

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690965** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2016.09.30

(51) Int. Cl. *C12N 15/85* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.11.12

(54) **ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ РНК-ВЕКТОР И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **13192555.4**

(32) **2013.11.12**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2014/074349**

(87) **WO 2015/071295 2015.05.21**

(71) Заявитель:

**ВРЕЙЕ УНИВЕРСИТЕЙТ
БРЮССЕЛЬ (BE)**

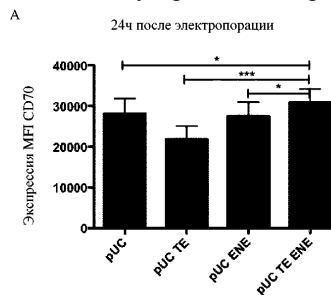
(72) Изобретатель:

**Хейрман Карло, Тилеманс Кристиан
(BE)**

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(57) Изобретение в целом относится к улучшенному транскрипционному РНК-вектору, который является крайне пригодным для получения мРНК для терапевтических целей *in vivo*. Улучшения в векторе, в частности, состоят в наличии энхансера транскрипции и элемента удержания в ядре.



201690965

A1

A1

201690965

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ РНК-ВЕКТОР И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом относится к улучшенному транскрипционному РНК-вектору, который является крайне пригодным для получения мРНК для терапевтических целей *in vivo*. Улучшения в векторе, в частности, состоят в наличии энхансера трансляции и элемента удержания в ядре.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хотя наша иммунная система способна отличать здоровые клетки от опухолевых клеток и инфекционных агентов, иногда ей не удается надлежащим образом распознать и отреагировать на проблему. Следовательно, медицинская наука сфокусировалась на развитии множества стратегий, которые помогают иммунной системе в контроле и устранении опухолевых клеток и инфекционных агентов. Дендритные клетки (DC) представляют собой антигенпрезентирующие клетки (APC), известные как ключевые участники в инициации иммунных ответов, поэтому много усилий было приложено в применении DC в иммунотерапии. В случае рака, например, целью является индукция и сохранение опухолеспецифичного иммунного ответа путем выявления эффекторных Т-клеток, способных специфично уменьшать опухолевую массу и индуцировать иммунологическую память для контроля возврата опухоли. Сразу после идентификации целевых опухолеассоциированных антигенов (ТАА), их можно использовать для увеличения содержания профессиональных APC, т. е. дендритных клеток, как *in vivo*, так и *ex vivo*.

Были оценены различные форматы антигенов в отношении DC для иммунотерапии *in vivo* или *ex vivo*, такие как пептиды, белки, экстракты из целых опухолевых клеток, плазмидная ДНК или мРНК. Среди этих подходов мРНК, кодирующая антиген, появляется в качестве особенно многообещающей.

Преимущество над классической вакцинацией пептидами в том, что мРНК кодирует генетическую информацию всего антигена. Полноразмерный антиген подвергается процессингу, и все доступные эпитопы присутствуют в МНС молекулах пациента, без необходимости определения HLA-специфичных пептидов. Не требуется исключение из лечения пациентов, у которых доступные пептиды не совпадают с их типом HLA. В дополнение, мРНК не представляет опасность в отношении геномной интеграции, предоставляя тем самым приемлемый профиль безопасности, в сравнении с ДНК или вирусными векторами. Из-за своей временной природы, мРНК экспрессируется только в течение короткого периода времени и в итоге расщепляется на природные вещества. Более того, мРНК функционирует как собственный адъювант, возбуждая костимулирующие сигналы, что является преимущественным в контексте иммунотерапии мРНК. Применяли два пути экзогенной доставки мРНК в DC: как *ex vivo* с последующим адоптивным переносом трансфицированных DC, так и путем прямого введения мРНК и поглощения *in vivo*.

В исследовании, проведенном Diken и др. (2011 г.), отмечают, что стимул созревания и/или время его доставки нужно выбирать осторожно, так как поглощение мРНК зависит от макропиноцитоза, функции незрелых DC, которая исчезает по мере созревания DC. Следовательно, совместная доставка классических стимулов созревания, таких как липополисахарид (LPS), с ТАА мРНК обладает негативным влиянием на биологическую доступность антигена, параметра, который совместно определяет индукцию антиген-специфических ответов Т-клетки (Van Lint 2012 г.; Diken 2011 г.). К настоящему времени были изучены две различные стратегии для одновременного увеличения содержания DC с ТАА мРНК и их активации *in vivo*.

Fotin-Mieczek и др. (2011 г.) описали двухкомпонентную систему, содержащую свободную и соединенную с протамином мРНК, обеспечивающую источник антигенов для приобретенного иммунитета вместе с повышенной стимуляцией патоген-распознающего рецептора, TLR7. Данная стратегия иммунизации

привела к индукции сильного противоопухолевого иммунного ответа и длительных вторичных иммунных ответов, что важно, так как Т-клетки памяти должны предотвращать повторное появление опухоли.

Bonehill и др. (2008 г.) оценивали применение специфических комбинаций мРНК для вспомогательных целей, изначально для активации DC, созданных *ex vivo*, но одинаково применяемых для прямого введения и поглощения *in vivo* (Bonehill, 2008 г.). Это привело к заявке на патент (WO2009034172), в которой авторы изобретения описывают, что Т-клеточную способность стимуляции антиген-пептидно детерминированными антигенпрезентирующими клетками или антигенпрезентирующими клетками (совместно-) электропорированными с введением мРНК, кодирующей ТАА, можно сильно повысить, обеспечивая их различными молекулярными адьювантами посредством электропорации с введением смеси молекул мРНК и ДНК, кодирующих два или более иммуностимулирующих фактора. Доказательством концепции является представление, что такие модифицированные антигенпрезентирующие клетки, активированные при помощи направленного пептида или совместно электропорированные с введением мРНК, кодирующей направленный антиген, способны стимулировать антиген-специфические Т-клетки как *in vitro*, так и после вакцинации и, таким образом, формировать многообещающий новый подход для противоопухолевой, противовирусной, антибактериальной или противогрибковой иммунотерапии. Предпочтительной комбинацией иммуностимулирующих факторов, использованных в данном изобретении, являются CD40L и саTLR4, или CD40L и CD70. В других предпочтительных вариантах осуществления используют комбинацию иммуностимулирующих молекул CD40L, CD70 и саTLR4, которую далее в данном документе называют «TriMix».

Настоящее изобретение относится к транскрипционному РНК-вектору, содержащему 5' последовательность энхансера трансляции и 3' последовательность удержания в ядре. Вектор согласно настоящему изобретению демонстрирует неожиданное улучшение в экспрессии белков,

кодируемых полученной в результате транскрипции *in vitro* мРНК, в сравнении с пустым вектором рUC или с векторами, которые содержат либо энхансер трансляции, либо последовательность удержания в ядре. Эти улучшения, в частности, обусловлены совместным присутствием двух компонентов: энхансера трансляции и последовательности, стабилизирующей РНК в векторе и их объединением в полученный таким образом продукт экспрессии. Более того, применение *in vivo* TriMix мРНК, полученной из вектора по настоящему изобретению в модели рака мыши, приводит к более медленному росту опухолей и увеличению продолжительности жизни указанной мыши.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает нуклеотидный вектор, содержащий последовательность энхансера трансляции (TE), обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную под SEQ ID N°4.

В конкретном варианте осуществления транскрибируемая последовательность нуклеиновой кислоты выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.

В предпочтительном варианте осуществления энхансер трансляции представлен любой из SEQ ID N°1, 2, или 3, более конкретно, SEQ ID N° 1.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ повышения стабильности и/или эффективности трансляции РНК, полученной в результате транскрипции *in vitro*, при этом указанный способ включает стадии

(i) получения вектора согласно настоящему изобретению, где указанная транскрибируемая нуклеотидная последовательность представляет собой транскрибируемую последовательность ДНК, которая соответствует указанной РНК, которую необходимо получить в результате транскрипции, и

(ii) транскрибирования *in vitro* транскрибируемой последовательности ДНК;

В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулу РНК, содержащую энхансер трансляции (TE), обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную SEQ ID N°4.

Указанная молекула РНК может дополнительно содержать поли-А хвост.

В контексте молекул РНК по настоящему изобретению, указанная транслируемая нуклеотидная последовательность может быть выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.

В предпочтительном варианте осуществления молекул РНК энхансер трансляции представлен любой из SEQ ID N° 1, 2 или 3; более конкретно, SEQ ID N°1.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает композицию, содержащую одну или более молекул РНК согласно настоящему изобретению; более конкретно, указанная одна или несколько молекул РНК представляют собой молекулы мРНК, которые кодируют CD40L, CD70 и саTLR4.

Композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать мРНК, кодирующую антиген/болезнь-специфическую мРНК.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает применение молекулы(молекул) РНК и/или композиции(композиций), содержащих одну или более из указанных молекул РНК для множества целей, таких как, например, введение *in vivo* или *in vitro* в клетку-хозяина или применение в медицине.

Также аспектом настоящего изобретения является предоставление набора, содержащего один или более векторов, одну или более молекул РНК или композицию согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения нуждающегося в этом пациента с помощью одной или более молекул РНК или композиции согласно настоящему изобретению, где указанные молекулы РНК можно ввести одновременно или последовательно с интервалами.

Молекулы РНК или композиции согласно настоящему изобретению можно вводить нуждающемуся в этом пациенту при помощи любого подходящего пути введения, такого как, например, интранодальный, интрадермальный, интралимфатический и интраопухолевый. Более того, при лечении, например, онкопациентов, введение молекулы РНК или композиции согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации со способами высвобождения мРНК опухоли из опухоли у пациента, такими как, например, абляция или сонопорация.

СПИСОК УТВЕРЖДЕНИЙ ПО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

1. Нуклеотидный вектор, содержащий последовательность энхансера трансляции (TE), обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную SEQ ID N°4.
2. Нуклеотидный вектор по п.°1, где транскрибируемая нуклеотидная последовательность выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.
3. Нуклеотидный вектор по любому из пп.°1-2, где указанный энхансер трансляции представлен любой из SEQ ID N° 1, 2 или 3, более конкретно SEQ ID N° 1.
4. Способ повышения стабильности и/или эффективности трансляции РНК, полученной в результате транскрипции *in vitro*, при этом указанный способ включает стадии

(i) получения вектора по любому из пп.°1-3, где указанная транскрибируемая нуклеотидная последовательность представляет собой транскрибируемую последовательность ДНК, которая соответствует указанной РНК, которую необходимо получить в результате транскрипции, и

(ii) транскрибирования *in vitro* указанной транскрибируемой последовательности ДНК.

5. Молекула РНК, содержащая энхансер трансляции (TE), обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную SEQ ID N°4.

6. Молекула РНК по п.°5, дополнительно содержащая поли-А хвост.

7. Молекула РНК по любому из п.°5 или п. 6, где транскрибируемая нуклеотидная последовательность выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.

8. Молекула РНК по любому из пп.°5-7, где указанный энхансер трансляции представлен SEQ ID N° 1.

9. Композиция, содержащая одну или более молекул РНК, как указано в любом из пп.°5-8.

10. Композиция по п.°9, где указанная одна или более молекул РНК представляют собой молекулы мРНК, которые кодируют CD40L, CD70 и саTLR4.

11. Композиция по п.°10, дополнительно содержащая мРНК, кодирующую антиген/болезнь-специфическую мРНК.

12. Применение молекулы РНК по любому из пп.°5-8 или композиции по любому из пп.°9-11 для введения в клетку-хозяина.

13. Молекула РНК по любому из пп.°5-8 или композиция по любому из пп.°9-11 для применения в медицине.

14. Набор, содержащий один или более векторов по любому из пп.°1-3, одну или более молекул РНК по любому из пп.°5-8 или композицию по любому из пп.°9-11.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Что касается фигур, следует отметить, что показанные частные случаи служат только примером и в целях показательного обсуждения различных вариантов осуществления настоящего изобретения. Они присутствуют в виде представления того, что считается наиболее полезным и готовым описанием принципов и концептуальных аспектов настоящего изобретения. В этом отношении попытки показать структурные детали настоящего изобретения не производятся более детально, чем необходимо для фундаментального понимания настоящего изобретения. Описание дано вместе с графическими материалами, делая очевидным специалисту в данной области то, как множество форм настоящего изобретения могут быть осуществлены на практике.

Фиг. 1: iDC электропорировали с введением TriMix мРНК, кодируемой вектором рUC, вектором рUC-TE, вектором рUC-ENE или вектором рUC TE ENE. Показаны значения MFI (средней интенсивности флуоресценции) у положительной популяции DC. Данные представлены в виде среднего \pm SEM. (Парный *t*-критерий, * $P < 0,05$). N рUC = 6; N рUC-TE = 15; N рUC-ENE = 15; N рUC TE ENE = 19

Фиг. 2: Экспрессия WT1 у DC, электропорированных с введением WT1 мРНК. iDC электропорировали с введением WT1 мРНК, кодируемой различными векторами, и анализировали в отношении их экспрессии WT1 с помощью внутриклеточного окрашивания через 4ч, 24ч и 48ч после электропорации. Показано сравнение значений MFI после электропорации iDC с введением различных векторов, кодирующих WT1. Данные представлены в виде среднего \pm

SEM. (Парный *t*-критерий, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). N = 6

Фиг. 3: Кинетика экспрессии eGFP DC. iDC совместно электропорировали с введением eGFP и TriMix мРНК, кодируемой вектором pUC или вектором pUC TE ENE. Экспрессию eGFP анализировали через несколько временных отрезков после электропорации. Анализировали значение MFI eGFP-положительной популяции DC. Данные представлены в виде среднего \pm SEM. (Парный *t*-критерий, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). N = 9

Фиг. 4: Фенотип незрелых и зрелых DC. Изучали значения MFI указанных молекул через 24ч после электропорации iDC. Данные представлены в виде среднего \pm SEM. (Парный *t*-критерий, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). CD40 N = 9; CD70 N = 19; CD80 N = 12; CD 83 N = 12; CCR7 N = 12.

Фиг. 5: Модель двусторонней опухоли с P815: однократная обработка одной опухоли tNGFR в качестве контроля или pUC TE ENE TriMix. Контралатеральную, необрабатываемую опухоль использовали для оценки системного противоопухолевого иммунного ответа. Рост опухоли показан для каждой отдельной мыши на группу (n =6) с последующим осмотром объема средней опухоли. Выживаемость отображали на графике Каплана-Майера. Различия выживаемости анализировали при помощи логрангового критерия.

Фиг. 6: Модель двусторонней опухоли с P815: однократная обработка одной опухоли tNGFR или 0,8 объемами раствора Хартмана в качестве контроля. Контралатеральную, необрабатываемую опухоль использовали для оценки системного противоопухолевого иммунного ответа. Рост опухоли показан для каждой отдельной мыши на группу (n =6) с последующим осмотром объема средней опухоли. Выживаемость отображали на графике Каплана-Майера. Различия выживаемости анализировали при помощи логрангового критерия.

Фиг. 7: Вектор pUC TE ENE с его наиболее важными элементами.

Фиг. 8: Показывает сравнение последовательностей 3 вариабельных последовательностей TE (SEQ ID N° 1, 2 и 3), сделанное в Clustal 2.1 от EMBL.

Фиг. 9: (А) Экспрессия WT1 в DC, электропорированных с введением WT1 мРНК. iDC электропорировали с введением 10 мкг WT1 мРНК, кодируемой различными векторами, и анализировали в отношении их экспрессии WT1 с помощью внутриклеточного окрашивания через 4ч, 24ч и 48ч после электропорации. Показано сравнение значений MFI после электропорации iDC с введением различных векторов, кодирующих WT1. N = 3 (В) Экспрессия eGFP у DC, электропорированных с введением eGFP мРНК. iDC электропорировали с введением 10 мкг eGFP мРНК, кодируемой различными векторами, и анализировали в отношении их экспрессии eGFP с помощью внутриклеточного окрашивания через 4ч, 24ч и 48ч после электропорации. Показано сравнение значений MFI после электропорации iDC с введением различных векторов, кодирующих WT1. N = 3

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает нуклеотидный вектор, содержащий энхансер трансляции (TE) и последовательность удержания в ядре. Более конкретно, указанный нуклеотидный вектор содержит последовательность энхансера трансляции (TE), обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную SEQ ID N°4.

Термин “вектор” здесь используется в своем наиболее общем значении и включает любые промежуточные носители для нуклеиновой кислоты, которые, например, позволяют указанной нуклеиновой кислоте быть введенной в прокариотические и/или эукариотические клетки-хозяева и, где уместно, интегрироваться в геном. Данные векторы предпочтительно реплицируются и/или экспрессируются в клетке. Векторы включают плазмиды, фагмиды или геномы вирусов. Используемый в данном документе термин «плазмида» в общем относится к конструкции внехромосомного генетического материала, обычно дуплекса кольцевой ДНК, который может реплицироваться независимо

от хромосомной ДНК.

Согласно настоящему изобретению, молекула нуклеиновой кислоты или нуклеотидная последовательность относится к нуклеиновой кислоте, которая представляет собой предпочтительно дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК). Согласно настоящему изобретению, нуклеиновые кислоты включают геномные ДНК, cDNA, мРНК, рекомбинантно созданные и химически синтезированные молекулы. Согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота может быть в виде одноцепочечной или двухцепочечной и линейной или ковалентно замкнутой циклической молекулы. Термин «нуклеиновая кислота» также еще и включает химическую дериватизацию нуклеиновой кислоты по нуклеотидному основанию, по сахару или по фосфату, а также нуклеиновую кислоту, содержащую искусственные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги.

Нуклеиновые кислоты, описанные согласно настоящему изобретению, являются предпочтительно изолированными. Термин «изолированная нуклеиновая кислота» согласно настоящему изобретению означает, что нуклеиновая кислота 1/ амплифицировалась *in vitro*, например, путем полимеразной цепной реакции (PCR); 2/ образовалась рекомбинантно при помощи клонирования; 3/ очищена, например, путем расщепления и гель-электрофоретического фракционирования; или 4/ синтезировалась, например, путем химического синтеза. Изолированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, доступную для воздействия при помощи технологий рекомбинантных ДНК.

5' энхансер трансляции (TE)

Посттранскрипционная регуляция трансляции главным образом контролируется в фазе инициации трансляции. Комплекс факторов инициации связывается со структурой 5'CAP и проводит рекрутинг субъединиц рибосом. Данный комплекс затем начинает сканирование вдоль мРНК, пока не встретится кодон AUG в подходящем контексте. Эффективность данного процесса может контролироваться множеством структурных признаков как на 5', так и 3' UTR

(UnTranslated Regions (нетранслируемых участках)) мРНК. Данные признаки включают TOP (Terminal OligoPyrimidine tract (терминальный олигопиримидиновый тракт)), IRES (Internal Ribosome Entry Site (сайт внутренней посадки рибосомы)) и слева от ORF (Open Reading Frames (открытых рамок считывания)) на 5' UTR. На 3' UTR были описаны мотивы CITE (Cap Independent Translation Enhancer (CAP-независимого энхансера трансляции)). Также было показано, что длина поли-А хвоста играет важную роль в инициации трансляции, поскольку PABP (Poly-A Binding Protein (поли(А)-связывающий белок)) нуждается в ассоциации как с поли-А хвостом, так и комплексом eIF4 на сайте CAP.

IRES представляет собой мотив, способный к рекрутингу рибосом независимо от взаимодействия со структурой 5'CAP. Первые элементы IRES были описаны у пикорнавирусов (например, EMCV, EncephaloMyoCarditisVirus (вирус энцефаломиокардита)). Во время инфекции CAP-зависимая трансляция прекращается, давая преимущество CAP-независимой трансляции белков вируса. Множество последовательностей эукариотических IRES было описано в последние годы. В стрессовых условиях CAP-зависимая трансляция подавляется, в то время как CAP-независимая трансляция некоторых важных генов может продолжаться. Более конкретно, дендритные клетки, активированные при помощи, например, лигирования LPS на толл-подобном рецепторе 4, также останавливают CAP-зависимую трансляцию, в то время как CAP-независимая трансляция некоторых генов защищает клетки от апоптоза.

Hu и др. изучали последовательность на 5' лидерной мРНК, кодирующей гомеодомен-содержащий белок Gtx мыши. Ими было описана последовательность, которая является комплементарной последовательностям в рибосомальной 18S-РНК. Ими было обнаружено, что данный мотив обладал глубоким влиянием на эффективность трансляции (Hu и др., 1999 г.).

Позже было показано, что данный мотив функционирует как сайт внутренней посадки рибосомы (IRES), а также показано, что более короткие

неперекрывающиеся сегменты данной 5' лидерной последовательности способны усиливать трансляцию второго цистрона в двухцистронной мРНК. Один из этих сегментов был 9 нуклеотидов в длину, и когда множественные копии элемента IRES были связаны вместе, активность IRES сильно повышалась. Было показано, что тандемный повтор одного и того же 9 н. сегмента, отделенный промежутками 9 н. фрагментов 5' UTR бета-глобулина человека, функционировал как энхансер трансляции (TE) в моноцистронной мРНК при размещении на 5'-конце мРНК, перед ORF.

Следовательно, в контексте настоящего изобретения можно использовать любую последовательность, функционирующую как энхансер трансляции мРНК, например те элементы, которые были описаны в данном документе выше. В частности, энхансер трансляции представляет собой последовательность в полученной в результате транскрипции РНК, которая способствует трансляции. Один возможный способ действия заключается в усилении связывания рибосомы с 5'-концом мРНК.

В конкретном примере вектор согласно настоящему изобретению может иметь РНК, которая содержит 10-кратный тандемный повтор 9 н. последовательности дикого типа от лидерной последовательности Gtx: CCGGCGGGT. Данные мотивы связаны по 9 н. последовательности, полученной из 5' UTR бета-глобулина человека: TTCTGACAT. Данный фрагмент ДНК можно клонировать в плазмиду между последовательностью промотора бактериофага и ORF (открытой рамки считывания).

В конкретном варианте осуществления энхансер трансляции согласно настоящему изобретению обладает по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1. Как видно из Фигуры 8, SEQ ID N° 2 и 3 обладают идентичностью последовательности по меньшей мере 80% в сравнении с SEQ ID N°1, и, таким образом, являются подходящими для использования в связи с настоящим изобретением. Более предпочтительно, энхансер трансляции согласно настоящему изобретению обладает по меньшей

мере 85%, 86%, 87%, 88% или 89% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1. Как видно из Фигуры 8, SEQ ID N° 2 и 3 обладают идентичностью последовательности по меньшей мере 85% в сравнении с SEQ ID N°1. Еще более предпочтительно, энхансер трансляции согласно настоящему изобретению обладает по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% или 100% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1. Как видно из Фигуры 8, SEQ ID N° 3 обладает идентичностью последовательности по меньшей мере 90% в сравнении с SEQ ID N°1. Еще более предпочтительно, энхансер трансляции представлен любой из SEQ ID N°1, 2 или 3, более предпочтительно SEQ ID N°1.

Последовательность удержания в ядре

Важность процессов посттранскрипционного генетического контроля стала все больше и больше видимой в последние годы. Среди этих процессов тот, который начал получать значительное внимание, является контролем стабильности мРНК. По мере растущего признания, что деградация мРНК обладает глубоким влиянием на экспрессию генов и что уровни распада мРНК можно модулировать в ответ на сигналы окружающей среды и сигналы развития, сейчас имеют место активные исследовательские усилия, направленные на понимание этого процесса. Был достигнут значительный успех, и исследования в течение последних 20 лет прояснили определенное число общих признаков деградации мРНК.

Как клеточные, так и вирусные мРНК подвергаются устойчивым путям распада РНК. У вирусов развились различные способы для защиты их мРНК от механизмов деаденилирования хозяина. Полиаденилированная нетранслируемая РНК (PAN) саркомы Капоши, связанной с вирусом герпеса (KSHV), является очень распространенной в ядре инфицированных клеток. Данная РНК является устойчивой к деаденилированию и деградации. Накопление PAN зависит от активности элемента РНК из 79 нуклеотидов в 3' участке, названного ENE (элементом, ответственным за экспрессию и удержание в ядре). Conrad и др. в

2005 году опубликовали первую статью, связанную с ENE, описывая его как элемент РНК вируса саркомы Капоши, который обеспечил повышенную распространенность в ядре безинтронных транскриптов (Conrad, 2005 г.). Фрагмент ENE содержит специфическую U-богатую структуру типа «шпилька», взаимодействующую с поли-А хвостом. В связи с этим, получается вторичная структура, которая приводит к удержанию в ядре РНК и, следовательно, названная Nuclear Retention Element (элементом удержания в ядре). Вторичным эффектом является взаимодействие U-богатой структуры типа «шпилька» с поли-А хвостом мРНК, приводящее к эффекту «экранирования» от деградации хозяином, признаку, который представляет особый интерес при получении мРНК для иммунотерапевтических целей.

Полиаденилированная ядерная (PAN) РНК (также известная как T1.1 или nut-1 РНК) представляет собой lncRNA, полученную при помощи онкогенного гаммагерпесвируса, герпесвируса, связанного с саркомой Капоши (KSHV) (Sun и др., 1996 г.). PAN РНК накапливается до необычайно высоких уровней (~ 500000 копий/клетка) на протяжении литической инфекции и является необходимой для выработки поздних вирусных белков и инфекционного вируса (Sun и др., 1996 г.). Элемент, ответственный за экспрессию и удержание в ядре (ENE), расположенный в ~120 нуклеотидах слева от сайта полиаденилирования PAN РНК, является важным для этой высокой аккумуляции в ядре (Conrad и Steitz, 2005 г.). ENE ингибирует быстрый распад PAN RNA путем блокирования деаденилирования (Conrad и др., 2006 г.). PAN RNA не приводит к экспрессии белка. Удержание в ядре предохраняет РНК от аппарата трансляции в цитоплазме, в тоже время экранирование поли-А хвоста препятствует связыванию с PABP (поли(А)-связывающим белком), который является важным для трансляции. Следовательно, применение данной последовательности при трансфекции не является очевидным.

KSHV ENE представляет собой элемент РНК 79 нуклеотидов в длину, состоящий из структуры типа «петля-на-стебле» с асимметричной внутренней U-богатой петлей, которая в соединении с близлежащими парами оснований

формирует функциональное ядро ENE. Кристаллическая структура ядра ENE, связанного с олиго(A)₉, выявила 5 последовательных U-A-U триплета оснований, образованных между U-богатой петлей и олиго(A)₉ (Mitton-Fry и др., 2010 г.), при этом удлинение происходит за счет взаимодействий А-минорного мотива с тремя парами оснований G-C нижнего стебля. Генетический и биохимический анализы отмечают похожие взаимодействия между поли-А хвостом PAN РНК и ENE in vivo (Mitton-Fry и др., 2010 г.).

Следовательно, в контексте настоящего изобретения можно использовать любую последовательность, функционирующую как элемент удержания в ядре мРНК, например, те элементы, которые были описаны в данном документе выше. В частности, элемент удержания в ядре представляет собой действующую в *цис*-положении последовательность, которая обладает способностью защищать мРНК от цитоплазматического распада.

В конкретном варианте осуществления элемент удержания в ядре также функционирует как последовательность, стабилизирующая РНК.

В конкретном примере элемент удержания в ядре представляет собой элемент, ответственный за экспрессию и удержание в ядре KSHV. Последовательность 79 п.о., выделенная из PAN (Poly Adenylated Non translated (полиаденилированной нетранслируемой)) РНК, расположена слева от участка A124 плазмиды для получения РНК. ENE формирует U-богатую петлю, которая связывается с поли-А хвостом и защищает его от деградаци.

В конкретном варианте осуществления элемент удержания в ядре согласно настоящему изобретению представлен SEQ ID N°4.

Дополнительные элементы в векторе по настоящему изобретению

В дополнительном варианте осуществления нуклеотидный вектор по настоящему изобретению может содержать дополнительные элементы, выбранные из списка, включающего промотор бактериофага, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и поли-А

хвост.

Матричная РНК или рибонуклеиновая кислота (мРНК) состоит из одноцепочечного полимера из 4 нуклеотидов (аденозин-, гуанозин-, цитидин- и уридинмонофосфата). 5'-конец модификации или 5'CAP необходим для распознавания мРНК комплексом инициации трансляции, правильного прикрепления мРНК к рибосомам, а также для защиты от 5' экзонуклеаз. Данная модификация состоит из нуклеотида 7-метилгуанозина, добавленного к первому транскрибированному нуклеотиду. Кодированный участок начинается старт-кодоном (обычно AUG) и заканчивается стоп-кодоном (обычно UAA, UAG или UGA). Перед старт-кодоном и после стоп-кодона, зрелая мРНК содержит 5' нетранслируемый участок (UTR) и 3' UTR. Данные участки способствуют стабильности или нестабильности мРНК и трансляционной эффективности.

Транскрибируемая нуклеотидная последовательность, в частности, нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или белок, и последовательность контроля экспрессии являются «функционально» связаны друг с другом, если они ковалентно связаны друг с другом таким образом, что транскрипция или экспрессия транскрибируемой и, в частности, кодирующей нуклеиновой кислоты находится под контролем или под влиянием последовательности контроля экспрессии.

Обозначенные в данном документе нуклеиновые кислоты, в частности, транскрибируемые и кодирующие нуклеиновые кислоты могут находиться в сочетании с любой последовательностью контроля экспрессии, в частности, с промоторами, которые могут быть гомологичными или гетерологичными данным нуклеиновым кислотам, при этом термин «гомологичный» относится к тому факту, что нуклеиновая кислота также естественным образом функционально связана с последовательностью контроля экспрессии, а термин «гетерологичный» относится к тому факту, что нуклеиновая кислота естественным образом функционально не связана с последовательностью контроля экспрессии.

Термин «последовательности контроля экспрессии» включает согласно настоящему изобретению промоторы, последовательности, связывающие рибосомы и другие элементы контроля, которые контролируют транскрипцию гена или трансляцию полученной РНК. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности контроля экспрессии можно регулировать. Точная структура последовательностей контроля экспрессии может варьироваться в зависимости от вида или типа клетки, но обычно включает 5'-нетранскрибируемые и 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности, включенные в инициацию транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-боксы, копирующая последовательность, последовательность СААТ и подобное. Более конкретно, 5'-нетранскрибируемые последовательности контроля экспрессии включают участок промотора, который содержит в себе последовательность промотора для контроля транскрипции функционально связанного гена. Последовательности контроля экспрессии также могут включать последовательности энхансеров или вышележащие активирующие последовательности.

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота является функционально связанной согласно настоящему изобретению с последовательностями контроля экспрессии, которые могут быть гомологичными или гетерологичными в зависимости от нуклеиновой кислоты.

Термин «промотор» или «участок промотора» относится к последовательности ДНК слева от (5') кодирующей последовательности гена, который контролирует экспрессию указанной кодирующей последовательности, обеспечивая узнавание и сайт связывания для РНК-полимеразы. Участок промотора может включать дополнительно сайты распознавания или связывания для дополнительных факторов, включенных в регуляцию транскрипции указанного гена. Промотор может контролировать транскрипцию прокариотического или эукариотического гена. Промотор может быть «индуцируемым» и инициировать транскрипцию в ответ на индуктор или может быть «конститутивным», если транскрипция не контролируется индуктором. Если индуктор отсутствует, то индуцируемый

промотор экспрессируется только в очень малом количестве или совсем не экспрессируется. В присутствии индуктора ген «включается», другими словами уровень транскрипции повышается. Это обычно медируется при помощи связывания специфического фактора транскрипции.

В конкретном варианте осуществления транскрибируемая нуклеотидная последовательность выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L (NM_000074), CD70 (NM_001252), саTLR4 ((укороченную версию гена TLR4 человека, которая содержит только трансмембранный и цитоплазматический участки гена, расположенные перед сигнальным пептидом LAMP1 (гликопротеином лизосомальной мембраны)) или антиген/болезнь-специфическую мРНК.

Промотор бактериофага согласно настоящему изобретению может быть любым промотором, приемлемым для транскрипции РНК, и предпочтительно выбран из списка, включающего промотор T7, промотор SP6 и промотор T3, более конкретно, промотор T7.

Используемый в контексте настоящего изобретения поли-А хвост предпочтительно состоит из приблизительно 100-150 аденозинов, более конкретно, 120-125 аденозинов, предпочтительно приблизительно 124 аденозинов.

Термины «полиадениловая кассета» или «последовательность поли(А)» относятся к последовательности остатков аденила, которая обычно расположена на 3'-конце молекулы РНК. Настоящее изобретение предусматривает, что данная последовательность будет прикреплена во время транскрипции РНК по пути матричной ДНК на основании повторяющихся остатков тимидила в цепи, комплементарной кодирующей цепи, где указанная последовательность в норме не кодируется в ДНК, но прикреплена к свободному 3'-концу РНК при помощи независимой от матрицы РНК-полимеразы после транскрипции в ядре. Согласно настоящему изобретению последовательность поли(А) данного типа подразумевается как значение нуклеотидной последовательности по меньшей

мере 20, предпочтительно по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 80, предпочтительно по меньшей мере 100 и предпочтительно до 500, предпочтительно до 400, предпочтительно до 300, предпочтительно до 200, и, в частности, до 150 последовательных нуклеотидов А, и, в частности, приблизительно 120 последовательных нуклеотидов А, где термин «нуклеотиды А» относится к остаткам аденила.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает молекулу РНК, получаемую путем транскрипции нуклеотидного вектора согласно настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ повышения стабильности и/или эффективности трансляции РНК, полученной в результате транскрипции *in vitro*, при этом указанный способ включает стадии

(i) получения вектора согласно настоящему изобретению, где указанная транскрибируемая нуклеотидная последовательность представляет собой транскрибируемую последовательность ДНК, которая соответствует указанной РНК, которую необходимо получить в результате транскрипции, и

(ii) транскрибирования *in vitro* транскрибируемой последовательности ДНК,

а также молекулу РНК, получаемую указанным способом.

Согласно настоящему изобретению термин «транскрипция» включает «транскрипцию *in vitro*», где термин «транскрипция *in vitro*» относится к способу, с помощью которого РНК, в частности, мРНК, синтезируется *in vitro* вне клетки. Получение транскриптов предпочтительно используется в клонирующих векторах, которые обычно именуется транскрипционными векторами и которые включены согласно настоящему изобретению под термином «вектор».

Термин «нуклеотидная последовательность, транскрибированная из нуклеотидной последовательности» относится к РНК, где уместно, к части целой

молекулы РНК, которая представляет собой продукт транскрипции последней нуклеотидной последовательности.

Термин «нуклеиновые кислоты, которые можно транскрибировать, чтобы получить общий транскрипт» означает, что указанные нуклеиновые кислоты функционально сцеплены друг с другом таким образом, что, где уместно, после линеаризации, такой как расщепление рестриктазой молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей указанные нуклеиновые кислоты, в частности, замкнутой циклической молекулы нуклеиновой кислоты, транскрипция под контролем промотора приводит к молекуле РНК, содержащей транскрипты указанных нуклеиновых кислот, связанные друг с другом, где уместно, отделенные от расположенных между последовательностей.

Согласно настоящему изобретению, термин «экспрессия» используется в наиболее общем значении и включает выработку РНК и/или белка. Он также включает частичную экспрессию нуклеиновых кислот. Более того, экспрессия может быть временной или постоянной. В отношении РНК, термин «экспрессия» или «трансляция» относится, в частности, к выработке пептидов или белков.

Термин «нуклеотидная последовательность, активная для увеличения эффективности трансляции и/или стабильности нуклеотидной последовательности» означает, что первая нуклеиновая кислота способна модифицировать, в общем транскрипте со второй нуклеиновой кислотой, эффективность трансляции и/или стабильность указанной второй нуклеиновой кислоты таким образом, что указанная эффективность трансляции и/или стабильность повышается в сравнении с эффективностью трансляции и/или стабильности указанной второй нуклеиновой кислоты без указанной первой нуклеиновой кислоты. В данном контексте термин «эффективность трансляции» относится к количеству продукта трансляции от молекулы РНК в пределах определенного периода времени и термин «стабильность» относится к периоду полураспада молекулы РНК.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулу РНК, содержащую энхансер трансляции (TE) и элемент удержания в ядре (ENE), или композицию, содержащую одну или более указанных молекул РНК. Более конкретно, настоящее изобретение предусматривает молекулу РНК, содержащую энхансер трансляции (TE), обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную в SEQ ID N°4, или композицию, содержащую указанную молекулу РНК.

Указанная молекула РНК может дополнительно содержать один или более элементов, выбранных из списка, включающего транслируемую нуклеотидную последовательность и поли-А хвост, где указанная транслируемая нуклеотидная последовательность может быть выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.

В контексте настоящего изобретения элемент TE предпочтительно расположен на 5'-конце транскрибируемой/транслируемой молекулы РНК и последовательность удержания в ядре (ENE) предпочтительно расположена на 3'-конце.

«3'-конец нуклеиновой кислоты» относится согласно настоящему изобретению к тому концу, который имеет свободную гидроксильную группу. «5'-конец нуклеиновой кислоты» относится согласно настоящему изобретению к тому концу, который имеет свободную фосфатную группу.

В контексте настоящего изобретения «мРНК» означает «матричную РНК» и относится к транскрипту, который вырабатывается при помощи ДНК в качестве матрицы, и который сам по себе кодирует пептид или белок. мРНК обычно содержит 5'-нетранслируемый участок, участок, кодирующий белок, и 3'-нетранслируемый участок. мРНК обладает ограниченным периодом полураспада в клетках. Согласно настоящему изобретению, мРНК может быть получена из

матрицы ДНК путем транскрипции *in vitro*. Она может быть модифицирована при помощи дополнительных стабилизирующих модификаций и кэпирования, в дополнение к модификациям согласно настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению содержит мРНК, кодирующую CD40L, CD70 и саTLR4 как в комбинации, так и без комбинации с мРНК, кодирующей антиген/болезнь-специфическую мРНК.

Антиген/болезнь-специфическая мРНК согласно настоящему изобретению может быть выбрана из неограниченного списка, включающего опухолевые антигены, антигены, произведенные патогенами, аллергены.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает применение молекулы(молекул) РНК и/или композиции(композиций), содержащих одну или более из указанных молекул РНК для множества целей, таких как, например, введение *in vivo* или *in vitro* в клетку-хозяина или для применения в медицине.

Также аспектом настоящего изобретения является предоставление набора, содержащего один или более векторов, одну или более молекул РНК, или композицию согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения нуждающегося в этом пациента с помощью одной или более молекул РНК или композиции согласно настоящему изобретению, где указанные молекулы РНК можно ввести одновременно или последовательно с интервалами.

Настоящее изобретение предусматривает нуклеиновые кислоты, в частности, РНК для введения пациенту. Нуклеиновые кислоты можно ввести способами *ex vivo*, т. е. путем удаления клеток из пациента, генетического модифицирования указанных клеток (например, при помощи трансфекции) и повторного введения модифицированных клеток пациенту. Методы трансфекции и трансдукции хорошо известны специалисту в данной области. Настоящее изобретение также предусматривает нуклеиновые кислоты для введения *in vivo*.

Согласно настоящему изобретению, термин «трансфекция» относится к введению одной или более нуклеиновых кислот в организм или в клетку-хозяина. Можно применить различные методы для введения согласно настоящему изобретению нуклеиновых кислот в клетки *in vitro* или *in vivo*. Данные методы включают трансфекцию осадков нуклеиновая кислота- CaPO_4 , трансфекцию нуклеиновых кислот, сопряженных с DEAE, трансфекцию инфекции с вирусами, переносящими нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, трансфекцию, опосредованную липосомами, и подобное. В конкретных вариантах осуществления предпочтение дают направлению нуклеиновых кислот в конкретные клетки. В таких вариантах осуществления применяемый для введения нуклеиновой кислоты в клетку носитель (например, ретровирус или липосома) может обладать связью с целевой молекулой. Например, такая молекула, как антитело, специфичное белку поверхности мембраны целевой клетки, или лиганд рецептора целевой клетки может быть объединена или связана с носителем нуклеиновой кислоты. Если необходимо введение нуклеиновой кислоты посредством липосом, белки, связанные с поверхностью мембраны, сопряженные с эндоцитозом, могут быть включены в состав липосомы для обеспечения таргетирования и/или абсорбции. Такие белки включают капсидные белки или их фрагменты, специфичные конкретному типу клеток, антитела к белкам, которые являются интернализированными, белки, нацеленные на внутриклеточный сайт, и подобное.

Молекулы РНК или композиции согласно настоящему изобретению можно вводить нуждающемуся в этом пациенту при помощи любого подходящего пути введения, такого как, например, интранодальный, интрадермальный, интралимфатический и интраопухолевый. Более того, при лечении, например, онкопациентов, введение молекулы РНК или композиции согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации со способами высвобождения мРНК опухоли из опухоли у пациента, такими как, например, абляция или сонопорация.

Согласно настоящему изобретению, можно применять стандартные способы

получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, культивирования клеток, в частности, электропорацию и липофекцию. Ферментативные реакции проводят согласно инструкции производителя или способом, известным per se.

Согласно настоящему изобретению, «нуклеотидная последовательность, полученная из нуклеотидной последовательности» относится к нуклеиновой кислоте, которая содержит, в сравнении с нуклеиновой кислотой, из которой ее получили, одну или множество нуклеотидных замен, делеций и/или дополнений, которая является предпочтительно комплементарной нуклеиновой кислоте, из которой ее получили, т. е. существует определенная степень гомологии между указанными нуклеиновыми кислотами, и нуклеотидные последовательности указанных нуклеиновых кислот соответствуют в значительной степени прямым или комплементарным образом.

Согласно настоящему изобретению, нуклеотидная последовательность, полученная из нуклеотидной последовательности, обладает функциональным свойством нуклеотидной кислоты, из которой она была получена. Подобные функциональные свойства включают, в частности, способность повышать, в функциональной связи с нуклеиновой кислотой, которая может транскрибироваться в РНК (транскрибируемой нуклеотидной последовательностью), стабильность и/или эффективность трансляции РНК, полученной от данной нуклеиновой кислоты, в полной молекуле РНК.

Нуклеиновая кислота является «комплементарной» другой нуклеиновой кислоте, если две последовательности способны гибридизироваться друг с другом и образовывать стабильный дуплекс, при этом указанная гибридизация проводится предпочтительно в условиях, которые допускают специфичную гибридизацию между полинуклеотидами (жестких условиях). Жесткие условия описаны, например, в *Molecular Cloning: A laboratory manual*, J Sambrook et al.

Согласно настоящему изобретению, комплементарные нуклеиновые кислоты обладают нуклеотидами, которые характеризуются по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, и

предпочтительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью.

Согласно настоящему изобретению, предполагают, что первый полинуклеотидный участок расположен правее второго полинуклеотидного участка, если 5'-конец указанного первого полинуклеотидного участка является частью указанного первого полинуклеотидного участка, наиболее близкой 3'-концу указанного второго полинуклеотидного участка.

3'-нетранслируемый участок обычно пролегает от кодона терминации продукта трансляции до последовательности поли-А, которая обычно прикрепляется после процесса транскрипции. 3'-нетранслируемые участки мРНК млекопитающих обычно обладают гомологичным участком, известным как гексануклеотидная последовательность AAUAAA. По-видимому, данная последовательность представляет собой сигнал прикрепления поли-А и часто расположена на 10-30 оснований слева от сайта прикрепления поли-А.

3'-нетранслируемые участки могут содержать один или более инвертированных повторов, которые могут сворачиваться с образованием структур типа «петля-на-стебле», которые действуют как барьеры для экзорибонуклеаз или взаимодействуют с белками, известными повышением стабильности РНК (например, РНК-связывающими белками).

5'- и/или 3'- нетранслируемые участки могут, согласно настоящему изобретению, быть функционально связанными с транскрибируемой и, в частности, кодирующей нуклеотидной кислотой, так что для данных участков, подлежащих сопряжению с нуклеиновой кислотой таким образом повышаются стабильность и/или эффективность трансляции РНК, транскрибированной от указанной транскрибируемой нуклеиновой кислоты.

Согласно настоящему изобретению, термин «ген» относится к конкретной нуклеотидной последовательности, которая отвечает за выработку одного или более клеточных продуктов и/или за обеспечение одного или более клеточных

продуктов и/или за обеспечение одной или более межклеточных или внутриклеточных функций. Более конкретно, указанный термин относится к секции ДНК, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретный белок или функциональную или структурную молекулу РНК.

Согласно настоящему изобретению, термин «клетка-хозяин» относится к любой клетке, которую можно трансформировать или трансфектировать при помощи экзогенной нуклеиновой кислоты. Термин «клетка-хозяин» включает, согласно настоящему изобретению, прокариотические (например, *E. coli*) или эукариотические клетки (например, клетки дрожжей и клетки насекомых). Конкретное предпочтение отдают клеткам млекопитающих, таким как клетки людей, мышей, хомяков, свиней, коз и приматов. Клетки могут быть получены из множества типов тканей и включают зародышевые клетки и клеточные линии. Конкретные примеры включают кератиноциты, лейкоциты периферической крови, стволовые клетки костного мозга и эмбриональные стволовые клетки. В других вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой антигенпрезентирующую клетку, в частности, дендритную клетку, моноцит или макрофаг. Нуклеиновая кислота может присутствовать в клетке-хозяине в единичной или во множестве копий и в одном варианте осуществления экспрессируется в клетке-хозяине.

Согласно настоящему изобретению пептид или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, может быть пептидом или белком, расположенным в цитоплазме, в ядре, в мембране, в органеллах или в секретируемой форме. Они включают структурные белки, регуляторные белки, гормоны, нейротрансмиттеры, факторы, регулирующие рост, факторы дифференцировки, факторы регуляции экспрессии генов, белки, связанные с ДНК, ферменты, сывороточные белки, рецепторы, лекарственные препараты, иммуномодуляторы, онкогены, токсины, опухолевые антигены или антигены. Указанные пептиды или белки могут содержать природную последовательность или мутантную последовательность для повышения, ингибирования, регулирования или отмены их биологической активности.

Термин «пептид» относится к веществам, которые содержат две или более, предпочтительно 3 или более, предпочтительно 4 или более, предпочтительно 6 или более, предпочтительно 8 или более, предпочтительно 10 или более, предпочтительно 13 или более, предпочтительно 16 или более, предпочтительно 100 или предпочтительно 150 последовательные аминокислоты, связанные друг с другом пептидными связями. Термин «белок» относится к крупным пептидам, предпочтительно пептидам, имеющим по меньшей мере 151 аминокислоту, но термины «пептид» и «белок» обычно используются в данном документе как синонимы. Термины «пептид» и «белок» включают согласно настоящему изобретению вещества, которые содержат не только аминокислотные компоненты, но также и неаминокислотные компоненты, такие как сахара и фосфатные структуры, а также содержат вещества, содержащие такие связи как сложноэфирную, тиоэфирную или дисульфидную связи.

«Репортер» относится к молекуле, обычно пептиду или белку, которая кодируется репортерным геном и измеряется при помощи анализа по гену-репортеру. Общепринятые системы обычно используют ферментативный репортер и измеряют активность указанного репортера.

Согласно настоящему изобретению два элемента, такие как нуклеотиды или аминокислоты, являются последовательными, если они непосредственно расположены рядом друг с другом без каких-либо интервалов.

«Эндонуклеазы рестрикции» или «рестриктазы» относятся к классу ферментов, которые расщепляют фосфодиэфирные связи в обеих цепях молекулы ДНК в специфичных последовательностях оснований. Они распознают специфичные сайты связывания, именуемые последовательностями распознавания, на двухцепочечной молекуле ДНК. Сайты, на которых указанные фосфодиэфирные связи в ДНК расщепляются указанными ферментами, именуются сайтами расщепления. В случае с ферментами типа PIS, сайт расщепления расположен на определенном расстоянии от сайта связывания ДНК.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Областью применения настоящего изобретения является вакцинация, т. е. применение модифицированной мРНК для инокуляции или применение фармацевтической композиции, содержащей модифицированную мРНК в качестве агента инокуляции, или применение модифицированной мРНК при приготовлении фармацевтической композиции в целях инокуляции. Вакцинация основана на введении антигена в организм или субъект, в частности, в клетку организма или субъекта. В контексте настоящего изобретения генетическая информация, кодирующая антиген, вводится в организм или субъект в форме модифицированной мРНК, кодирующей антиген и/или различные цепи TriMix мРНК. Модифицированная «антигенная» мРНК, содержащаяся в фармацевтической композиции, транслируется в антиген, т. е. экспрессируется полипептид или антигенный пептид, кодируемый модифицированной мРНК, и стимулируется иммунный ответ, направленный против полипептида или антигенного пептида. Для вакцинации против патогенного организма, например, вируса, бактерии или простейшего, можно применить антиген клеточной поверхности данного организма, против которого вызывается иммунный ответ. В контексте настоящего изобретения в качестве вакцины можно применять фармацевтическую композицию, содержащую модифицированную мРНК, кодирующую данный антиген клеточной поверхности. В случаях применения, где для лечения рака применяют генетическую вакцину, иммунный ответ направлен против опухолевых антигенов путем создания модифицированной мРНК, кодирующей опухолевый антиген(антигены), в частности, белок, который экспрессируется исключительно в раковых клетках. Данную модифицированную мРНК, кодирующую опухолевый антиген, можно применять одну или в качестве компонента фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, где введение или модифицированной мРНК, или ее композиции приводит к экспрессии ракового антигена(антигенов) в организме. Иммунный ответ к такой вакцине у субъекта вакцинации, следовательно, подтвердил бы степень защитного иммунитета против типов рака, сопряженную с иммунизирующим раковым антигеном. Альтернативно, данные меры можно применять для вакцинации онкопациента модифицированной мРНК, кодирующей раковый

антиген(антигены), экспрессируемый в раковых клетках пациента, чтобы стимулировать иммунный ответ онкопациента для атаки на любые раковые клетки, экспрессирующие кодируемый антиген.

Для случаев применения генной терапии, например, где применяют фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, модифицированная мРНК в этом случае кодирует по меньшей мере один биологически активный пептид или полипептид, который у подлежащего лечению пациента не образуется или образуется только незначительно или дефектно. Введение данному пациенту модифицированной мРНК, кодирующей по меньшей мере один биологически активный пептид или полипептид или их композицию, следовательно, по меньшей мере частично восстанавливает экспрессию и/или активность по меньшей мере одного биологически активного пептида или полипептида у пациента и, в связи с этим, дополняет генетический дефект пациента. Прямое введение нормального, функционального гена живому животному изучали в качестве способа замены дефектной генетической информации. В данных исследованиях нуклеотидные последовательности вводят непосредственно в клетки живого животного. Соответственно, примеры полипептидов, кодируемых модифицированной мРНК по настоящему изобретению включают, без ограничений, дистрофин, канал-переносчик для ионов хлора, который дефективно изменяется при муковисцидозе, ферменты, которые недостаточны или дефектны при метаболических нарушениях, таких как фенилкетонурия, галактоземия, гомоцистинурия, аденозиндезаминазная недостаточность и т. д., а также ферменты, которые включены в синтез нейротрансмиттеров, таких как допамин, норэпинефрин и ГАБА, в частности, тирозингидроксилаза и DOPA декарбоксилаза, а также альфа-1-антитрипсин и т. д. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также можно применять для влияния на экспрессию рецепторов клеточной поверхности и/или партнеров по связыванию рецепторов клеточной поверхности при помощи модифицированной мРНК, содержащейся в них, которая кодирует данные биологически активные белки или пептиды. Примеры подобных белков, присутствующих внеклеточно или связанных с рецепторами клеточной

поверхности, включают, например, тканевой активатор плазминогена (ТРА), гормоны роста, инсулин, интерфероны, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), а также эритропоэтин (ЕРО) и т. д.

Путем подбора подходящих факторов роста, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно, например, применить для регенерации ткани или для взаимодействия со стволовыми клетками. Вследствие этого, можно лечить заболевания, которые, например, характеризуются дегенерацией ткани, среди которых нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и т. д., а также другие дегенеративные состояния, такие как артроз. В этих случаях модифицированная мРНК, в частности, которая содержится в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, предпочтительно кодирует, без ограничений, член семейства TGF-Бета, нейротрофические факторы, такие как NGF, нейротропины и т. д.

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

Настоящее изобретение, таким образом, дополнительно предусматривает способ предупреждения и/или лечения по меньшей мере одного заболевания или нарушения, выбранного из неограниченного списка, включающего рак, аллергию и инфекционные заболевания, такие как бактериальные, вирусные или грибковые инфекции, например, ВИЧ-инфекция или гепатит.

Используемые в ходе всего описания термины «рак» и/или «опухоль» не предназначены для ограничения типов рака или опухолей, которые могли быть проиллюстрированы на примере. Термин, следовательно, охватывает все пролиферативные нарушения, такие как неоплазма, дисплазия, предопухолевые или предраковые поражения, ненормальный рост клеток, доброкачественные опухоли, злокачественные опухоли, рак или метастазы, где рак выбран из группы, состоящей из лейкемии, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака CNS, меланомы, рака яичников, рака почки, рака простаты, рака груди, глиомы, рака толстой кишки, рака мочевого пузыря, саркомы, рака поджелудочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака

головы и шеи, рака печени, рака костей, рака костного мозга, рака желудка, рака двенадцатиперстной кишки, рака пищевода, рака щитовидной железы, гемобластоза и лимфомы. Специфическими антигенами для рака могут, например, быть MelanA/MART1, раково-тестикулярные антигены, gp100, тирозиназа, CEA, PSA, Her-2/neu, сурвивин, теломераза.

Используемый в ходе всего описания термин «инфекционное заболевание» или «инфекция» не предназначен для ограничения типов инфекций, которые могли быть проиллюстрированы на примере в данном документе. Термин, следовательно, охватывает все инфекционные агенты, против которых была бы полезной вакцинация субъекта. Неограничивающие примеры представляют собой следующие вызванные вирусами инфекции и нарушения: Синдром приобретенного иммунодефицита - Аденовирусные инфекции - Альфавирусные инфекции - Арбовирусные инфекции - паралич Белла - Болезнь Борна - Буньявирусные инфекции - Калицивирусные инфекции - Ветряная оспа - Вирусная инфекция верхних дыхательных путей - Остроконечная кондилома - Коронавирусные инфекции - Инфекции вирусов Коксаки - Цитомегаловирусные инфекции - Лихорадка денге - ДНК-вирусные инфекции - Контагиозная эктима, - Энцефалит - Энцефалит, арбовирусный - Энцефалит, герпетический - Инфекции вируса Эпштейна-Барра - Инфекционная эритема - Внезапная экзантема - Синдром усталости, хронический - Хантавирусные инфекции - Геморрагические лихорадки, вирусные - Гепатит, вирусный, человека - Герпес губы - Простой герпес - Опоясывающий герпес - Синдром Рамсея-Ханта - Герпесвирусные инфекции - ВИЧ-инфекции - Инфекционный мононуклеоз - Грипп у птиц - Грипп, человека - Лихорадка Ласса - Корь - Менингит, вирусный - Контагиозный моллюск - Оспа обезьян - Свинка - Миелит - Папилломавирусные инфекции - Парамиксовирусные инфекции - Флеботомная лихорадка - Полиомиелит - Полиомавирусные инфекции - Постполиомиелитный синдром - Рабиес - респираторно-синцитиальные вирусные инфекции - Лихорадка Рифт-Валли - РНК-вирусные инфекции - Краснуха - Тяжелый острый респираторный синдром - Медленные вирусные инфекции - Натуральная оспа - Подострый склерозирующий панэнцефалит - Болезни, переносимые клещами - Онкогенные

вирусные инфекции - Бородавки- Лихорадка Западного Нила - Вирусные заболевания - Желтая лихорадка - Зоонозы - и т. д. Специфическими антигенами для вирусов могут быть ВИЧ-gag, -tat, -rev или -nef, или антигены гепатита С.

Дополнительные неограничивающие примеры представляют собой следующие инфекции или нарушения, вызванные бактериями или грибами: Абсцесс - Актиномикоз - Анаплазмоз - Сибирская язва - Артрит, реактивный - Аспергиллез - Бактериemia - Бактериальные инфекции и микозы - Инфекции, вызванные Bartonella - Ботулизм - Абсцесс головного мозга - Бруцеллез - Инфекции, вызванные Burkholderia - Инфекции, вызванные Campylobacter - Кандидоз - Кандидоз, вульвовагинальный - Болезнь кошачьих царапин - Целлюлит - Инфекции центральной нервной системы - Шанкроид - Инфекции, вызванные Chlamydia - Инфекции, вызванные Chlamydiaceae - Cholera - Инфекции, вызванные Clostridium - Кокцидиомикоз - Язва роговицы - Внутрибольничная инфекция - Криптококкоз - Дерматомикозы - Дифтерия - Эрлихиоз - Эпинема плевры - Эндокардит, бактериальный - Эндофтальмит - Энтероколит, псевдомембранозный - Рожь - Инфекции, вызванные Escherichia coli - Фасцит, некротизирующий - Гангрена Фурнье - Фурункулез - Инфекции, вызванные Fusobacterium - Газовая гангрена - Гонорея - Грамотрицательные бактериальные инфекции - Грамположительные бактериальные инфекции - Паховая гранулема - Гнойный гидраденит - Гистоплазмоз - Ячмень - Импетиго - Инфекции, вызванные Klebsiella - Легионеллез - Лепра - Лептоспироз - Инфекции, вызванные Listeria - ангина Людвига - Абсцесс легкого - Болезнь Лайма - Венерическая лимфогранулема - Мадуромикоз - Мелиоидоз - Менингит, бактериальный - Инфекции, вызванные Mycobacterium - Инфекции, вызванные Mycoplasma - Мукозы - Инфекции, вызванные Nocardia - Онихомикоз - Остеомиелит - Паронихия - Воспалительное заболевание тазовых органов - Чума - Пневмококковые инфекции - Инфекции, вызванные Pseudomonas - Орнитоз - Пуэрперальная инфекция - Ку-лихорадка - Лихорадка от укуса крыс - Возвратный тиф - Инфекции дыхательных путей - Ретрофарингеальный абсцесс - Ревматическая лихорадка - Риносклерома - Инфекции, вызванные Rickettsia - Пятнистая лихорадка Скалистых гор - Инфекции, вызванные Salmonella -

Пурпурная лихорадка - Кустарниковый тиф - Сепсис - Заболевания, передающиеся половым путем, бактериальные - Заболевания, передающиеся половым путем, бактериальные - Шок, септический - Заболевания кожи, бактериальные - Заболевания кожи, инфекционные - Стафилококковые инфекции - Стрептококковые инфекции - Сифилис - Сифилис, врожденный - Тетанус - Заболевания, переносимые клещами - Лишай - Разноцветный лишай - Трахома - Туберкулез - Туберкулез позвоночника - Туляремия - Тифоидная лихорадка - Тиф, эпидемический сыпной - Инфекции мочевых путей - Болезнь Уиппла - Судорожный кашель - Инфекции, вызванные вибрионами - Фрамбезия - Инфекции, вызванные *Yersinia* - Зоонозы - Зигомикоз - и т. д.

Как используется в данном документе и если не указано обратное, термин «сольват» включает любую комбинацию, которая может образоваться молекулой(молекулами) РНК по настоящему изобретению с подходящим неорганическим растворителем (например, гидратами) или органическим растворителем, таким как, без ограничений, вода для инъекций, раствор Хартмана, PBS, 0,9% NaCl, бессывороточная культуральная среда.

В целом, для фармацевтического применения, молекула(молекулы) РНК по настоящему изобретению можно составить как фармацевтический препарат или фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну молекулу РНК по настоящему изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество и/или адъювант, а также необязательно один или более дополнительных фармацевтически активных продуктов.

При помощи способов по неограничивающим примерам, данный состав может находиться в форме, подходящей для орального введения, для парентерального введения (такого как интралимфатическая, интраопухолевая, внутривенная, внутримышечная или подкожная инъекция или внутривенная инфузия), для топикального введения (включая глазное), для введения путем ингаляции, при помощи трансдермального пластыря, при помощи имплантата, при помощи

суппозитория и т. д. Данные подходящие формы введения – которые могут быть твердыми, полутвердыми или жидкими, в зависимости от способа введения – а также способы и носители, разбавители и вспомогательные вещества для применения в их приготовлении, будут понятны специалисту в данной области; ссылка вновь предоставлена к, например, US-A-6372778, US-A-6369086, US-A-6369087 и US-A-6372733, а также к стандартным справочникам, таким как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры данных препаратов включают таблетки, пилюли, порошки, пастилки для рассасывания, саше, крахмальные капсулы, эликсиры, суспензии, эмульсии, растворы, сиропы, аэрозоли, мази, кремы, лосьоны, мягкие и твердые желатиновые капсулы, суппозитории, глазные капли, стерильные растворы для инъекций и стерильные пакетированные порошки (которые обычно разводят перед применением) для введения как болус и/или для продолжительного введения, которые можно составить с носителями, вспомогательными веществами и разбавителями, которые являются подходящими *per se* для данных составов, такие как лактоза, декстроза, сахароза, сорбитол, маннитол, крахмалы, аравийская камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, целлюлоза, (стерильная) вода, метилцеллюлоза, метил- и пропилгидроксibenзоаты, тальк, стеарат магния, пищевые масла, растительные масла и минеральные масла или их подходящие смеси. Составы могут необязательно содержать другие фармацевтически активные вещества (которые могут или не могут приводить к синергическому эффекту с продуктами по настоящему изобретению), а также другие вещества, которые широко применяют в фармакологических составах, такие как смазывающие средства, увлажняющие средства, эмульгирующие и суспензирующие средства, диспергирующие средства, дезинтегранты, объемобразующие средства, наполнители, консерванты, подслащивающие средства, ароматизаторы, регуляторы потока, разделительные средства и т. д. Композиции также можно составить таким образом, чтобы обеспечить быстрый, длительный или

отложенный выход активного продукта(продуктов), содержащегося в них, например, используя липосомы или гидрофильные полимерные матрицы на основе натуральных гелей или синтетических полимеров. Для того чтобы усиливать растворимость и/или стабильность продуктов фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, преимущественным может быть использование α -, β - или γ -циклодекстринов или их производных.

Более конкретно, композиции можно составить в фармацевтический состав, содержащий терапевтически эффективное количество частиц, включающих твердую дисперсию продуктов по настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых водорастворимых полимера.

Термин «твердая дисперсия» определяет систему в твердом состоянии (в противоположность жидкому или газообразному состоянию), содержащую по меньшей мере два компонента, где один компонент диспергирован более или менее равномерно по всему объему другого компонента или компонентов. Когда указанная дисперсия компонентов представляет собой такую, что система является химически и физически постоянной или гомогенной по всему объему или состоит из одной фазы, как определено в термодинамике, то такая твердая дисперсия именуется «твердым раствором». Твердые растворы представляют собой предпочтительно физические системы, потому что компоненты в них обычно явно биодоступны организмам, которым их вводят.

Это также может быть удобно для составления продуктов в виде наночастиц, которые имеют модификатор поверхности, адсорбированный на их поверхности в количестве, достаточном для поддержания эффективного среднего размера частиц менее 1000 нм. Подходящие модификаторы поверхности могут быть выбраны предпочтительно из известных органических и неорганических фармацевтических вспомогательных веществ. Данные вспомогательные вещества включают разнообразные полимеры, низкомолекулярные олигомеры, натуральные продукты и поверхностно-активные вещества. Предпочтительные модификаторы поверхности включают неионные и анионные поверхностно-

активные вещества.

Еще один другой интересный путь составления продуктов согласно настоящему изобретению включает фармацевтическую композицию, в которой продукты включены в гидрофильные полимеры, и с применением этой смеси в качестве пленочной оболочки в отношении многих мелких шариков, таким образом осуществляют производство композиции с хорошей биодоступностью, которую целесообразно изготавливать и которая является подходящей для получения фармацевтических лекарственных форм для перорального введения. Материалы, подходящие для использования в качестве сердцевин в шариках, соединяются с условием, что указанные материалы являются фармацевтически приемлемыми и обладают соответствующими размерами и прочностью. Примерами данных материалов являются полимеры, неорганические вещества, органические вещества, а также сахара и их производные.

Препараты можно получить способом, известным *per se*, который обычно включает смешивание по меньшей мере одного продукта согласно настоящему изобретению с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, а также, при желании, в комбинации с другими фармацевтически активными продуктами, при необходимости в асептических условиях. Ссылка вновь предоставлена к US-A-6372778, US-A-6369086, US-A-6369087 и US-A-6372733, а также к дополнительному уровню техники, указанному выше, а также к стандартным справочникам, таким как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению находятся предпочтительно в единичной лекарственной форме, и могут быть подходящим образом упакованы, например в коробку, блистер, флакон, бутылку, саше, ампулу или в любую другую подходящую одноразовую или многоразовую емкость или контейнер, (который можно правильно маркировать), необязательно с одним или более информационными листками, содержащими информацию о продукте и/или инструкцию по применению. Как правило, данные единичные

лекарственные формы будут содержать от 0,1 до 1000 мг.

Продукты можно вводить различными путями, включая интралимфатический, интраопухолевый, пероральный, ректальный, глазной, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный или интраназальный пути, в зависимости от, главным образом, конкретного применяемого препарата и состояния, подлежащего лечению или предупреждению. По меньшей мере один продукт по настоящему изобретению будет, в целом, введен в «эффективном количестве», под которым подразумевают любое количество продукта, которое, в результате подходящего введения, является достаточным для обеспечения желаемого терапевтического или профилактического эффекта у отдельной особи, которой его вводят. Обычно, в зависимости от состояния, подлежащего предупреждению или лечению, и пути введения, данное эффективное количество будет обычно от 0,01 до 1000 мг на килограмм веса тела пациента в день, которое можно ввести как однократную суточную дозу, как разделенное на одну или более суточные дозы, или по существу продолжительно, например, с применением капельной инфузии. Количество(количества) подлежащее введению, путь введения и последующий курс лечения могут быть определены лечащим клиническим врачом, в зависимости от таких факторов, как возраст, пол и общее состояние пациента, а также природа и тяжесть заболевания/симптомов, подлежащих лечению. Ссылка вновь предоставлена к US-A-6372778, US-A-6369086, US-A-6369087 и US-A-6372733, а также к дополнительному уровню техники, указанному выше, а также к стандартным справочникам, таким как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

В соответствии со способом по настоящему изобретению, указанную фармацевтическую композицию можно вводить отдельно в разное время на протяжении курса терапии или одновременно в разделенных или объединенных комбинированных формах. Настоящее изобретение, следовательно, нужно понимать как допускающее все подобные режимы одновременного или альтернативного лечения и термин «введение» нужно интерпретировать соответственно.

Для формы перорального введения композиции по настоящему изобретению можно смешивать с подходящими добавками, такими как вспомогательные вещества, стабилизаторы или инертные разбавители, и при помощи общепринятых способов приводить в подходящую для введения форму такую как таблетки, таблетки, покрытые оболочкой, твердые капсулы, водные, спиртовые или масляные растворы. Примерами подходящих инертных носителей являются аравийская камедь, окись магния, карбонат магния, фосфат калия, лактоза, глюкоза или крахмал, в частности, кукурузный крахмал. В данном случае препарат можно производить в виде как сухих, так и увлажненных гранул. Подходящие масляные вспомогательные вещества или растворители представляют собой растительные масла или животные жиры, такие как подсолнечное масло или жир печени трески. Подходящие растворители для водных или спиртовых растворов представляют собой воду, этанол, сахарные растворы или их смеси. Полиэтиленгликоли и полипропиленгликоли также полезны в качестве дополнительных вспомогательных веществ для других форм введения. В качестве таблеток с быстрым высвобождением эти композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, дикальция фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие вспомогательные вещества, связывающие вещества, добавки, разрыхлители, разбавители и скользящие вещества, известные из уровня техники.

При введении с помощью назального аэрозоля или ингаляции, данные композиции можно получить согласно техникам фармацевтического составления, хорошо известных из уровня техники, и можно получить в виде растворов в физрастворе, с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов абсорбции для усиления биологической доступности, фторуглеродов и/или других солюбилизующих или диспергирующих средств, известных из уровня техники. Подходящие фармацевтические составы для введения в форме аэрозолей или спреев представляют собой, например, растворы, суспензии или эмульсии продуктов по настоящему изобретению или их физиологически приемлемые соли в

фармацевтически приемлемом растворителе, таком как этанол или вода, или в смеси данных растворителей. При потребности состав также может необязательно содержать другие фармацевтические вспомогательные вещества, такие как поверхностно-активные вещества, эмульгаторы и стабилизаторы, а также пропеллент.

Для подкожного введения продукт согласно настоящему изобретению, при желании вносят в раствор, суспензию или эмульсию с общепринятыми веществами, следовательно, такими как солюбилизаторы, эмульгаторы или дополнительные вспомогательные вещества. Продукты по настоящему изобретению можно также лиофилизировать, и полученные лиофилизаты применять, например, для получения инъекционных или инфузионных препаратов. Подходящие растворители представляют собой, например, воду, физиологический раствор, а в дополнение также и сахарные растворы, такие как растворы глюкозы или маннитола, или, как альтернативу, смеси различных упомянутых растворителей. Инъекционные растворы или суспензии можно составлять согласно уровню техники, с использованием подходящих нетоксичных, парентерально-приемлемых разбавителей или растворителей, таких как маннитол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор натрия хлорида, или подходящих диспергирующих или смазывающих и суспензирующих средств, таких как стерильные, легкие, нелетучие масла, в том числе синтетические моно- или диглицериды, а также жирные кислоты, в том числе олеиновая кислота.

При ректальном введении в форме суппозитория, данные составы можно получить путем смешивания продуктов согласно настоящему изобретению с подходящим нераздражающим вспомогательным веществом, таким как масло какао, синтетические глицеридные сложные эфиры или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми веществами при обычных температурах, но сжижаются и/или растворяются в ректальной полости с выделением лекарственного средства.

В предпочтительных вариантах осуществления продукты и композиции по настоящему изобретению применяют локально, например, местно или как абсорбированным, так и неабсорбированным нанесением.

Композиции являются ценными в области ветеринарии, которая для целей в данном документе не только включает предупреждение и/или лечение болезней у животных, но также – экономически важных животных, таких как крупный рогатый скот, свиньи, овцы, цыплята, рыба и т. д. – с повышением роста и/или веса животного и/или количества и/или качества мяса или других продуктов, получаемых от животного. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции для применения в ветеринарии, которая содержит по меньшей мере один продукт по настоящему изобретению и по меньшей мере один подходящий носитель (т. е. носитель, подходящий для применения в ветеринарии). Настоящее изобретение также относится к применению продукта по настоящему изобретению при получении такой композиции.

ПРИМЕРЫ

Общие материалы и методы

Эксперименты in vitro: создание DC, полученных из моноцитов

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) использовали в качестве предшественников DC и изолировали из продуктов лейкофереза. DC с клинической степенью чистоты создавали *in vitro* из адгезивной к пластику фракции, как указано ниже. В 0 день, PBMC размещали в планшете с плотностью 10×10^6 клеток/мл в среде, подходящей для культуры гематопоэтических клеток, дополненной 2% аутологичной плазмой (AP). Клетки оставляли на 2ч, чтобы сделать возможной адгезию к пластику моноцитами при 37°C. Неприлипшие клетки удаляли промывкой, а прилипшие клетки культивировали в среде, дополненной 1% AP, 1000 Ед/мл GM-CSF и 500 Ед/мл IL-4, в клеточной фабрике. На 2 и 4 дни, среду, содержащую количество

цитокинов на 0 день, добавляли к культуре DC. На 6 день культуры DC, клетки собирали и замораживали.

Эксперименты In vitro: электропорация DC

На 6 день, $4 - 8 \times 10^6$ DC электропорировали при помощи мРНК, как было указано. Перед электропорацией DC дважды промывали, первый раз PBS без дополнений и второй раз средой со сниженным содержанием сыворотки без фенолового красного. После стадии второй промывки DC ресуспензировали в конечный объем 200 мкл среды со сниженным содержанием сыворотки, содержащей мРНК. Электропорацию проводили в кювете для электропорации с 4-мм щелью. Экспоненциально затухающий импульс использовали при следующих условиях: напряжение, 300 В; емкость, 150 мкФ, и сопротивление, $\infty \Omega$, приводящих к времени импульса ≈ 11 мс. Сразу после электропорации DC разводили в среде, дополненной 1% huAB сывороткой и PS/L-GLU, и инкубировали при 37°C в увлажненной 5% CO₂ атмосфере. После электропорации к DC не добавляли дополнительных цитокинов.

Эксперименты In vivo: мыши

Самки, мыши DBA/2 возрастом от 6 до 12 недель.

Эксперименты In vivo: Клеточные линии мышей

Клеточную линию мастоцитомы P815 получали от С. Uyttenhove (Université Catholique de Louvain, Лувен-ля-Нев, Бельгия).

Эксперименты In vivo: Инокуляция опухолевых клеток и доставка in situ мРНК

Для того чтобы вырастить пальпируемые опухоли, мышам вводили инъекцию с 5×10^5 опухолевых клеток P815 подкожно с обоих боков, как указано в эксперименте. Для интраопухолевой доставки мРНК, мышам анестезировали изофлураном (Abbott). Опухоли вводили инъекцией в смеси, содержащей 10 мкг каждого компонента TriMix мРНК в конечном объеме 50 мкл смеси 0,8 раствор Хартмана/введенная инъекцией опухоль, когда достигали объема

приблизительно 100 мм³. Такое же количество мРНК использовали между другими группами. мРНК, кодирующая tNGFR, полученная от вектора pGEM, служила в качестве контроля.

Пример 1

Конкретные материалы и методы

Генерацию iDC и электропорацию проводят, как описано в части Общие материалы и методы выше. iDC электропорировали с введением 5мкг каждого компонента TriMix, чтобы сделать возможным созревание DC. Все проточно-цитометрические окрашивания проводили в PBS/BSA/азиде. Для анализа экспрессии CD70 использовали флуоресцинизиотиоцианат (FITC) к CD70. Сбор данных проводили в проточном цитометре FACSFortessa (BD) и анализировали с использованием программного обеспечения FACS Diva.

Результат:

Через двадцать четыре часа после электропорации DC окрашивали в отношении их поверхностной экспрессии CD70. Данные результаты показывают, что после электропорации iDC с введением TriMix, интенсивность экспрессии CD70 - средняя интенсивность флуоресценции (MFI) - является значительно более высокой после электропорации с введением TriMix, кодируемым плазмидой pUC TE ENE (SEQ ID N° 5), содержащей оба регуляторных элемента (TE + ENE), в сравнении с вектором pUC (на основе плазмиды pUC TE ENE), вектором pUC TE и вектором pUC ENE. Экспрессия CD70 после электропорации с введением TriMix, кодируемой плазмидой pUC TE ENE, является значительно более высокой, поскольку использование как pUC TE, так и pUC ENE приводит к сниженным или как максимум равным уровням экспрессии CD70, в сравнении с pUC без этих элементов (Фигура 1). Следовательно, присутствие обоих элементов (TE и ENE) в векторе, видимо, обладает неожиданным синергическим эффектом относительно повышения экспрессии CD70 после электропорации с введением TriMix, кодируемой плазмидой pUC TE ENE.

Пример 2

Конкретные материалы и методы

Генерацию iDC и условия электропорации осуществляют, как описано в части Общие материалы и методы выше. iDC электропорировали с введением 20мкг WT1, кодирующим мРНК, чтобы сделать возможным внесение антигена. Чтобы проанализировать внутриклеточную экспрессию WT1, клетки фиксировали и пермеабелизировали и окрашивали внутриклеточно при помощи моноклонального антитела к WT1 (клон 6F-H2; Dako Cytomation, Карпинтерия, Калифорния). Меченное PE антитело к изотипически-сходному IgG мыши использовали в качестве вторичного антитела (Becton&Dickinson, Эрембодегем, Бельгия). Нечувствительное изотипически-сходное антитело (eBioscience, Вена, Австрия) использовали в качестве контроля. Сбор данных проводили в проточном цитометре FACSFortessa (BD) и анализировали с использованием программного обеспечения FACS Diva.

Результат:

Данные результаты показывают, что после электропорации iDC с введением WT1, кодируемым вектором pUC TE ENE, обнаруживали более длительную экспрессию WT1, в сравнении с другими векторами, кодирующими WT1 мРНК (Фигура 2). Эти данные хорошо демонстрируют разные пути действия как 5' TE, так и 3' ENE сегментов. Хотя экспрессия мРНК вектора pUC-TE является высокой после 4 часов, он быстро разрушается. Трансляция из ENE, содержащего РНК, является более низкой, чем из всех остальных, на протяжении всего периода. Вектор pUC TE ENE обладает высокой способностью трансляции TE и длительным эффектом последовательности ENE. Уровень экспрессии WT1 уменьшается со значительно более медленным показателем, чем у других векторов.

Пример 3

Конкретные материалы и методы

Генерацию iDC и условия электропорации осуществляют, как описано в части Общие материалы и методы выше. iDC совместно электропорировали с введением 5мкг eGFP, кодирующей мРНК, и TriMix (5 мкг каждого компонента), чтобы сделать возможным внесение антигена и созревание DC. Экспрессию eGFP определяли при помощи проточной цитометрии через несколько временных отрезков.

Результат:

Экспрессию eGFP прослеживали через несколько временных отрезков после электропорации (Фигура 3). Данные результаты показывают, что уровень экспрессии eGFP от обоих векторов является соизмеримым через 4 часа после электропорации. Однако, на более поздних временных точках ясно, что экспрессия мРНК из рUC TE ENE, является значительно более высокой. Это снова указывает на более стабильную и длительную экспрессию трансгена.

Пример 4

Конкретные материалы и методы

Генерацию iDC и условия электропорации осуществляют как описано выше. iDC электропорировали с введением 5мкг каждого компонента TriMix, чтобы сделать возможным созревание DC. Все проточно-цитометрические окрашивания проводили в PBS/BSA/азиде. Для анализа экспрессии поверхностных молекул на поверхности клеток DC использовали следующие моноклональные антитела: CD40-APC (Аллофикоцианин), CD70-FITC, CD80-PE, CD83-PE (Фикоэритрин), CD86-PE и CCR7-APC. Сбор данных проводили в проточном цитометре FACS Fortessa (BD) и анализировали с использованием программного обеспечения FACS Diva.

Результат:

Электропорация iDC с введением TriMix мРНК, кодируемой вектором рUC TE ENE, способна индуцировать созревание DC (Фигура 4).

Пример 5: Модель двусторонней опухоли с P815: однократная обработка одной опухоли*Конкретные материалы и методы*

Для того чтобы вырастить пальпируемые опухоли, мышей инокулировали 5×10^5 опухолевых клеток P815 подкожно с обоих боков. Терапию начинали, когда обе опухоли достигали инъецируемого объема приблизительно 100 мм^3 . Используя модель двусторонней опухоли, в которой обрабатывают только одну опухоль, авторы настоящего изобретения задались целью оценить системный эффект стратегии вакцинации. Следовательно, только в левую опухоль вводили инъекцией или контрольную мРНК, или pUC TE ENE TriMix мРНК (10 мкг каждого компонента мРНК), растворенные в 0,8х растворе Хартмана. Системный противоопухолевый иммунный ответ оценивали путем измерения размера как обработанной, так и необработанной, контралатеральной опухоли, а также по выживаемости.

Результат:

Используя модель двусторонней опухоли, авторы настоящего изобретения смогли оценить системный эффект стратегии иммунизации. Одиночная интраопухолевая доставка pUC TE ENE TriMix мРНК приводила к значительно сниженному росту опухоли как обработанной, так и необработанной контралатеральной опухоли (Фигура 5). Эффект вакцинации на отдаленную опухоль может являться индикацией того, что одиночную интраопухолевую инъекцию TriMix можно применять для лечения множественных опухолевых поражений.

Пример 6: Модель двусторонней опухоли с P815: однократная обработка одной опухоли, раствор Хартмана и tNGFR в качестве контроля*Конкретные материалы и методы*

Для того чтобы вырастить пальпируемые опухоли, мышей инокулировали 5×10^5

опухолевых клеток P815 подкожно с обоих боков. Терапию начинали, когда обе опухоли достигали инъецируемого объема приблизительно 100 мм³. Используя модель двусторонней опухоли, в которой обрабатывают только одну опухоль, авторы настоящего изобретения задались целью оценить системный эффект стратегии вакцинации. Следовательно, только в левую опухоль вводили инъекцией или носитель (0,8 раствор Хартмана), или контрольную мРНК, или pUC TE ENE TriMix мРНК (10 мкг каждого компонента мРНК), растворенные в 0,8х растворе Хартмана, все в общий объем 50мкл/введенная инъекцией опухоль. Системный противоопухолевый иммунный ответ оценивали путем измерения размера как обработанной, так и необработанной, контралатеральной опухоли, а также по выживаемости.

Результат:

Используя модель двусторонней опухоли, авторы настоящего изобретения смогли оценить системный эффект стратегии иммунизации. Данный эксперимент подтверждает предыдущие наблюдения, т. е.

1. Одиночная интраопухолевая доставка pUC TE ENE TriMix мРНК приводила к значительно сниженному росту опухоли как обработанной, так и необработанной контралатеральной опухоли.
2. Одиночная интраопухолевая доставка pUC TE ENE TriMix мРНК приводила к более продолжительной выживаемости опухоленесущих мышей.
3. Эффект вакцинации был более выраженным в обработанных опухолях.

Дополнительно, взяв группу, в которой опухоли обрабатывали носителем, авторы настоящего изобретения смогли показать эффект адьюванта мРНК самой по себе.

Пример 7: Сравнение различных последовательностей TE

Конкретные материалы и методы

Детали, относящиеся к конкретным способам анализа в отношении к этому документу, можно найти в Примерах 2 и 3, как описано выше.

Результат: электропорация iDC с введением WT1 или eGFP

Электропорация iDC с введением WT1 (Фиг. 9А) или eGFP (Фиг. 9В), кодируемых векторами pUC TE ENE, как содержащими элемент TE, представленный в SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 или SEQ ID N°3, не приводила к значительной разнице экспрессии WT1 или eGFP, соответственно.

Эти данные отчетливо показывают, что последовательности, обладающие по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, такие как, например, SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 или SEQ ID N°3, можно использовать взаимозаменяемо в качестве элемента энхансера трансляции в векторах согласно настоящему изобретению.

ССЫЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Bonehill A, Tuyaerts S, Van Nuffel AM, Heirman C, Bos TJ, Fostier K, Neyns B, Thielemans K - *Enhancing the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells by co-electroporation with CD40L, CD70 and constitutively active TLR4 encoding mRNA*. - Mol Ther. 2008 Jun; 16(6):1170-80.

Conrad NK, Steitz JA - *A Kaposi's sarcoma virus RNA element that increases the nuclear abundance of intronless transcripts*. - EMBO J. 2005 May 18;24(10):1831-41.

Conrad NK, Mili S, Marshall EL, Shu MD, Steitz JA - *Identification of a rapid mammalian deadenylation-dependent decay pathway and its inhibition by a viral RNA element*. Mol Cell. 2006;24:943-953.

Diken M, Kreiter S, Selmi A, Britten CM, Huber C, Türeci Ö, Sahin U - *Selective uptake of naked vaccine RNA by dendritic cells is driven by macropinocytosis and abrogated upon DC maturation*. - Gene Ther. 2011 Jul; 18(7):702-8.

Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, Pfeiffer R, Ojkić-Zrna S, Probst J, Kallen KJ - *Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity*. - J Immunother. 2011 Jan;34(1):1-15.

Hu MC, Tranque P, Edelman GM, Mauro VP. - *rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency*. - Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 16;96(4):1339-44.

Mitton-Fry RM, DeGregorio SJ, Wang J, Steitz TA, Steitz JA. - *Poly(A) tail recognition by a viral RNA element through assembly of a triple helix*. - Science. 2010;330:1244-1247.

Sun R, Lin SF, Gradoville L, Miller G. - *Polyadenylylated nuclear RNA encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. - Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:11883-11888.

Van Lint Sandra, Goyvaerts Cleo, Maenhout Sarah, et al. - *Preclinical Evaluation of TriMix and Antigen mRNA-Based Antitumor Therapy* - *Cancer Res* **2012**;72:1661-1671.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ВРЕЙЕ УНИВЕРСИТЕЙТ БРЮССЕЛЬ
 <120> ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ РНК ВЕКТОР И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ
 <130> ETR-003
 <150> EP13192555.4
 <151> 2013-11-12
 <160> 5
 <170> BiSSAP 1.2
 <210> 1
 <211> 204
 <212> ДНК
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <221> источник
 <222> 1..204
 <223> /organism="Искусственная Последовательность "
 /note="Энхансер Трансляции"
 /mol_type="не определенная ДНК"

<400> 1
 ggccggcggg tttctgacat ccggcggggtt tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg 60
 cgggtttctg acatccggcg ggtgaattct tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg 120
 cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcggggtg 180
 actcacaacc aggcctccac aacc 204

<210> 2
 <211> 238
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <222> 1..238
 <223> /organism="Искусственная Последовательность "
 /note="Энхансер Трансляции"
 /mol_type="не определенная ДНК"

<400> 2
 aagctttaat acgactcact atagggcccg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac 60
 atccggcggg tttctgacat ccggcggggtt tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg 120
 cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcggggtt 180
 tctgacatcc ggcggggttc tgacattcac aaccaggcct ccacaaccat ggctcagag 238

<210> 3
 <211> 238
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <222> 1..238
 <223> /organism="Искусственная Последовательность "
 /note="Энхансер Трансляции"
 /mol_type="не определенная ДНК"

<400> 3
 aagctttaat acgactcact atagggcccg cggaattctg acatccggcg gaattctgac 60
 atccggcggg attctgacat ccggcggggtt tctgacatcc ggcggggttc tgacatccgg 120
 cggaattctg acatccggcg gaattctgac atccggcggg attctgacat ccggcggggtt 180
 tctgacatcc ggcggggttc tgacattcac aaccaggcct ccacaaccat ggctcagag 238

<210> 4

<211> 85
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<222> 1..85
<223> /organism="Искусственная Последовательность"
/note="Энхансер Трансляции"
/mol_type="не определенная ДНК"

<400> 4
tcgagtgttt tggctgggtt tttccttggt cgcaccggac acctccagtg ассаgасggc 60
aaggttttta tcccagtgta tattg 85

<210> 5
<211> 3102
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<222> 1..3102
<223> /organism="Искусственная Последовательность"
/note="Энхансер Трансляции"
/mol_type="не определенная ДНК"

<400> 5
taatacgact cactataggg cggcggggtt tctgacatcc ggcgggtttc tgacatccgg 60
cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac atccggcggg tttctgacat ccggcgggtt 120
tctgacatcc ggcgggtttc tgacatccgg cgggtttctg acatccggcg ggtttctgac 180
atccggcggg tttctgacat tcacaaccag gcctccacaа ccctcgagtg ttttggctgg 240
gtttttcctt gttcgcaccg gacacctcca gtgaccagac ggcaagggtt ttatcccagt 300
gtatattgtc gacaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
aaaaaaaaaa aaaaaaagca ggtgtgtctc tctccacctg cgaattcact ggccgtcgtt 480
ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagcacat 540
ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaа gaggcccgca ccgatcgccc ttcccacacag 600
ttgcgцagcc tgaatggcga atggcgctt atgцgggtatt ttctccttac gcatctgtgc 660
ggtatttcac accgcataat gtgцactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta 720
agccagcccc gacaccgcgc aacaccgcct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg 780
cctccgcctt acagacaagc tgtgaccgct tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca 840
ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt ttataggtt 900
aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc 960
ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa 1020
taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 1080
cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcgгca ttttgcttc ctgtttttgc tcaaccagaa 1140
acgctgggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 1200
ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg 1260
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcgggtattat cccgtattga cgcgggcaa 1320
gagcaactcg gtcgcgcgat aсactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc 1380
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgcataacc 1440
atgagtгata асactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta 1500
accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag 1560
ctgaatgaag ccataccaaa cгacgagcgt gacaccacga tgcctgtage aatggcaaca 1620
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag cttcccggca асaattaata 1680
gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc 1740
tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gacgctgggt ctcgcgggtat cattgcagca 1800
ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagtтatct acacgacggg gagtцagгca 1860
actatgtag aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat таagcattgg 1920
taactgtcag accaagtта ctcatatata ctttagattg аттаааact tcatttttaa 1980
tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt 2040
gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat 2100
cctttttttc tgcgcgтаat ctgctgcttg caaаcaaaaa ассacccgt accagcggtg 2160
gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttcgga aggtaaactgg cttcagcaga 2220

gcgagatac	caaatactgt	tcttctagtg	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	2280
tctgtagcac	cgctacata	cctcgctctg	ctaatectgt	taccagtggc	tgctgccagt	2340
ggcgataagt	cggtgtcttac	cgggttggac	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	2400
cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	gacctacacc	2460
gaactgagat	acctacagcg	tgagctatga	gaaagcgcca	cgcttcccga	agggagaaag	2520
gcgacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	2580
gggggaaacg	cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	2640
cgatTTTTgt	gatgctcgtc	aggggggcg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcggcc	2700
TTTTTAcggt	tcctggcctt	ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	tcggttatcc	2760
cctgattctg	tgataaccg	tattaccgcc	tttgagttag	ctgataccgc	tcgccgcagc	2820
cgaacgaccg	agcgcagcga	gtcagtgagc	gaggaagcgg	aagagcgcgc	aatacgcaaa	2880
ccgcctctcc	ccgcgcgctt	gccgattcat	taatgcagct	ggcacgacag	gtttcccagc	2940
tgaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	agctcaactca	ttaggcaccc	3000
caggctttac	actttatgct	tccggctcgt	atgttgtgtg	gaattgtgag	cggataacaa	3060
ttcacacag	gaaacagcta	tgacatgat	tacgccaagc	tt		3102

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первоначально поданная формула изобретения

1. Нуклеотидный вектор, содержащий последовательность энхансера трансляции (TE), обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную SEQ ID N°4.
2. Нуклеотидный вектор по п.°1, где транскрибируемая нуклеотидная последовательность выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.
3. Нуклеотидный вектор по любому из пп.°1-2, где указанный энхансер трансляции представлен SEQ ID N° 1.
4. Способ повышения стабильности и/или эффективности трансляции РНК, полученной в результате транскрипции *in vitro*, при этом указанный способ включает стадии
 - (i) получения вектора по любому из пп.°1-3, где указанная транскрибируемая нуклеотидная последовательность представляет собой транскрибируемую последовательность ДНК, которая соответствует указанной РНК, которую необходимо получить в результате транскрипции, и
 - (ii) транскрибирования *in vitro* указанной транскрибируемой последовательности ДНК.
5. Молекула РНК, содержащая энхансер трансляции (TE), обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с SEQ ID N°1, транскрибируемую нуклеотидную последовательность и последовательность удержания в ядре, представленную SEQ ID N°4.
6. Молекула РНК по п.°5, дополнительно содержащая один или более элементов, выбранных из списка, включающего поли-А хвост.
7. Молекула РНК по любому из п.°5 или п. 6, где указанная транскрибируемая

нуклеотидная последовательность выбрана из списка, включающего мРНК, кодирующую CD40L, CD70, саTLR4 или антиген/болезнь-специфическую мРНК.

8. Молекула РНК по любому из пп.°5-7, где указанный энхансер трансляции представлен SEQ ID N° 1.

9. Композиция, содержащая одну или более молекул РНК по любому из пп.°5-8.

10. Композиция по п.°9, где указанная одна или более молекул РНК представляют собой молекулы мРНК, которые кодируют CD40L, CD70 и саTLR4.

11. Композиция по п.°10, дополнительно содержащая мРНК, кодирующую антиген/болезнь-специфическую мРНК.

12. Применение молекулы РНК по любому из пп.°5-8 или композиции по любому из пп.°9-11 для введения в клетку-хозяина.

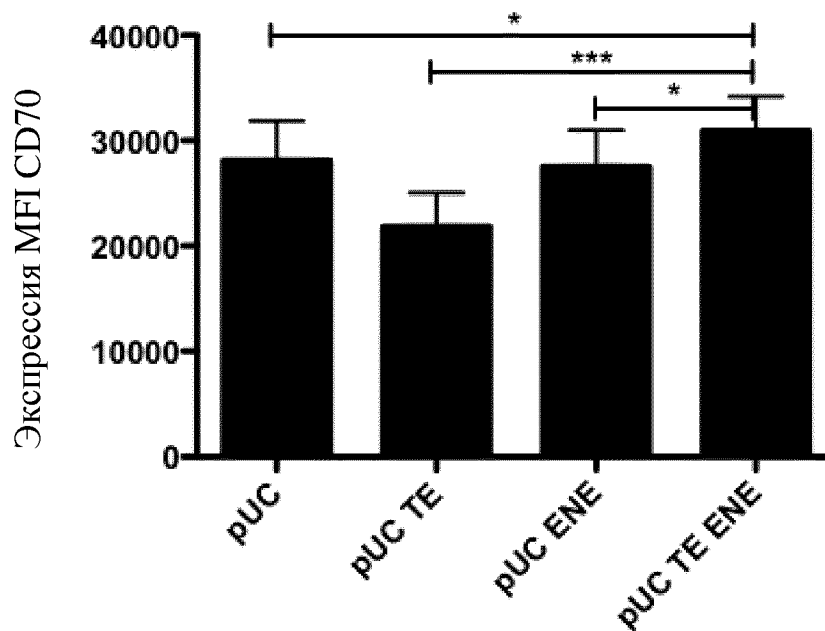
13. Молекула РНК по любому из пп.°5-8 или композиция по любому из пп.°9-11 для применения в медицине.

14. Набор, содержащий один или более векторов по любому из пп.°1-3, одну или более молекул РНК по любому из пп.°5-8 или композицию по любому из пп.°9-11.

ФИГ. 1

А

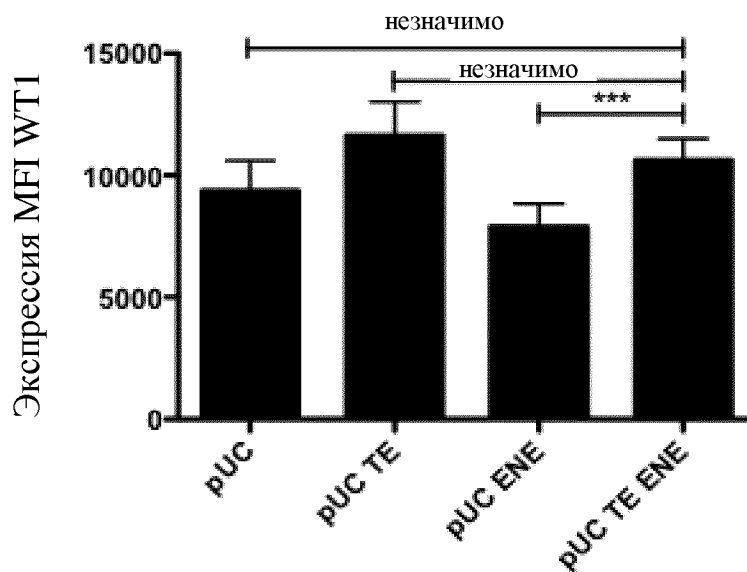
24ч после электропорации



ФИГ. 2

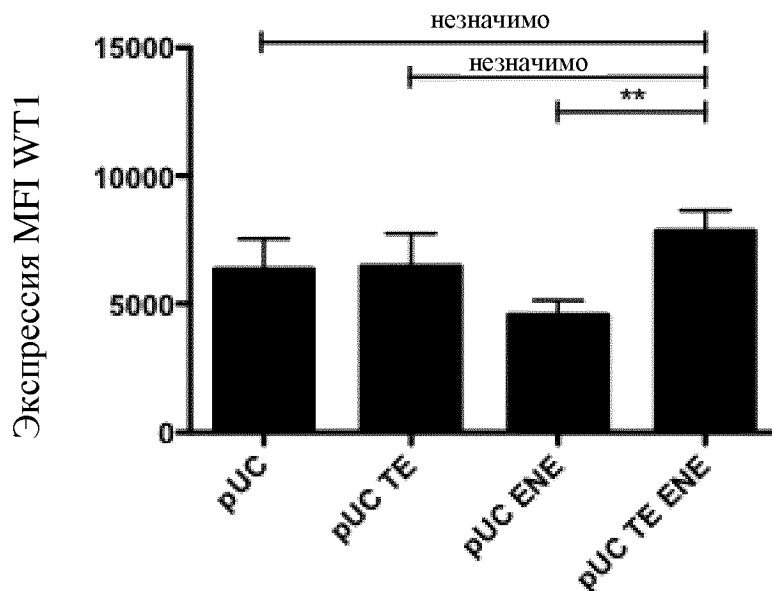
А

4ч после электропорации



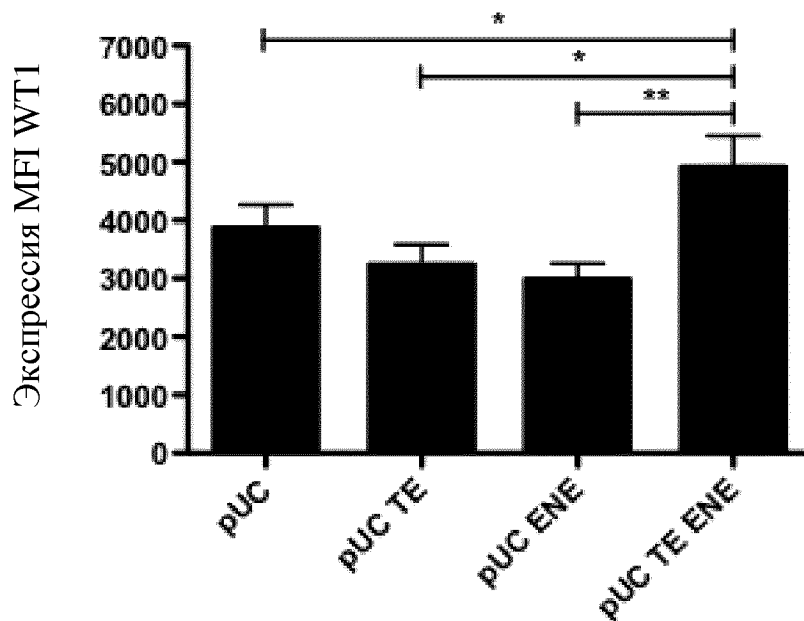
В

24ч после электропорации

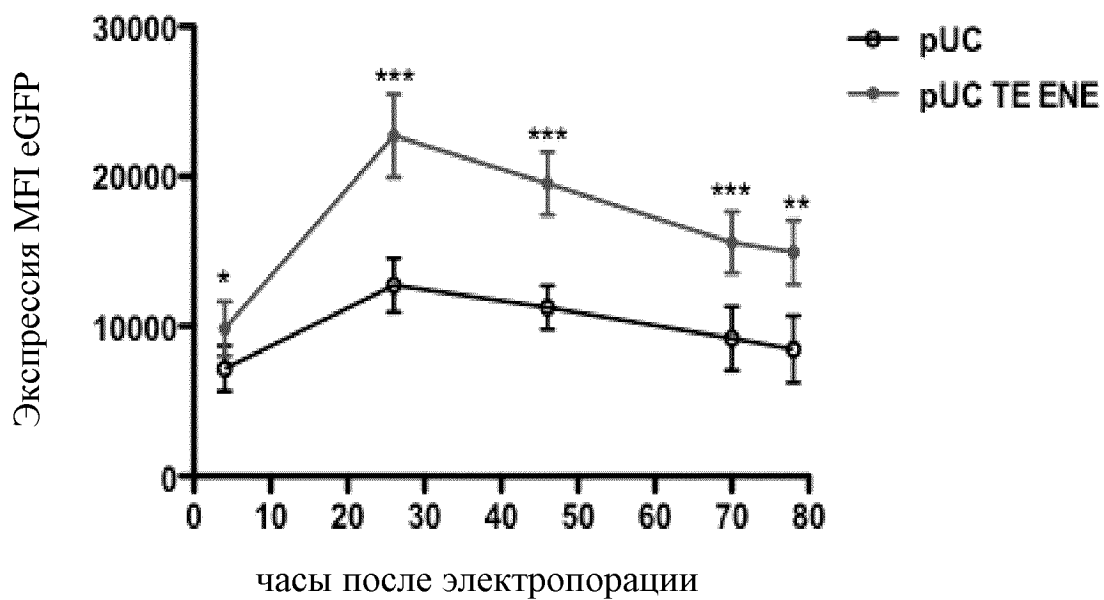


С

48ч после электропорации

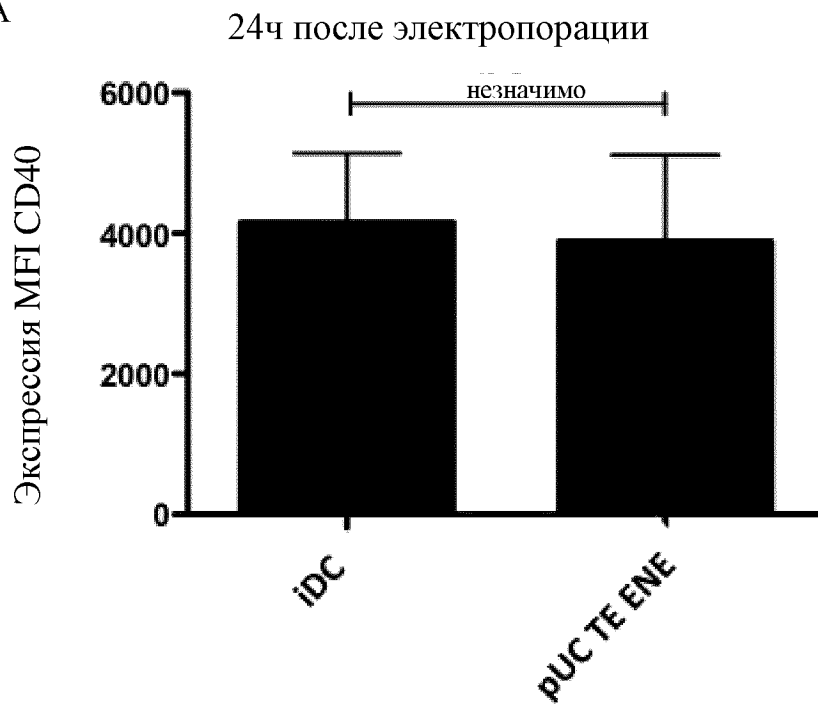


ФИГ. 3



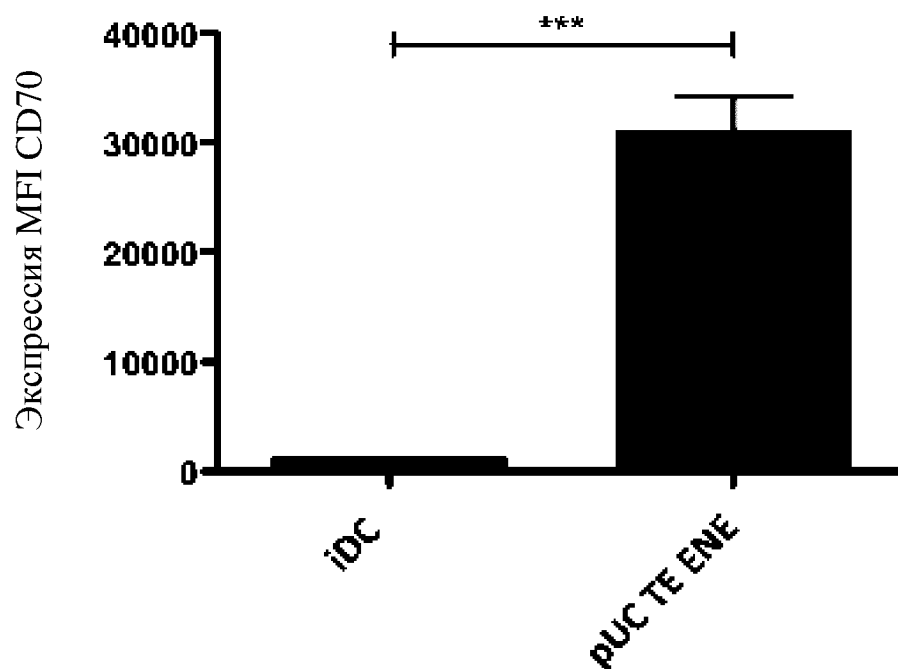
ФИГ. 4

А



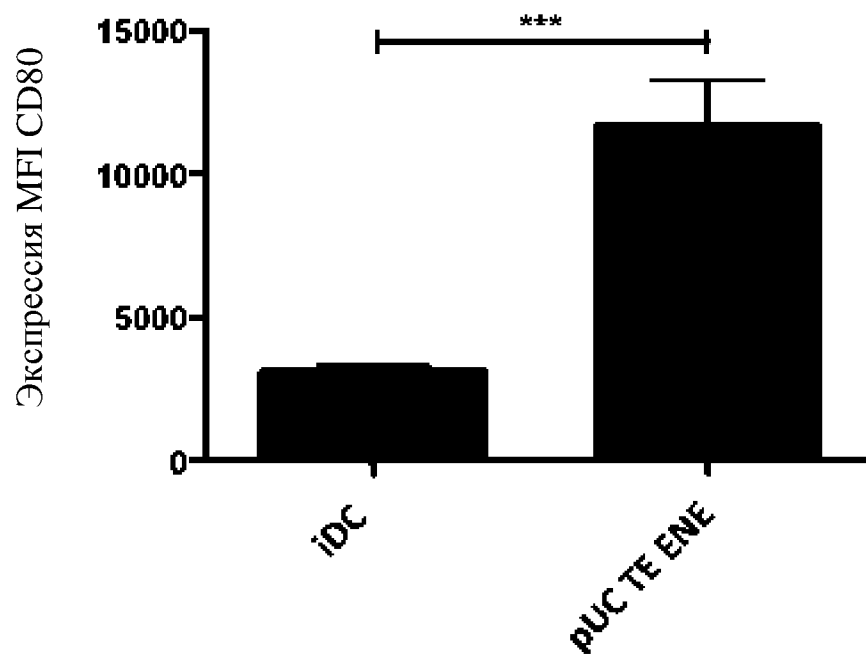
B

24ч после электропорации

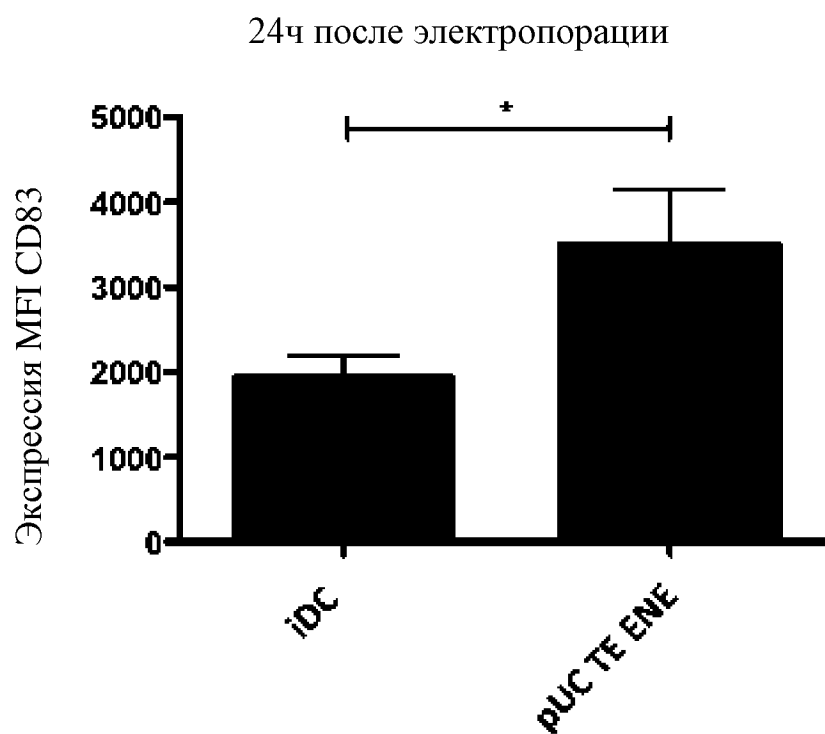


C

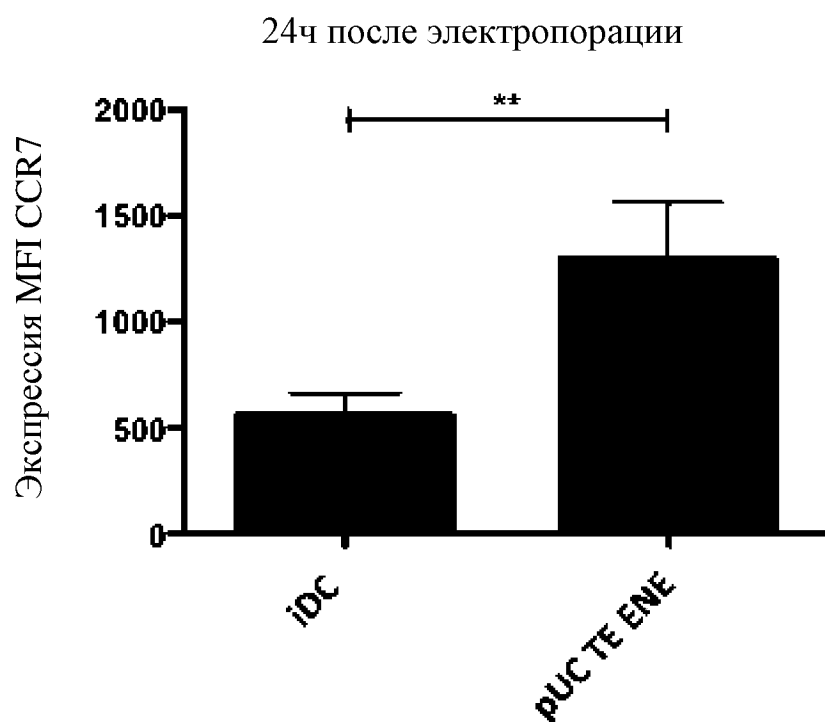
24ч после электропорации



D



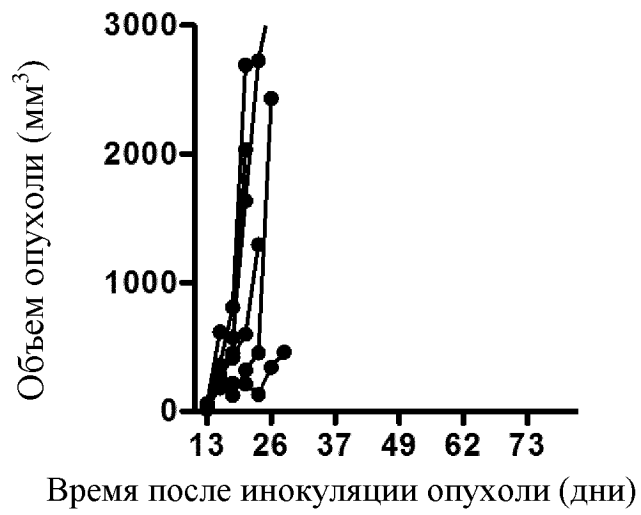
E



ФИГ. 5

А

Контрольная мРНК

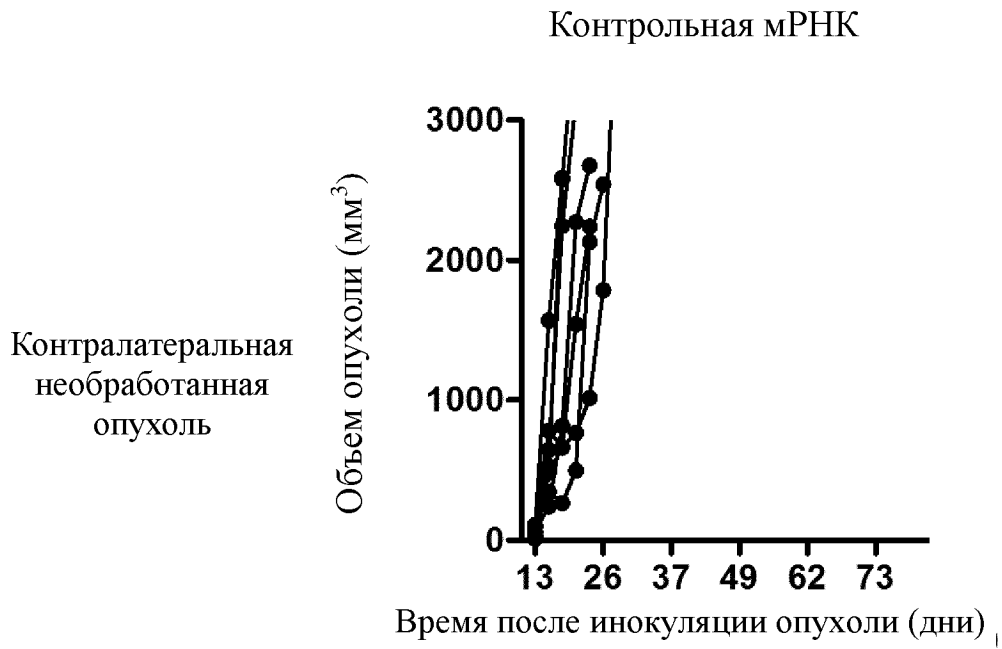
Обработанная
опухоль

В

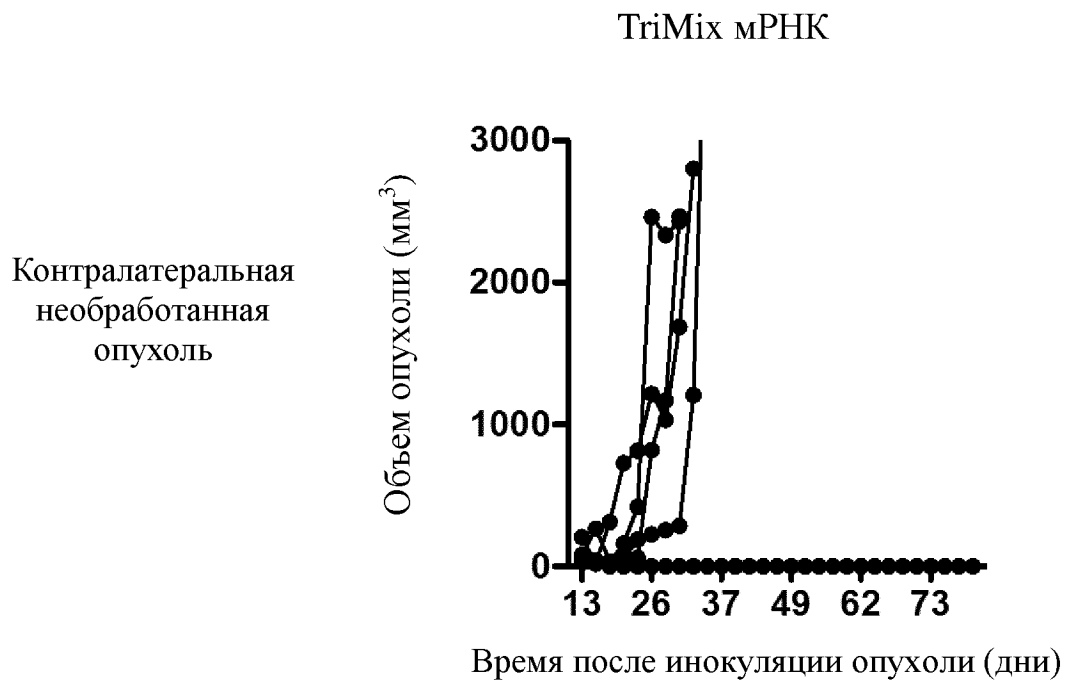
TriMix мРНК

Обработанная
опухоль

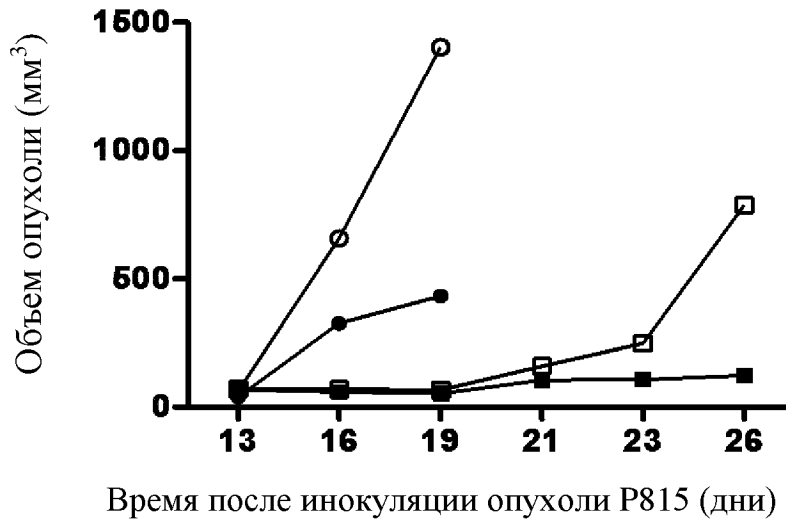
C



D

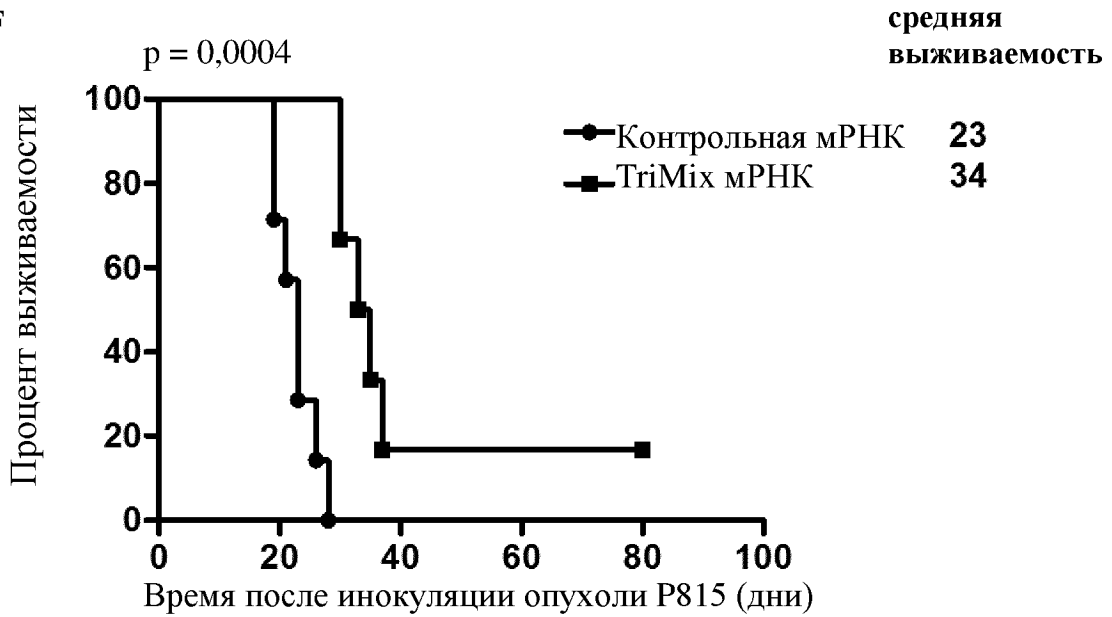


E



- Обработанная опухоль Контрольная мРНК
- Необработанная опухоль Контрольная мРНК
- Обработанная опухоль TriMix мРНК
- Необработанная опухоль TriMix мРНК

F

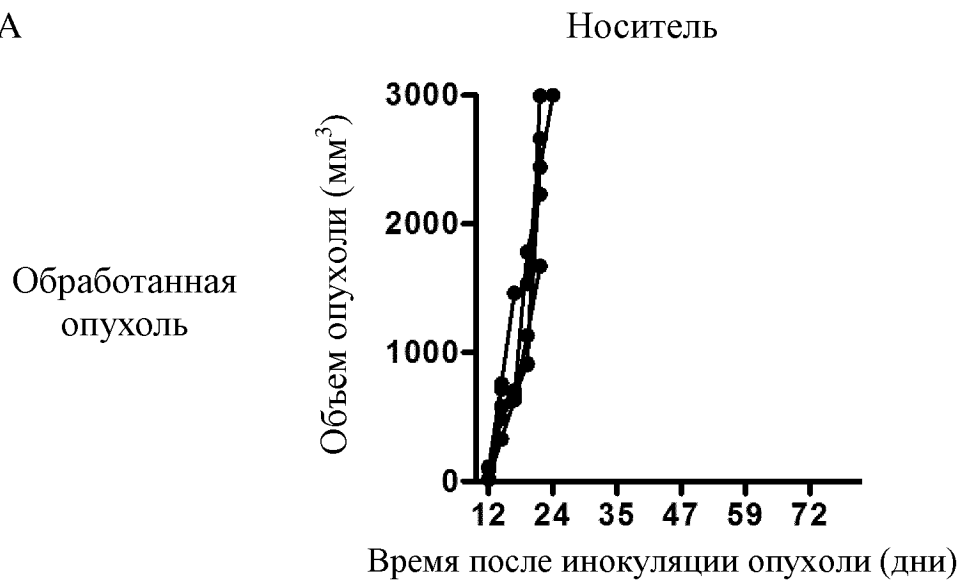


средняя выживаемость

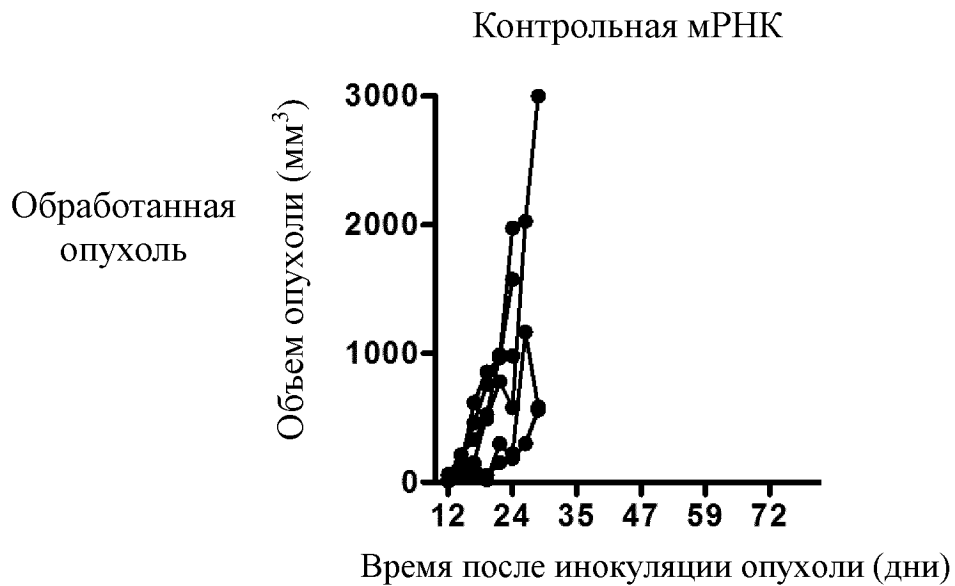
- Контрольная мРНК 23
- TriMix мРНК 34

ФИГ. 6

А

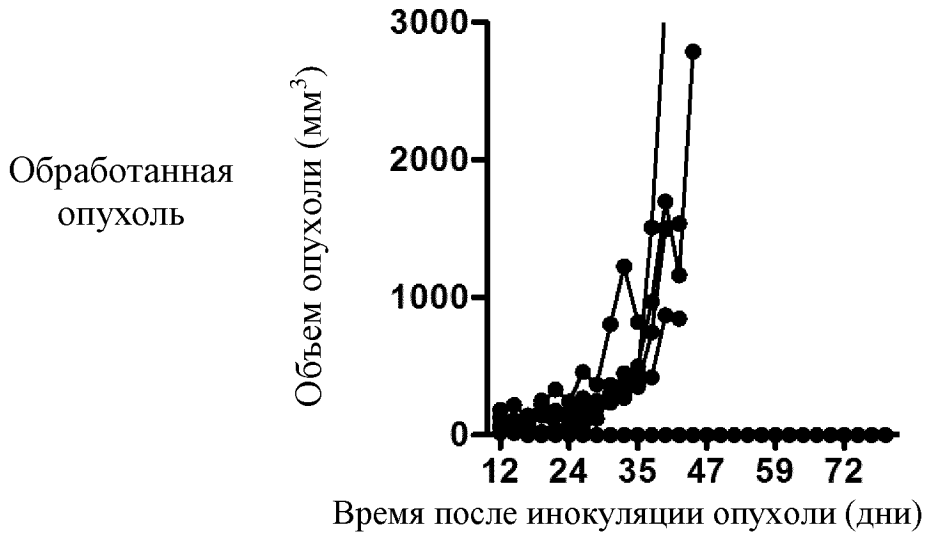


В



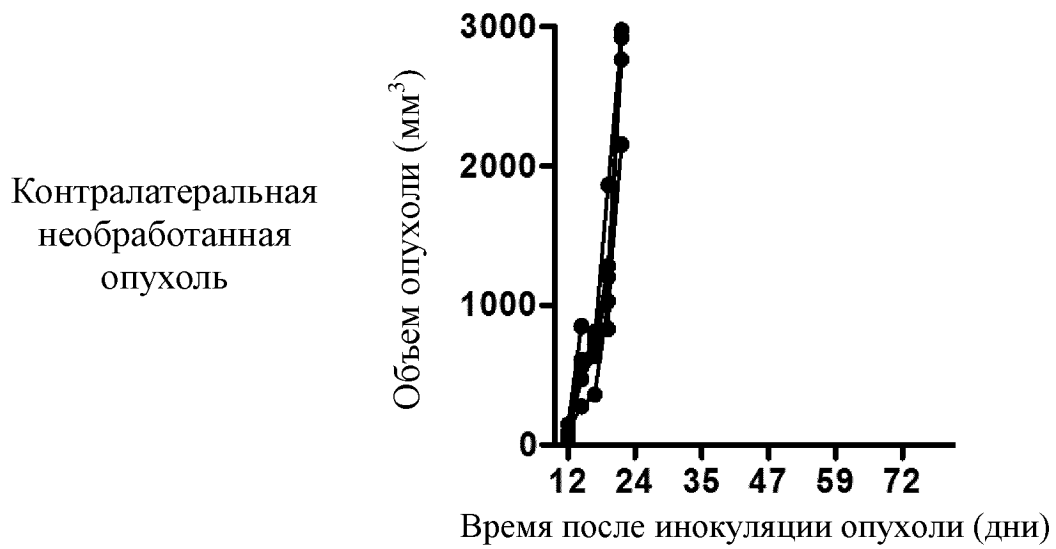
C

TriMix мРНК



D

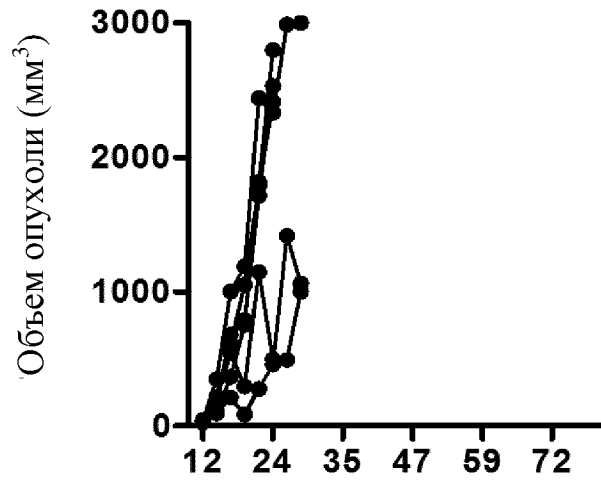
Носитель



E

Контрольная мРНК

Контралатеральная
необработанная
опухоль

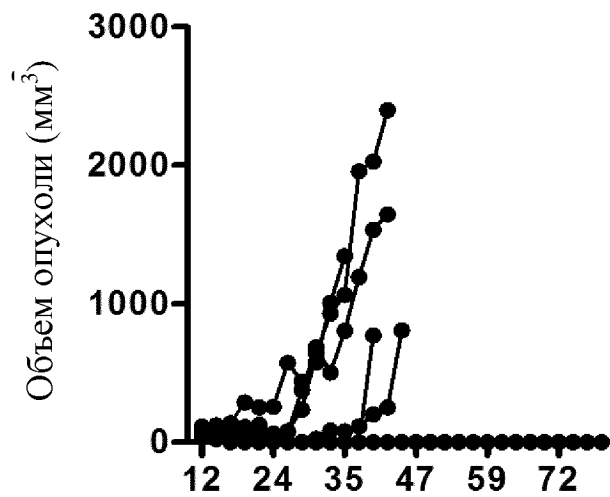


Время после инокуляции опухоли (дни)

F

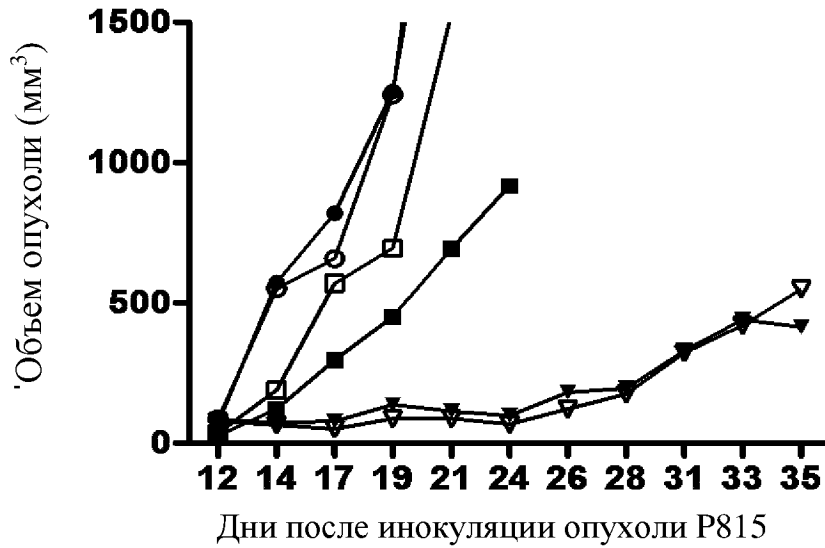
TriMix мРНК

Контралатеральная
необработанная
опухоль



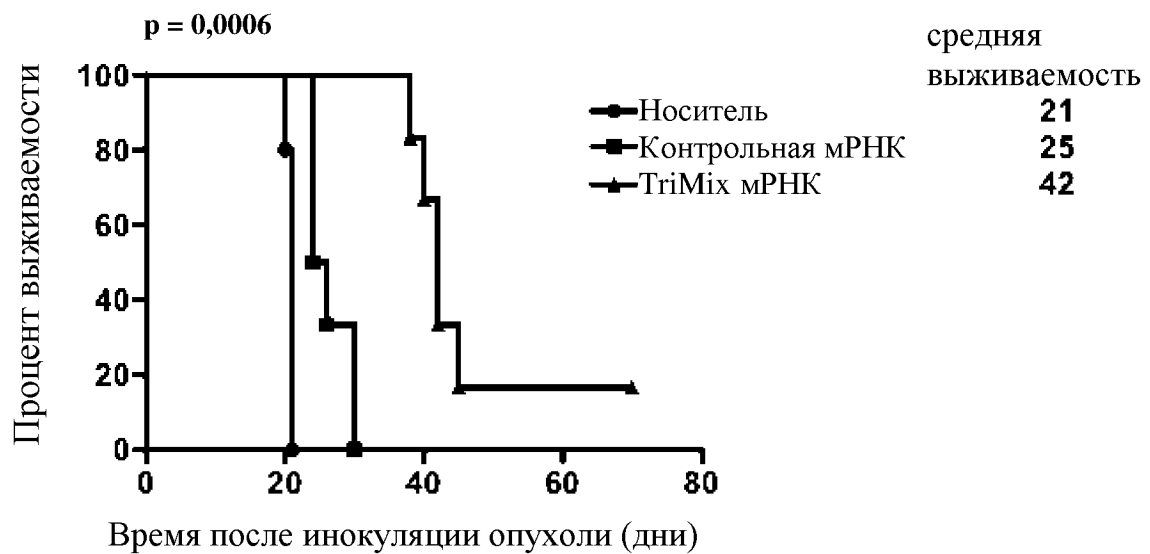
Время после инокуляции опухоли (дни)

G

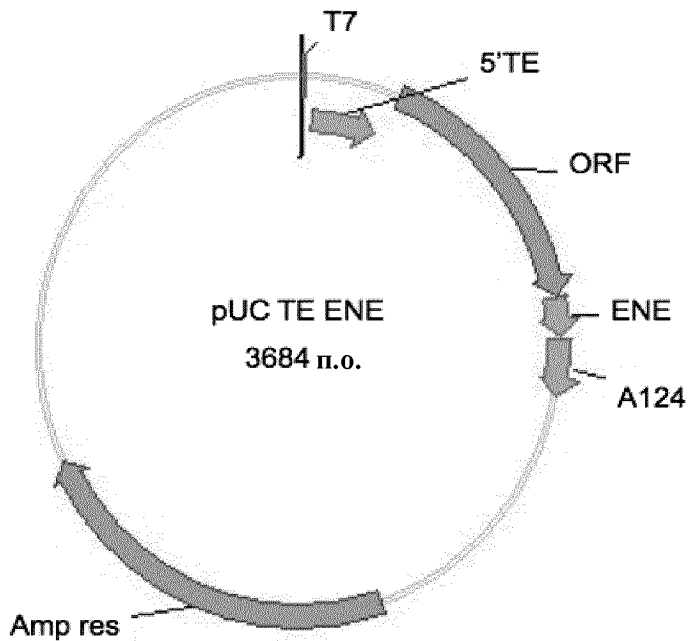


- Обработанная опухоль Носитель
- Необработанная опухоль Носитель
- Обработанная опухоль Контрольная мРНК
- Необработанная опухоль Контрольная мРНК
- ▲ Обработанная опухоль TriMix мРНК
- △ Необработанная опухоль TriMix мРНК

H



ФИГ. 7



ФИГ. 8

SEQ ID N° 1:	100%	89%	92%
SEQ ID N° 2:	89%	100%	99%
SEQ ID N° 3:	92%	99%	100%

```

SEQ ID N°3  AAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCGGCGGAATTCTGACATCCGGCGGGAATTCTGAC
SEQ ID N°1  -----ggCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGAC
SEQ ID N°2  AAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGTTTCTGAC
                *****. ; *****. ; *****
    
```

```

SEQ ID N°3  ATCCGGCGGGAATTCTGACATCCGGCGGGAATTCTGACATCCGGCGGAA-----TTCTGAC
SEQ ID N°1  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTGAATTCTTCTGAC
SEQ ID N°2  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGT-----TTCTGAC
                *****. ; *****. ; *****. ; *****
    
```

```

SEQ ID N°3  ATCCGGCGGGAATTCTGACATCCGGCGGGAATTCTGACATCCGGCGGGAATTCTGACATCCGG
SEQ ID N°1  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGG
SEQ ID N°2  ATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATCCGG
                *****. ; *****. ; *****. ; *****
    
```

```

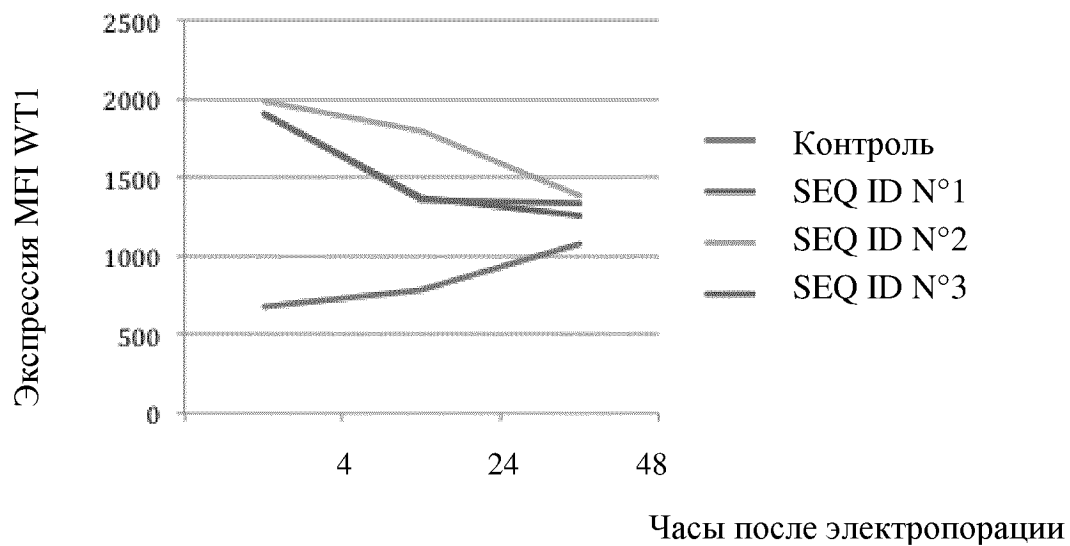
SEQ ID N°3  CGGAATTCTGACATCCGGCGGGAATTCTGACATTCACAACCAGGCCTCCACAACCATGGCT
SEQ ID N°1  CGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTGAC-----TCACAACCAGGCCTCCACAACc-----
SEQ ID N°2  CGGGTTTCTGACATCCGGCGGGTTTCTGACATTCACAACCAGGCCTCCACAACCATGGCT
                ***. ; *****. ; * *****
    
```

```

SEQ ID N°3  CGAG
SEQ ID N°1  ----
SEQ ID N°2  CGAG
    
```

ФИГ. 9

А



В

