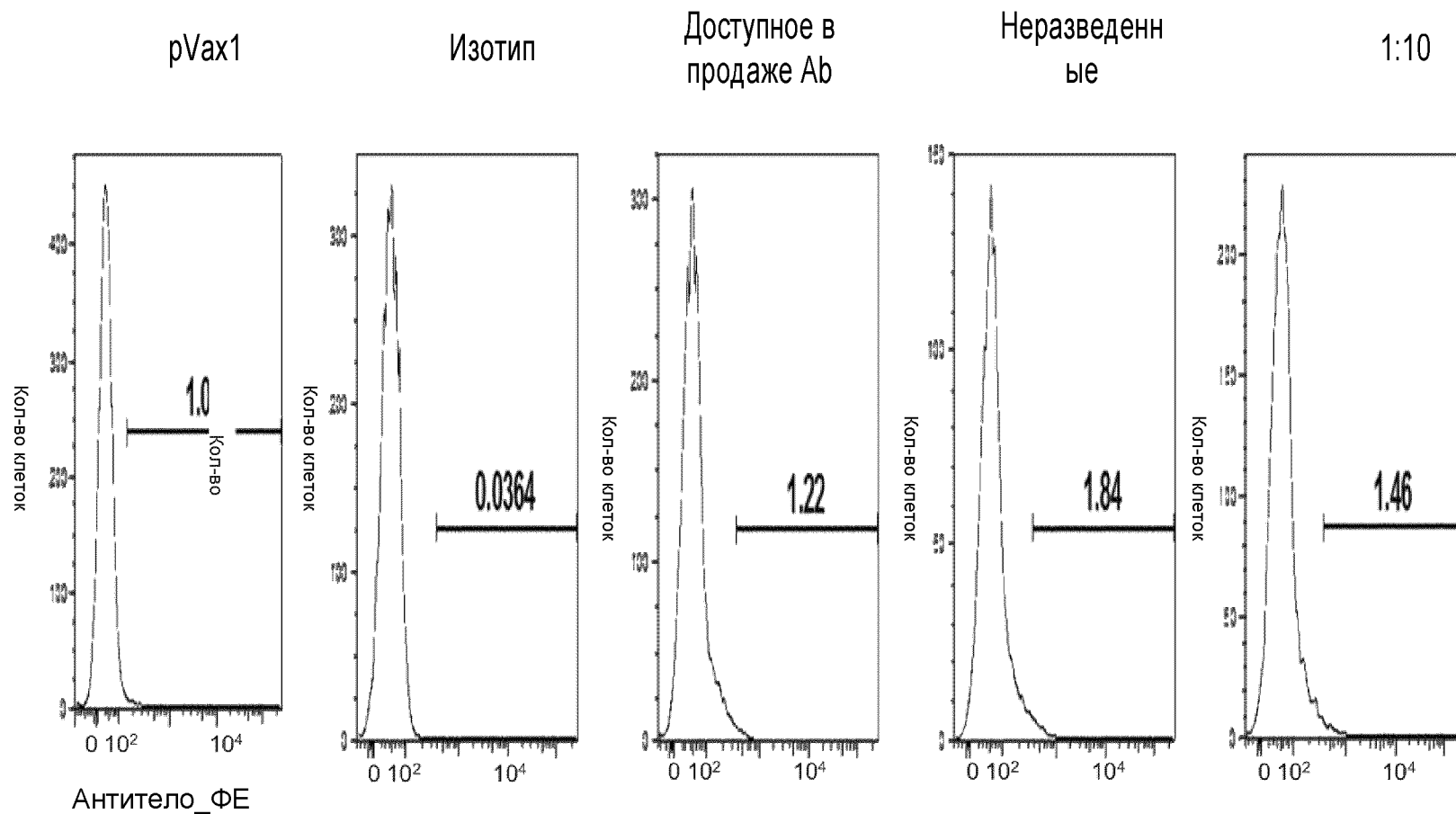


Фигура 9



Нестимулированные

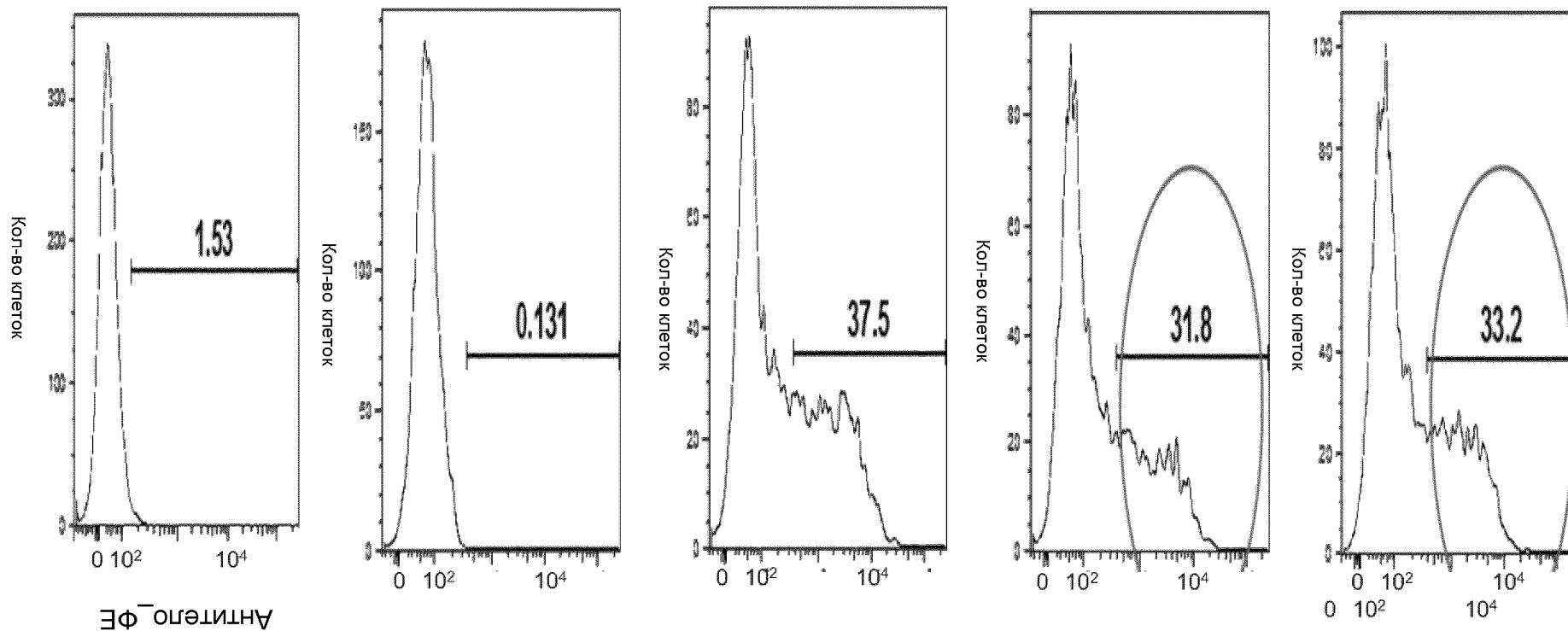
Мышиная сыворотка



<575/26 Green-A>:LAG3 или вторичн.\_ФЕ

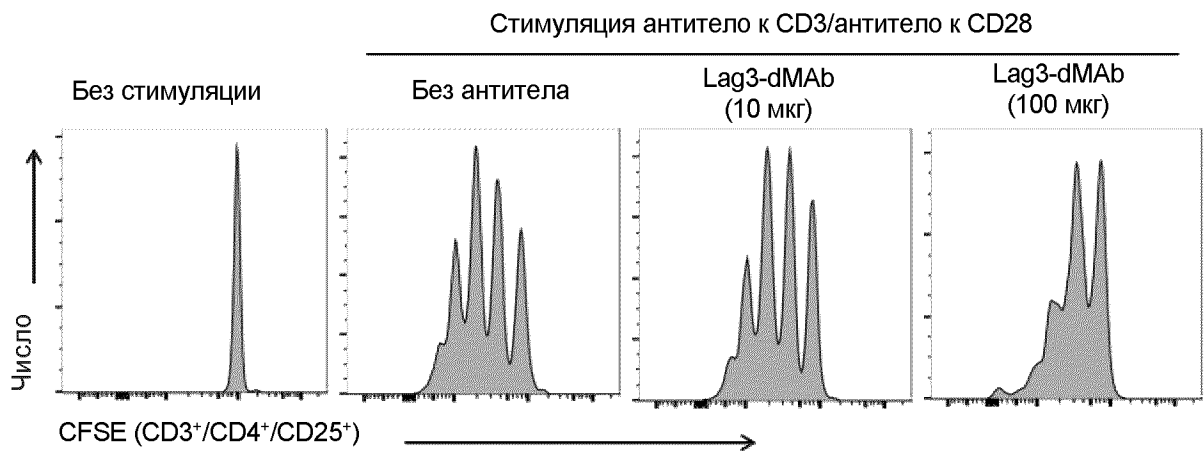
Фиг. 10А

# Стимулированные ПГА

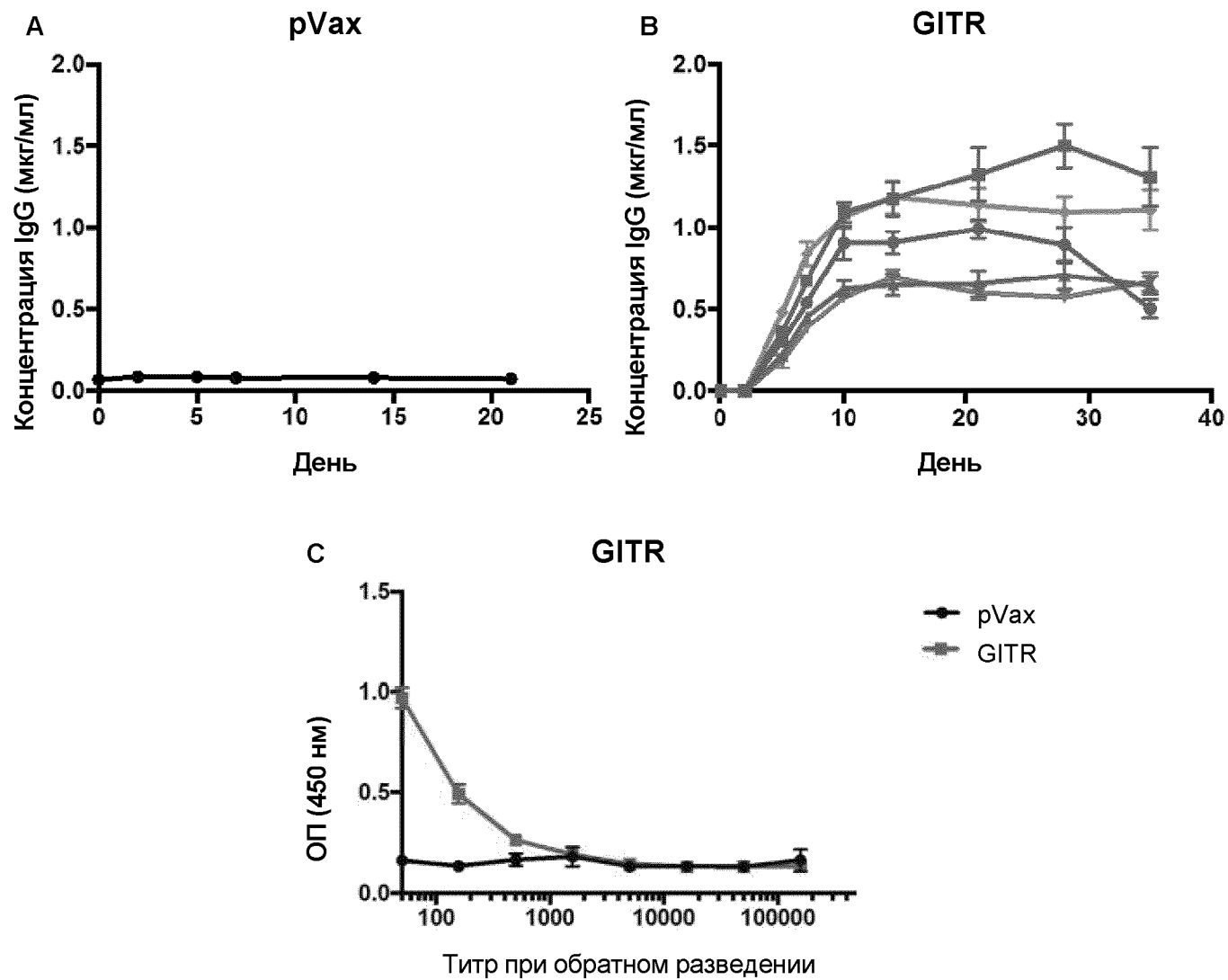


<575/26 Green-A>:LAG3 или вторичн.\_ФЕ

Фиг. 10В



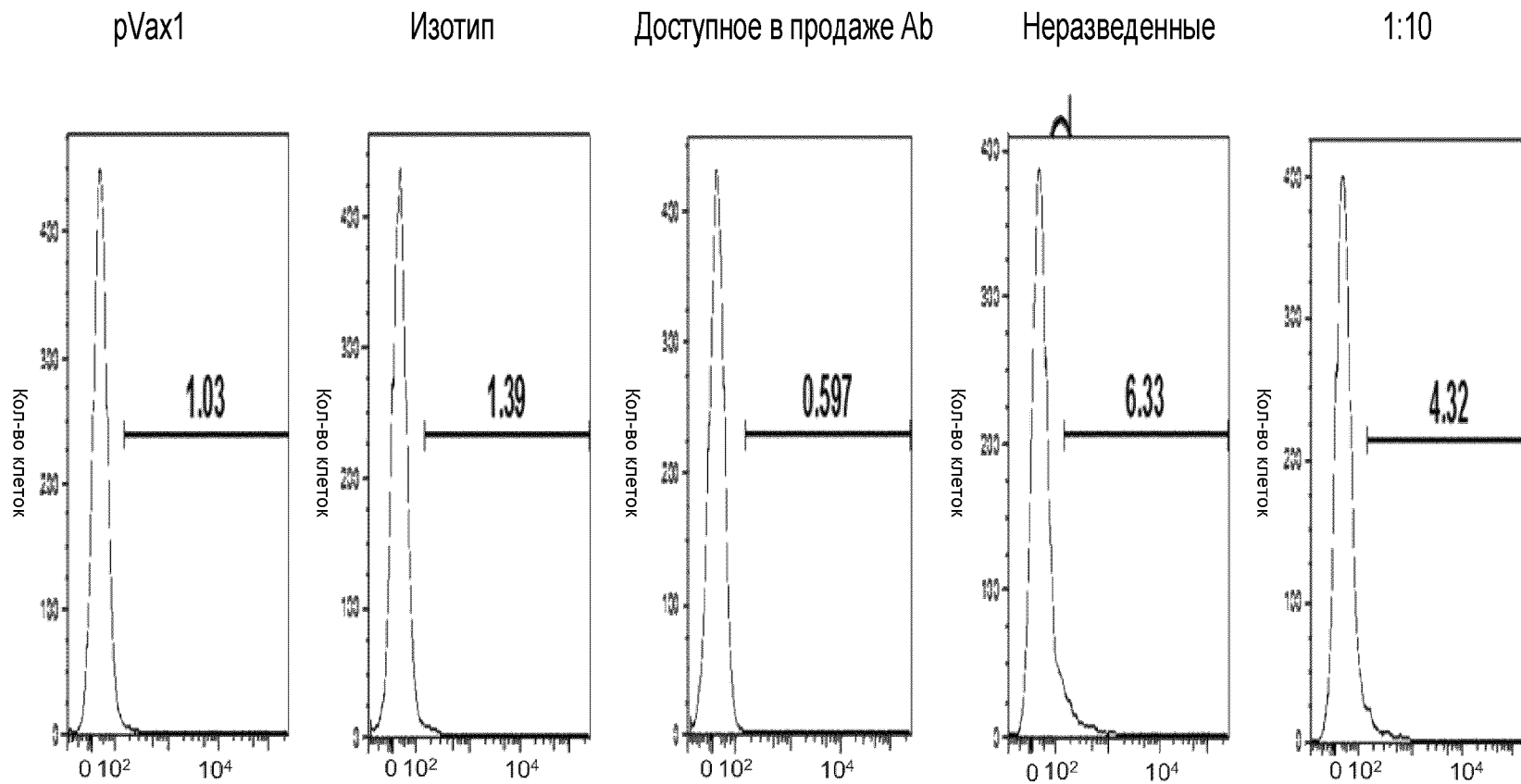
Фигура 11



Фигура 12А-12С

Нестимулированные

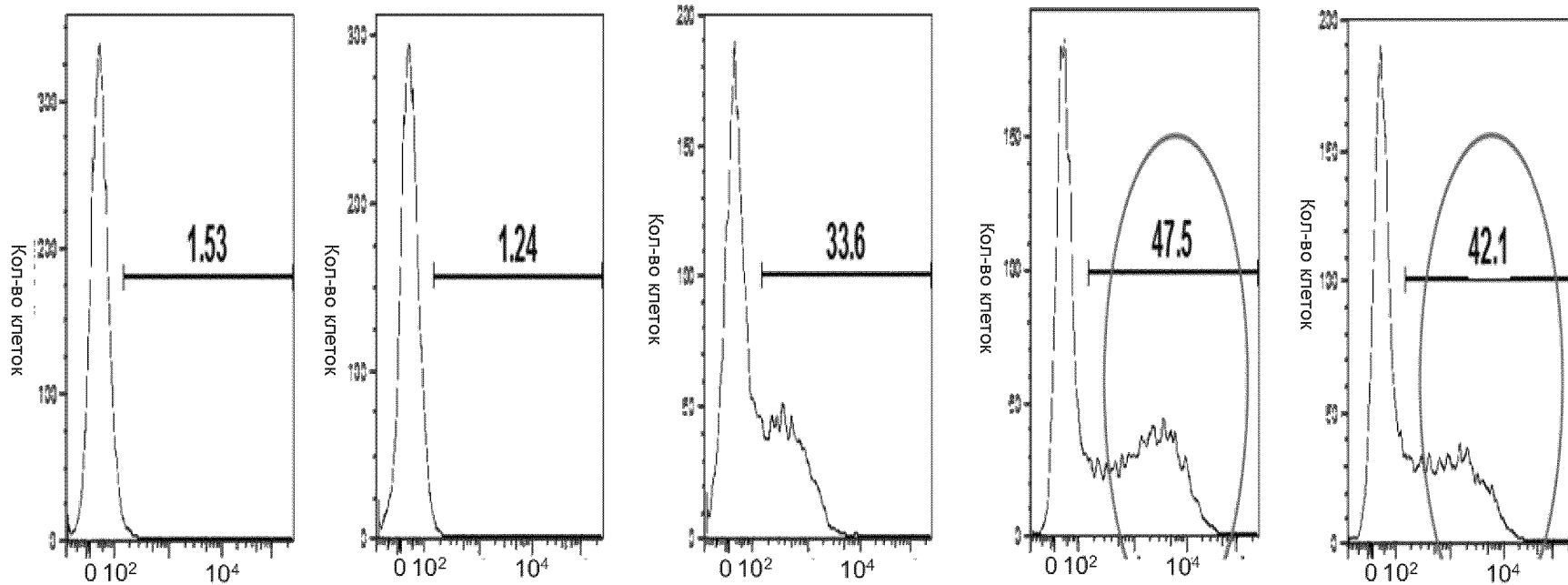
Мышиная сыворотка



<575/26 Green-A>:LAG3 или вторичн.\_ФЕ

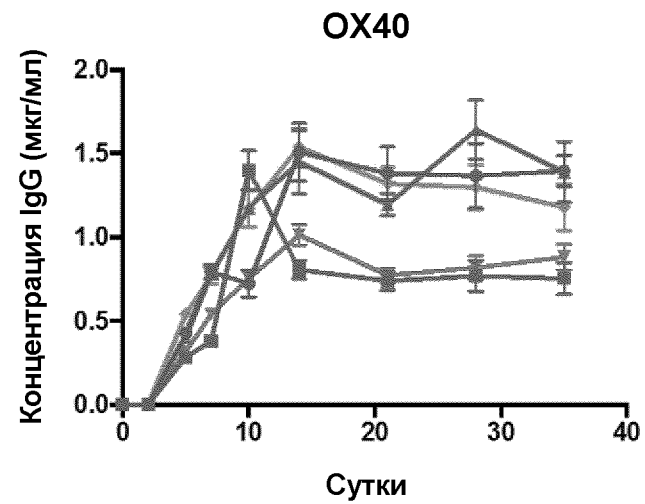
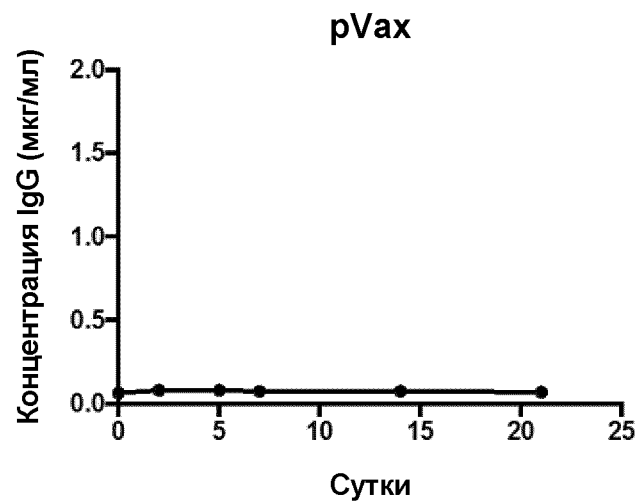
Фиг. 13А

17/23

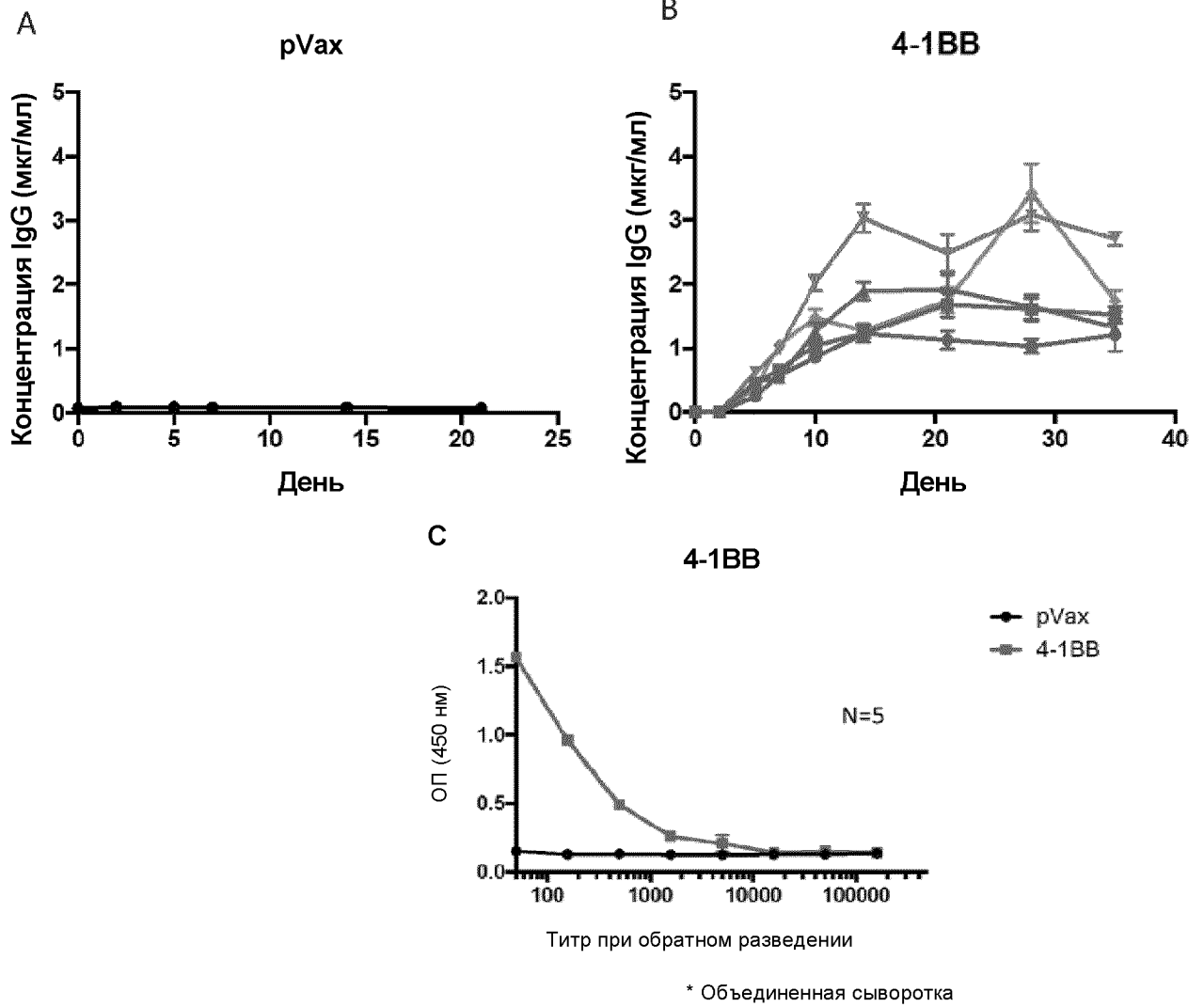


<575/26 Green-A>:антитело\_ФЕ

Фиг. 13В

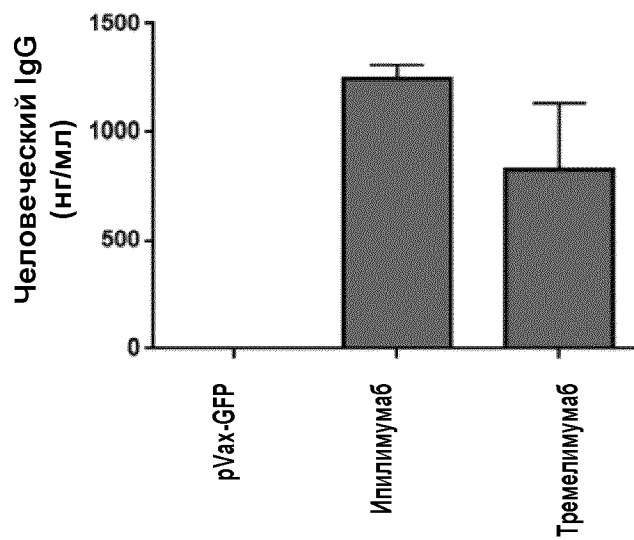


Фигура 14



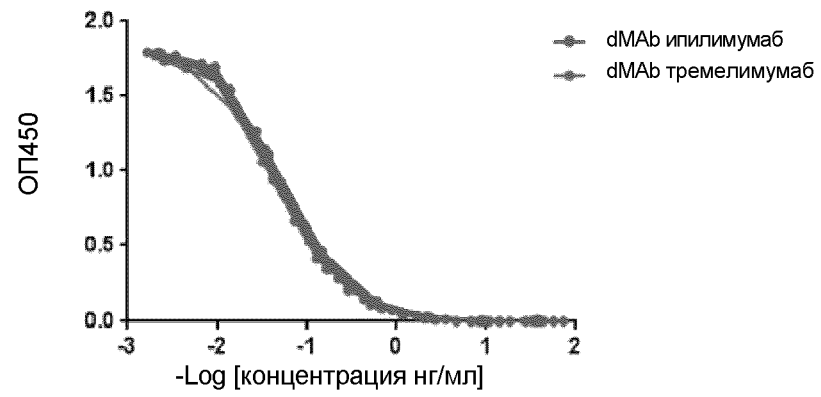
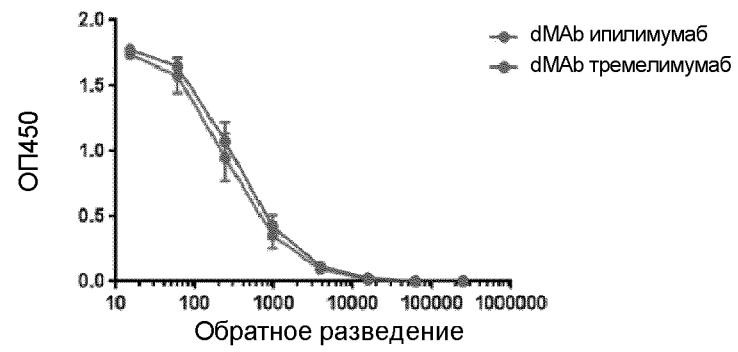
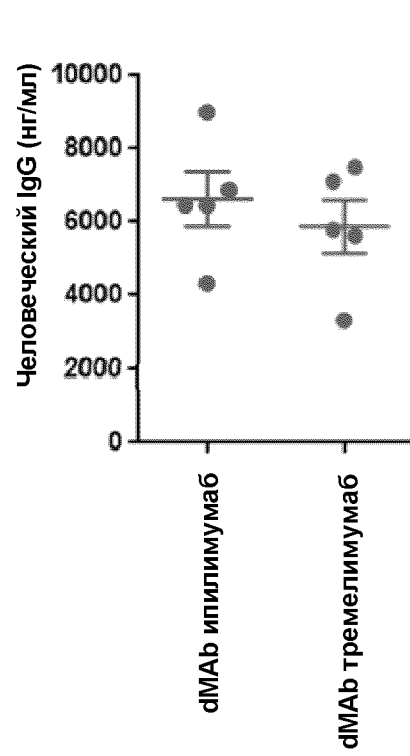
Фигура 15А-15С



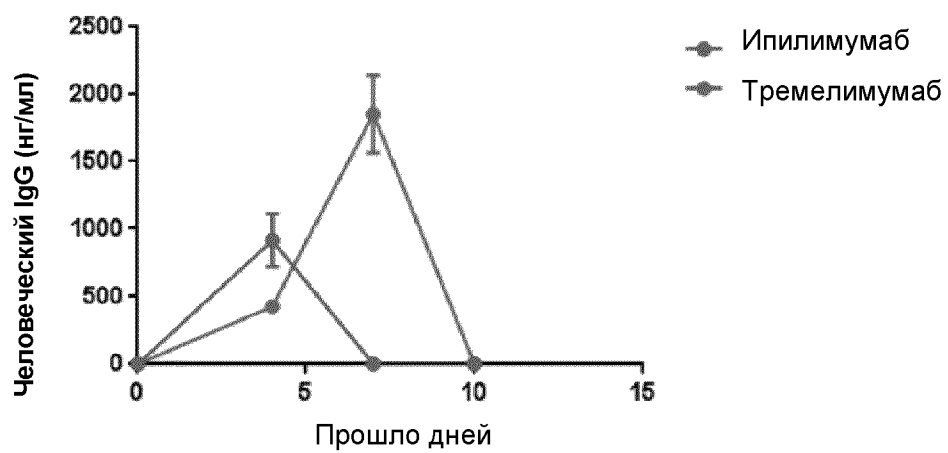


Клетки 293Т

Фигура 16



Фигура 17



Фигура 18