

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091732 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.10(22) Дата подачи заявки
2019.01.18

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/01 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)

(54) КОНСТРУКТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВАКЦИНЫ ИЗ БОЛЬШИХ И МАЛЫХ Т-АНТИГЕНОВ ПОЛИОМАВИРУСА КЛЕТОК МЕРКЕЛЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/619,161

(32) 2018.01.19

(33) US

(86) PCT/US2019/014171

(87) WO 2019/143921 2019.07.25

(88) 2020.04.09

(71) Заявитель:

ДЗЕ УИСТАР ИНСТИТУТ ОФ
ЭНЭТОМИ ЭНД БАЙОЛОДЖИ (US)

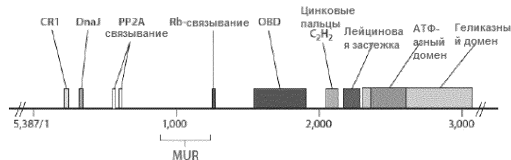
(72) Изобретатель:

Уэйнер Дэвид Б., Дюперре Элизабет
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Молекулы и композиции нуклеиновых кислот, содержащие одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих консенсусный Т-антиген полиомавируса клеток Меркеля (MCV). Раскрыты иммуномодулирующие способы и способы индукции иммунного ответа против MCV. Раскрыт способ лечения инфекции MCV и способы лечения или профилактики карциномы клеток Меркеля, связанной с MCV. Раскрыты модифицированные консенсусные Т-антигены MCV.



202091732

A1

A1

202091732

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563994EA/025

КОНСТРУКТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ВАКЦИНЫ ИЗ БОЛЬШИХ И МАЛЫХ Т-АНТИГЕНОВ ПОЛИОМАВИРУСА КЛЕТОК МЕРКЕЛЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ, СВЯЗАННЫЕ С ЗАЯВКОЙ

Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки США № 62/619161, поданной 19 января 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к вакцинам, предназначенным для индукции иммунных реакций и лечения индивидуумов, инфицированных полиомавирусом клеток Меркеля (MCV), и/или для лечения, или профилактики карциномы клеток Меркеля (МСС). Настоящее изобретение относится к консенсусным онкопротеинам MCV большого Т-антигена (LTA_g) и малого t-антигена (STA_g), и к молекулам нуклеиновых кислот, которые их кодируют.

Уровень техники

Полиомавирус клеток Меркеля (MCV) заслужил недавнее внимание поскольку он связан с раком клеток Меркеля (МСС), агрессивным раком кожи человека. В Соединенных Штатах диагностируется приблизительно 1500 новых случаев МСС в год, уровень смертности субъектов с МСС остается на уровне 46%. МСС убивает больше пациентов, чем кожная Т-клеточная лимфома и хронический миелолейкоз. Большинство (приблизительно 75%) МСС содержат клонально интегрированную вирусную ДНК и экспрессируют транскрипты вирусного Т-антигена и белок.

В настоящее время, клинические испытания вакцин против МСС отсутствуют. Следовательно, в данной области техники существует потребность в терапевтических вакцинах против MCV и МСС. Настоящее изобретение восполняет эту упущенную потребность.

РАСКРЫТИЕ изобретения

В одном варианте воплощения, изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один модифицированный Т-антиген полиомавируса клеток Меркеля, где Т-антиген содержит по меньшей мере одну мутацию, нарушающую по меньшей мере одну онкогенную функцию нативного Т-антигена MCV. В одном варианте воплощения изобретения, по меньшей мере один онкогенный признак представляет собой связывание по меньшей мере одного из CR1, DnaJ, фосфатазы pp2A, Rb, АТФазной активности, геликазной активности, белка шаперона, hVam6p, Fbxw7, связывания сайта точки репликации, и трансформации.

В одном варианте воплощения изобретения, по меньшей мере одна мутация представляет собой мутацию аминокислоты, по меньшей мере одного из перечисленных:

D44, W209, E216, L142, L91, K92, D93, Y94 или M95. В одном варианте воплощения изобретения, по меньшей мере одна мутация представляет собой по меньшей мере одну из мутаций D44N, W209A, E216K, мутаций L142A, мутаций L91A, мутаций K92A, мутаций D93A, мутаций Y94A или мутаций M95A. В одном варианте воплощения изобретения, модифицированный Т-антиген MCV содержит по меньшей мере одну из мутаций D44N, мутаций W209A или E216K. В одном варианте воплощения изобретения, модифицированный Т-антиген MCV содержит мутацию D44N, мутацию W209A и мутацию E216K.

В одном варианте воплощения изобретения, по меньшей мере один Т-антиген MCV представляет собой большой Т-антиген (LTA_g) или малый t-антиген (STA_g). В одном варианте воплощения изобретения, по меньшей мере один Т-антиген MCV представляет собой комбинацию LTA_g и STA_g.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует пептид, содержащий: а) аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере приблизительно на 90% по всей длине аминокислотной последовательности по меньшей мере одному из SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, б) иммуногенный фрагмент, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичный по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, в) аминокислотную последовательность SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или г) иммуногенный фрагмент, включающий по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере одного из: а) нуклеотидную последовательность, идентичную по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине нуклеотидной последовательности по меньшей мере одному из SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, б) иммуногенный фрагмент нуклеотидной последовательности, идентичный по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности с по меньшей мере одной из SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, в) нуклеотидную последовательность SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или d) иммуногенный фрагмент нуклеотидной последовательности SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5.

В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид, функционально связана по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. В одном варианте воплощения изобретения, регуляторная последовательность представляет собой по меньшей мере одно из: стартового кодона, лидерной последовательности IgE или стоп-кодона.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует пептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере

одного из а) аминокислотной последовательности, идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% по всей длине аминокислотной последовательности, по меньшей мере одной из SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, б) иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, в) аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, функционально связанного с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №7.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере одной из: а) нуклеотидной последовательности идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% по всей длине нуклеотидной последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, б) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, идентичного по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, в) нуклеотидной последовательности SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или г) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, функционально связанного с нуклеотидной последовательностью, кодирующей SEQ ID №7.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит вектор экспрессии.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.

В одном варианте воплощения изобретения, иммуногенная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

В одном варианте воплощения изобретения, иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной из: а) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере приблизительно на 90% по всей длине аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, б) иммуногенного фрагмента идентичного, по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, в) аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты

представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере одного из: а) нуклеотидную последовательность, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичную по всей длине нуклеотидной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №1, SEQ ID №3, или SEQ ID №5, б) иммуногенный фрагмент нуклеотидной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичный по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, в) нуклеотидную последовательность SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или г) иммуногенный фрагмент нуклеотидной последовательности SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5.

В одном варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид, функционально связана по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. В одном варианте воплощения изобретения, регуляторная последовательность представляет собой по меньшей мере одну из: стартового кодона, лидерной последовательности IgE или стоп-кодона.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует пептид, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере одной из: а) аминокислотной последовательности, идентичной, по меньшей мере приблизительно на 90% по всей длине аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, б) иммуногенного фрагмента идентичного, по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, в) аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, функционально связанного с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №7.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность по меньшей мере одной из: а) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере приблизительно на 90% идентичной по всей длине нуклеотидной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, б) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, идентичного по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, в) нуклеотидной последовательности SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или г) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, функционально связанного с нуклеотидной последовательностью, кодирующей SEQ ID №7.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты

содержит вектор экспрессии.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей пептид, в которой пептид включает аминокислотную последовательность по меньшей мере одну из: а) аминокислотную последовательности, идентичную, по меньшей мере приблизительно, на 90% по всей длине аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 или SEQ ID № 6, б) иммуногенный фрагмент аминокислотной последовательности, идентичный, по меньшей мере приблизительно, на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID № 2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, в) аминокислотную последовательность SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или г) иммуногенный фрагмент аминокислотной последовательности, включающий по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к пептиду, включающему аминокислотную последовательность по меньшей мере одну из: а) аминокислотную последовательность, идентичную, по меньшей мере приблизительно, на 90% по всей длине аминокислотной последовательности по меньшей мере одному из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, б) иммуногенный фрагмент аминокислотной последовательности, идентичный, по меньшей мере приблизительно, на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности по меньшей мере одной из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, в) аминокислотную последовательность SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или г) иммуногенный фрагмент аминокислотной последовательности, включающий по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности SEQ ID № 2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к способу индукции иммунного ответа против Т-антигена MCV у нуждающегося в этом субъекта, при этом указанный способ включает введение иммуногенной композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный антиген Т- полиомавируса клеток Меркеля (MCV), где Т-антиген содержит по меньшей мере одну мутацию, нарушающую по меньшей мере один онкогенный признак нативного Т-антигена MCV субъекта.

В одном варианте воплощения изобретения, способ введения включает по меньшей мере один из способов: электропорация или инъекция.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к способу лечения или профилактики патологии, связанной с MCV, у нуждающегося в этом субъекта, причем способ включает введение иммуногенной композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный антиген Т-клеточного полиомавируса Меркеля (MCV), где Т-антиген содержит по меньшей мере одну мутацию, нарушающую по меньшей мере одну онкогенную особенность нативного Т-антигена

MCV у субъекта.

В одном варианте воплощения изобретения, способ введения включает по меньшей мере одно из следующего: электропорация или инъекция.

В одном варианте воплощения изобретения, патология, связанная с MCV, представляет собой по меньшей мере одно из следующего: MCV инфекция или карцинома клеток Меркеля.

Краткое описание ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1, включающей фигуры 1А и 1В, представлены принципиальные схемы LTA_g и STA_g. На фигуре 1А показаны онкогенные признаки LTA_g и STA_g. На фигуре 1В показано, что конструкция LTA_g и STA_g вакцины на основе нуклеиновой кислоты включает в себя несколько мутаций для нарушения онкогенных признаков. * D44N- блокирует связывание с белками-шаперонами; * W209A - блокирует привязку к hVam6p; * E216K - блокирует связывание с Rb и предотвращает трансформацию; * L142A- блокирует связывание с PP2A; * 91-95LKDYM-> AAAAAA- блокирует связывание с Fbxw7 и предотвращает трансформацию.

На фигуре 2, включающей фигуры 2А и 2В, представлены принципиальные схемы консенсусных LTA_g и STA_g. Фигура 2А изображает диаграмму консенсусной последовательности LTA_g, сконструированной из всех доступных в NCBI последовательностей LTA_g. На фигуре 2В показана схема консенсусной последовательности STA_g, сконструированной из всех доступных в NCBI последовательностей STA_g. Эти антигенные последовательности были синтезированы и клонированы в плазмиду экспрессии млекопитающего, создавая конструкции плазмидной ДНК для экспрессии синтетических консенсусных антигенов *in vivo*.

Фигура 3 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующих экспрессию консенсусного MCC LTA_g *in vitro*. Экспрессия консенсусного MCC STA_g не была обнаружена из-за отсутствия эффективных антител против STA_g.

Фигура 4, включающая фигуры 4А и 4В, изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие индукцию иммунного ответа после вакцинации LTA_g и STA_g отдельно или в комбинации. Фигура 4А изображает дизайн эксперимента. Мыши получали плазмидную ДНК с последующей внутримышечной электропорацией на нулевой день, 14 день и 28 день. Через неделю собирали спленоциты для анализа. Вакцинировали четыре группы мышей: группа 1 - pVax-пустой контрольный вектор; группа 2 - вакцина LTA_g; 3 группа - вакцина STA_g; группа 4 - вакцины LTA_g и STA_g одновременно. На фигуре 4В изображены экспериментальные данные, показывающие индукцию иммунного ответа после вакцинации LTA_g и STA_g по отдельности или в комбинации, и отсутствие индукции после вакцинации пустым контрольным вектором (pVax). Для проведения этих экспериментов, пептиды были сопоставлены с соответствующими последовательностями без инактивирующих мутаций.

На фигуре 5, включающей фигуры 5А и 5В, представлены примеры экспериментальных данных, характеризующие иммунодоминантные эпитопы LTA_g и

STAg. Фигура 5A изображает иммунодоминантные эпитопы для вакцинации LTA_g. Фигура 5B изображает иммунодоминантные эпитопы для вакцинации STAg.

На фигуре 6 представлены результаты анализа степени процессинга больших Т-антигенов МСС в образцах карциномы клеток Меркеля человека. Данные были получены из 42 последовательностей больших Т-антигенов, скачанных из GenBank.

На фигуре 7, включающей фигуры 7A-7F, представлены примеры экспериментальных данных, демонстрирующие уровни ответов Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ на цитокины после вакцинации и стимуляции пептидами LTA_g в течение 5 часов. На фигуре 7A показаны уровни ответа CD8⁺ Т-клеток против ИФН γ . На фигуре 7B показаны уровни ответа CD8⁺Т-клеток против ФНО α . На фигуре 7C показаны уровни ответа CD8⁺Т-клеток против ИЛ-2. На фигуре 7D показаны уровни ответа CD4⁺ Т-клеток против ИФН γ . На фигуре 7E показаны уровни ответа CD4⁺Т-клеток против ФНО α . На фигуре 7F показаны уровни ответа CD4⁺ Т-клеток против ИЛ-2.

Фигура 8 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие, что вакцинация LTA_g индуцирует устойчивые полифункциональные CD8 Т-клетки.

Фигура 9 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие, что вакцинация LTA_g индуцирует устойчивые полифункциональные CD4 Т-клетки.

Фигура 10 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие, что вакцинация LTA_g индуцирует CD8 Т-клетки с цитотоксическим потенциалом, коэкспрессирующие CD107a, ИФН γ и T-bet.

Фигура 11 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие, что антигенные вакцины, основанные на больших и малых Т-антигенах генерируют гуморальные ответы, подтвержденные при использовании мышиной сыворотки в качестве источника первичных антител.

Фигура 12 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие, что вакцина LTA_g индуцирует устойчивые иммунные ответы у генетически разнообразных беспородных CD-1 мышей.

Фигура 13 изображает примеры экспериментальных данных, демонстрирующие, что вакцина STAg индуцирует иммунные ответы у генетически разнообразных беспородных CD-1 мышей.

На фигуре 14, включающей фигуры 14A-14F, представлены примеры экспериментальных данных, демонстрирующие уровни ответов Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ на цитокины после вакцинации у беспородных мышей CD-1 и стимуляции пептидами LTA_g в течение 5 часов. На фигуре 14A показаны уровни ответа CD8⁺Т-клеток против ИФН γ . На фигуре 14B показаны уровни ответа CD8⁺Т-клеток против ФНО α . На фигуре 14C показаны уровни ответа CD8⁺Т-клеток против ИЛ-2. На фигуре 14D показаны уровни ответа CD4⁺Т-клеток против ИФН γ . На фигуре 14E показаны уровни ответа CD4⁺Т-клеток против ФНО α . На фигуре 14F показаны уровни ответа CD4⁺Т-клеток против ИЛ-2.

Фигура 15, содержащая фигуры 15A-15F, представляет примеры экспериментальных данных, демонстрирующие уровни ответов Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ на

цитокины после вакцинации у беспородных мышей CD-1 и стимуляции пептидами STAg в течение 5 часов. На фигуре 15A показаны уровни ответа CD8+Т-клеток против ИФН γ . На фигуре 15B показаны уровни ответа CD8+Т-клеток против ФНО α . На фигуре 15C показаны уровни ответа CD8+Т-клеток против ИЛ-2. На фигуре 15D показаны уровни ответа CD4+Т-клеток против ИФН γ . Фигура 15E изображает уровни ответа CD4+Т-клеток против ФНО α . На фигуре 15F показаны уровни ответа CD4+Т-клеток против ИЛ-2.

Подробное описание

Полиомавирусная инфекция клеток Меркеля (MCV) связана с карциномой клеток Меркеля (MCC) и в настоящее время имеет 46% уровень смертности.

В одном варианте воплощения, изобретение включает вакцину на основе нуклеиновой кислоты против MCV и MCC. В одном варианте воплощения изобретения, вакцина содержит плазмиду, кодирующую консенсусный Т-антиген MCV. В одном варианте воплощения изобретения, консенсусный Т-антиген MCV представляет собой большой Т-антиген (LTA γ). В одном варианте воплощения изобретения, консенсусный Т-антиген MCV представляет собой малый t-антиген (STAg). В одном варианте воплощения изобретения, консенсусные Т-антигены MCV дополнительно содержат мутации, нарушающие онкогенные свойства нативных Т-антигенов. В качестве кандидат-вакцины, усовершенствованная платформа на основе ДНК обеспечивает много преимуществ для генетической оптимизации и методов доставки. Как таковой, каждый Т-антиген MCV может быть генетически оптимизирован, субклонирован в модифицированные векторы экспрессии млекопитающих, а затем доставлен с использованием электропорации *in vivo* (ЭП).

Вакцинация в доклинических исследованиях на грызунах была сильнодействующей, поскольку вакцинация синтетическими консенсусными Т-антигенными конструкциями MCV генерирует устойчивые иммунные ответы.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, стратегия включает кодирующую последовательность синтетического консенсусного Т-антигена MCV. Предусмотрена кодирующая последовательность для LTA γ и STAg. В некоторых вариантах воплощения изобретения, стратегия включает кодирующие последовательности единственного синтетического консенсусного Т-антигена MCV. В некоторых вариантах воплощения изобретения, в стратегии используются кодирующие последовательности для нескольких синтетических консенсусных Т-антигенов MCV.

Будучи кандидат-вакциной, ДНК-вакцины обладают множеством преимуществ, включая быстрое и недорогое увеличение производства, стабильность при комнатной температуре и простоту транспортировки. Все вышеперечисленные преимущества улучшают данную платформу с экономической и географической точек зрения. Из-за синтетической природы плазмид, антигенные последовательности могут быть быстро и легко модифицированы в ответ на вновь возникающие штаммы и/или расширены для включения дополнительных компонентов вакцины.

Оптимизация векторов плазмидных ДНК и кодируемых ими генов антигенов привела к

увеличению иммуногенности *in vivo*. Клеточное поглощение и последующая экспрессия антигена существенно усиливаются, когда высококонцентрированные плазмидные вакцинные композиции вводят с помощью электропорации *in vivo* - технологии, применяющей короткие прямоугольные электрические импульсы в месте вакцинации для доставки плазмид во временно проницаемые клетки. Теоретически, можно собрать коктейль из плазмидных ДНК для направления высокоспециализированного иммунного ответа против любого количества вариабельных антигенов. Кроме того, иммунитет может быть направлен на совместную доставку с плазмидными молекулярными адъювантами, кодирующими видоспецифичные гены цитокинов, а также на «консенсус-инжиниринг» аминокислотных последовательностей антигена для смещения иммунитета, вызванного вакциной, к определенным штаммам.

1. Определения.

В контексте данного документа, все технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно известно специалистам в данной области техники, если не указано иное. В случае противоречий, настоящий документ, включая определения, является контрольным. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, также могут использоваться на практике или при тестировании настоящего изобретения. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые здесь, включены в качестве ссылки во всей их полноте. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения изобретения.

Термины «содержит (ат)», «включает (ют)», «имеет (ют)», «имеющий», «могут», «состоит (ят)» и их варианты, в контексте данного документа, являются неограничивающими переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможных дополнительных действий или структур. Формы единственного числа подразумевают множественные варианты, кроме случаев когда контекст явно указывает иное. В настоящем раскрытии изобретения также рассматриваются другие варианты воплощения изобретения, «содержащие», «состоящие из» и «состоящие по существу из» предложенных в данном документе вариантов воплощения или элементов, независимо от того, изложены они явно или нет.

«Адъювант», в контексте данного документа, может означать любую молекулу, добавленную к вакцинам нуклеиновой кислоты для усиления антигенности вакцины.

«Антитело» может означать антитело, принадлежащее к классам IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или его фрагменты, или производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, диатела, биспецифичные антитела, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может являться антителом, выделенным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, аффинно-очищенным антителом или их смесью, которая проявляет достаточную специфичность связывания с желаемым эпитопом или полученной из него последовательностью.

В контексте данного документа, термины «фрагмент антитела» или «антительный

фрагмент» взаимозаменяемы и относятся к части интактного антитела, содержащей антигенсвязывающий сайт или вариабельную область. Эта часть не включает константные домены тяжелой цепи (то есть CH2, CH3 или CH4, в зависимости от изотипа антитела) области Fc интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, фрагменты Fab', фрагменты Fab'-SH, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатела, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), одноцепочечные полипептиды, содержащие только один вариабельный домен легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR вариабельного домена легкой цепи, одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну вариабельную область тяжелой цепи, и одноцепочечные полипептиды, содержащие три CDR: вариабельной области тяжелой цепи, но не ограничиваясь ими.

«Антиген» относится к белкам, обладающим способностью генерировать иммунный ответ у хозяина. Антиген может быть распознан и связан антителом. Антиген может происходить из организма или из внешней среды.

В контексте данного документа, термины «кодирующая последовательность» или «кодирующая нуклеиновая кислота» могут относиться к нуклеиновой кислоте (молекуле РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодированная последовательность может дополнительно включать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая сигнал промотора и полиаденилирования, способный направлять экспрессию в клетках индивидуума или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту. Кодированная последовательность может необязательно дополнительно содержать стартовый кодон, кодирующий N-концевой метионин или сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид IgE или IgG.

Термины «комплементарный» или «комплементарность», в контексте данного документа, могут означать, что нуклеиновая кислота может образовывать пары с другими нуклеотидами, нуклеотидными аналогами или молекулами нуклеиновой кислоты по правилу Уотсона-Крика (например, A-T/U и C-G) или Хугстина.

«Консенсус» или «консенсусная последовательность», в контексте данного документа, могут означать синтетическую нуклеотидную последовательность или соответствующую полипептидную последовательность, сконструированную на основе анализа выравнивания множества последовательностей (например, множественных последовательностей конкретного вирусного антигена).

Термин «постоянный ток», в контексте данного документа, описывает ток, который воспринимается или которому подвергается ткань или клетки, определяющие указанную ткань, в течение времени воздействия электрического импульса, доставляемого в ту же ткань. Электрический импульс подается от устройств электропорации, описанных в данном документе. Плотность тока остается постоянной в указанной ткани в течение всего времени воздействия электрического импульса, поскольку устройство электропорации, предложенное в настоящем документе, имеет элемент обратной связи,

предпочтительно обладающий мгновенной обратной связью. Элемент обратной связи позволяет измерять сопротивление ткани (или клеток) на протяжении всего времени воздействия электрического импульса и вызывать изменение выходной электрической мощности устройства электропорации (например, увеличивать напряжение) таким образом, чтобы плотность тока в одной и той же ткани оставался постоянной в течение всего времени воздействия электрического импульса (порядка микросекунд) и от импульса к импульсу. В некоторых вариантах воплощения изобретения, элемент обратной связи содержит контроллер.

Термины «обратная связь по току» или «обратная связь», в контексте данного документа, могут использоваться взаимозаменяемо и могут означать активную реакцию предложенных устройств электропорации, которая включает измерение тока в ткани между электродами и соответственно изменение энергии, выделяемой устройством ЭП для поддержания тока на постоянном уровне. Этот постоянный уровень задается пользователем до начала импульсного режима или электрического воздействия. Обратная связь может быть обеспечена компонентом электропоратора, например, контроллером электропоратора, поскольку его электрическая цепь способна непрерывно контролировать ток в ткани между электродами и сравнивать этот контролируемый ток (или ток в ткани) с заданным током и непрерывно производить регулировку выходной энергии для поддержания контролируемого тока на заданных уровнях. Цикл обратной связи может быть мгновенным, поскольку он является аналогом обратной связи замкнутого контура.

Термин «децентрализованный ток», в контексте данного документа, может означать паттерн электрических токов, подаваемых из различных массивов игольчатых электродов электропораторов, описанных в данном документе, при которых паттерны минимизируют или предпочтительно устраняют возникновение теплового напряжения, связанного с электропорацией, в любой области электропорлируемой ткани.

Термины «электропорация», «электропермеабиллизация» или «электрокинетическое усиление» («ЭП»), в контексте данного документа, взаимозаменяемы и могут означать воздействие трансмембранного импульса электрического поля для индукции микроскопических отверстий (пор) в биомембране; их присутствие позволяет таким биомолекулам, как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарства, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

«Эндогенное антитело», в контексте данного документа, может относиться к антителу, вырабатываемому субъектом, которому вводят эффективную дозу антигена для индукции гуморального иммунного ответа.

«Механизм обратной связи», в контексте данного документа, может относиться к процессу, выполняемому программным или аппаратным обеспечением (или программно-аппаратным обеспечением), в процессе которого получают и сравнивают импеданс желаемой ткани (до, во время и/или после доставки импульса энергии) с текущим значением, предпочтительно током, и регулируют импульс энергии, доставляемой для достижения заданного значения. Механизм обратной связи может быть выполнен

аналоговым замкнутым контуром.

«Фрагмент» может означать процент от полной длины полипептидной последовательности или нуклеотидной последовательности. Фрагменты могут содержать 20% или более, 25% или более, 30% или более, 35% или более, 40% или более, 45% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более процентов от полной длины исходной нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности, или ее варианта.

В контексте данного документа, термин «генетическая конструкция» относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, такой как антитело. Генетическая конструкция может также относиться к молекуле ДНК, которая транскрибирует РНК. Кодированная последовательность включает сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая сигналы промотора и полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках субъекта, к которому применяют молекулу нуклеиновой кислоты. В контексте данного документа, термин «экспрессируемая форма» относится к генной конструкции, которая содержит необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей белок последовательностью таким образом, при котором кодирующая последовательность будет экспрессироваться при нахождении в клетке субъекта.

В контексте данного документа, термины «идентичный» или «идентичность», относительно двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, могут означать, что последовательности имеют определенный процент остатков, одинаковых в указанной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в указанной области, определения количества позиций, в которых одинаковый остаток встречается в обеих последовательностях для получения количества совпадающих позиций, деления количества совпавших позиций на общее количество позиций в указанной области и умножение результата на 100 для получения процента идентичности последовательности. В тех случаях, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание приводит к одному или более ступенчатым разрывам, а указанная область сравнения включает только одну последовательность, при вычислении, остатки одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентификация может быть выполнена вручную или с помощью компьютерного алгоритма для последовательности, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Термин «импеданс», в контексте данного документа, может использоваться при рассмотрении в деталях механизма обратной связи, когда, в соответствии с законом Ома, импеданс может быть преобразован в текущее значение тока, позволяя при этом,

осуществлять сравнения с задаваемым значением тока

«Иммунный ответ», в контексте данного документа, может означать активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на введение одного или более консенсусных антигенов с помощью предложенных вакцин. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа, или в обеих формах.

Термины «нуклеиновая кислота» или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид», в контексте данного документа, могут означать по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных друг с другом. Изображение одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь изображенной одиночной цепи. Многие варианты нуклеиновой кислоты могут быть использованы для той же цели, что и приведенная нуклеиновая кислота. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает идентичные по существу нуклеиновые кислоты и их дополнения. Одиночная цепь также включает зонд, который может гибридизоваться с последовательностью-мишенью при жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, или могут содержать части как двухцепочечной, так и одноцепочечной последовательности. Нуклеиновая кислота может быть ДНК, как геномной, так и кДНК, РНК или гибридной, где нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты могут быть получены способами химического синтеза или рекомбинантными способами.

«Функционально связанный», в контексте данного документа, означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен на 5'-(восходящем) или 3'-(нисходящем) конце подконтрольного гена. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как расстояние между этим промотором и геном, который он контролирует и откуда происходит. Как уже известно в данной области техники, изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери функции промотора.

Термины «пептид», «белок» или «полипептид», в контексте данного документа, могут означать связанную последовательность аминокислот и могут быть природными, синтетическими или модифицированными, или комбинированными из природных и синтетических.

«Промотор», в контексте данного документа, может означать синтетическую или полученную в природе молекулу, которая способна придавать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических регуляторных транскрипционных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или изменения пространственной экспрессии и /или временной экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор также может

содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут находиться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от стартового сайта транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включая вирусные, бактериальные, грибковые, растительные, насекомые и животные. Промотор может регулировать экспрессию генного компонента конститутивно или дифференциально по отношению к клетке, ткани или органу, в котором происходит экспрессия, относительно стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или возбуждающие агенты. Типичные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE.

«Сигнальный пептид» и «лидерная последовательность» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть связана с аминогруппой на конце белка, изложенного в данном документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности обычно направляют локализацию белка. В контексте данного документа, сигнальные пептиды/лидерные последовательности оптимально облегчают секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется. При секреции из клетки, сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остатка белка, обычно называемого зрелым белком. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности связаны с N-концом белка.

«Жесткие условия гибридизации», в контексте данного документа, может означать условия, при которых первая молекула нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизоваться со второй молекулой нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в сложной смеси нуклеиновых кислот. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Жесткие условия могут быть выбраны приблизительно на 5-10°C ниже, чем температура плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенном pH ионной силы. T_m может быть температурой (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеинов), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесии (так как последовательности мишени присутствуют в избытке, при T_m , 50% зондов равновесно связаны). При жестких условиях концентрация соли может составлять менее чем приблизительно 1,0 М иона натрия, например, концентрация приблизительно 0,01-1,0 М иона натрия (или других солей) при pH 7,0-8,3, и температура по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, приблизительно 10-50 нуклеотидов) и, по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, больше, чем приблизительно 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты благодаря добавлению дестабилизирующих агентов, таких как формамид. При селективной или специфической гибридизации, положительный сигнал может по меньшей мере в 2-10 раз превышать фоновую гибридизацию. Примерные жесткие условия гибридизации включают следующие: 50% формамид, 5x стандартный

солевой раствор и 1% СДС, инкубирование при 42°C или 5х стандартный солевой раствор, 1% СДС, инкубирование при 65°C, с отмывкой в 0,2х стандартном солевом растворе и 0,1% СДС при 65°C.

Термины «субъект» и «пациент» в данном описании используются взаимозаменяемо и могут относиться к любым позвоночным животным, включая, без ограничений, млекопитающих (например, корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяки, морская свинка, кошка, собака, крыса и мышь, низший примат (например, обезьяна, такая как циномолгус или резус, шимпанзе и т. д. и человек). В некоторых вариантах воплощения, субъект может быть или не быть человеком.

Термин «существенно комплементарный», в контексте данного документа, может означать, что первая последовательность составляет по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности комплементу второй последовательности покрывая участок из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизуются в жестких условиях гибридизации.

Термин «существенно идентичный», в контексте данного документа, может означать, что первая и вторая последовательности составляют по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности покрывая участок из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 или более нуклеотидов или аминокислот или по отношению к нуклеиновым кислотам, если первая последовательность является по существу комплементарной комплементу второй последовательности.

Термины «лечить» или «лечение», в контексте данного документа, могут означать защиту субъекта от заболевания посредством средств предотвращения, подавления, угнетения или полного устранения заболевания. Профилактика заболевания включает введение вакцины, описанной в настоящем изобретении, субъекту до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение вакцины, описанной в настоящем изобретении, субъекту после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Подавление заболевания включает введение вакцины, описанной в настоящем изобретении, субъекту после клинического проявления заболевания.

В контексте данного документа, термин «вариант», в отношении нуклеиновой кислоты, может означать (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент эталонной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) нуклеиновую кислоту, которая существенно идентична указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементом или последовательностью, существенно ей идентичной.

В контексте данного документа, термин «вариант», в отношении пептида или

полипептида, означает пептид или полипептид, отличающийся по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая существенно идентична эталонному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативное замещение аминокислоты, то есть замена аминокислоты другой аминокислотой со схожими свойствами (например, гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей), как известно в данной области техники, обычно включает незначительные изменения. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, частично, с учетом гидропатического индекса аминокислот, что является известным в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157: 105-132 (1982). Гидропатический индекс аминокислоты основан на учете ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с подобными гидропатическими индексами могут быть замещены друг другом с одновременным сохранением функции белка. В одном аспекте, аминокислоты, имеющие гидропатические индексы ± 2 , являются замещенными. Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замещений с сохранением биологической функции белков. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, что является полезным оценочным критерием, который, как упоминалось, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101 полностью включен в данный документ в качестве ссылки. Замена аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может привести к сохранению пептидами биологической активности, например иммуногенности, подразумеваемой данной областью техники. Для замены можно использовать аминокислоты, имеющие значения гидрофильности в пределах ± 2 друг для друга. На индекс гидрофобности и значение гидрофильности аминокислот влияет определенная боковая цепь этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением считается, что аминокислотные замены, совместимые с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, от боковых цепей этих аминокислот, что проявляется в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах.

Вариант может являться последовательностью нуклеиновой кислоты, которая практически идентична по всей длине полной последовательности гена или ее фрагмента. Последовательность нуклеиновой кислоты может составлять 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по всей длине генной последовательности или ее фрагмента. Вариант может являться аминокислотной последовательностью, которая существенно идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента. Аминокислотная последовательность может составлять 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 95, 96, 97, 98, 99 или 100%

идентичности по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

Термин «вектор», в контексте данного документа, может означать молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую источник репликации. Вектор может являться вирусным вектором, бактериофагом, бактериальной искусственной хромосомой или дрожжевой искусственной хромосомой. Вектор может быть вектором ДНК или РНК. Вектор может быть самореплицирующимся внехромосомным вектором или вектором, интегрирующимся в геном хозяина.

Для перечисления числовых диапазонов в данном документе предусматриваются каждые промежуточные числа с одинаковой степенью точности. Например, для диапазона чисел 6-9, числа 7 и 8 рассматриваются в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 подразумеваются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

2. Описание

В изобретении описана оптимизированная консенсусная последовательность, кодирующая Т-антиген MCV. В одном варианте воплощения изобретения, Т- антиген MCV, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, способен вызывать иммунный ответ у млекопитающего. В одном варианте воплощения изобретения, Т-антиген MCV, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может содержать эпитоп(ы), делающие его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого может быть индуцирован иммунный ответ.

Оптимизированная консенсусная последовательность может быть консенсусной последовательностью, полученной из двух или более Т-антигенов MCV. Оптимизированная консенсусная последовательность может содержать консенсусную последовательность и/или модификацию(и) для улучшения экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Козак для увеличения инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности. Т-антиген MCV, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может содержать сигнальный пептид, такой как, например, сигнальный пептид иммуноглобулина, а именно, сигнальный пептид иммуноглобулина Е (IgE) или иммуноглобулина (IgG), но не ограничиваясь ими. В некоторых вариантах воплощения изобретения, антиген, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может содержать метку гемагглютинина (НА). Антиген, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может быть сконструирован таким образом, чтобы вызывать более сильные клеточные и/или гуморальные иммунные ответы в сравнении с соответствующим неоптимизированным антигеном.

В данном документе предложены Т-антигены MCV, которые можно использовать для индукции иммунитета против MCV у генетически разнообразных субъектов, инфицированных MCV. В одном варианте воплощения, настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей одну или более молекул нуклеиновой кислоты,

способных генерировать у млекопитающего иммунный ответ против Т-антигена MCV. Настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, способным генерировать у млекопитающего иммунный ответ против Т-антигена MCV. В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит оптимизированную нуклеотидную последовательность, кодирующую консенсусный Т-антиген MCV.

В одном варианте воплощения изобретения, Т-антигены MCV модифицированы с целью снижения или разрушения по меньшей мере одного онкогенного признака нативного Т-антигена MCV. В различных вариантах воплощения изобретения, Т-антигены MCV модифицированы с целью уменьшения или разрушения по меньшей мере одного из: связывания CR1, связывания DnaJ, связывания фосфатазы pp2A, связывания Rb, активности АТФазы, активности геликазы, связывания белка шаперона, связывания hVam6p, связывания Fbxw7, оригинального связывания и трансформации. В одном варианте воплощения изобретения, Т-антиген MCV содержит по меньшей мере одну мутацию в D44, W209, E216, L142, L91, K92, D93, Y94 или M95 относительно последовательности нативного Т-антигена. В одном варианте воплощения изобретения, Т-антиген MCV содержит по меньшей мере одну из мутаций: мутацию D44N, мутацию W209A, мутацию E216K, мутацию L142A, мутацию L91A, мутацию K92A, мутацию D93A, мутацию Y94A и мутацию M95A. В одном варианте воплощения LTA_g MCV содержит по меньшей мере одну из мутаций: мутацию D44N, мутацию W209A и мутацию E216K. В одном варианте воплощения изобретения, MCV LTA_g содержит мутацию D44N, мутацию W209A и мутацию E216K. В одном варианте воплощения изобретения, MCV STA_g содержит по меньшей мере одну из мутаций: мутацию D44N, мутацию L142A, мутацию L91A, мутацию K92A, мутацию D93A, мутацию Y94A и мутацию M95A. В одном варианте воплощения изобретения, MCV STA_g содержит мутацию D44N, мутацию L142A, мутацию L91A, мутацию K92A, мутацию D93A, мутацию Y94A и мутацию M95A.

Консенсусные аминокислотные последовательности Т-антигенов MCV включают SEQ ID № 2, SEQ ID № 4, их варианты и фрагменты SEQ ID № 2, SEQ ID № 4, и их варианты. Пример аминокислотной последовательности модифицированного синтетического консенсусного LTA_g MCV предложен как SEQ ID №2. Пример аминокислотной последовательности модифицированного синтетического консенсусного MCV STA_g предложен как SEQ ID №2.

В одном варианте воплощения, изобретение относится к композициям, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидную последовательность, которая кодирует модифицированный синтетический консенсусный Т-антиген MCV. В одном варианте воплощения, нуклеотидная последовательность, которая кодирует модифицированный синтетический консенсусный LTA_g MCV, предложена как SEQ ID №1, кодирующая SEQ ID №2. В одном варианте воплощения, нуклеотидная последовательность, которая кодирует модифицированный синтетический консенсусный MCV STA_g, предлагается как SEQ ID №3, кодирующий SEQ ID №4.

В различных вариантах воплощения, изобретение относится к композициям, содержащим комбинацию модифицированного LTA_g и модифицированного STA_g, или одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующие их. Композиции могут содержать множество копий одной молекулы нуклеиновой кислоты, такой как одна плазида, или множество копий двух или более различных молекул нуклеиновой кислоты, таких как две или более различные плазмиды.

Композиции могут содержать одну молекулу нуклеиновой кислоты, такую как плазида, которая содержит кодирующую последовательность множества консенсусных Т-антигенов MCV. В одном варианте воплощения изобретения, композиции могут содержать одну молекулу нуклеиновой кислоты, включающую нуклеотидные последовательности, кодирующие LTA_g MCV и STA_g MCV. В одном варианте воплощения изобретения, каждая кодирующая последовательность каждого консенсусного Т-антигена MCV находится в отдельной плазмиде.

Соответственно, композиции, которые содержат одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих множественные консенсусные Т-антигены MCV, могут находиться в одной плазмиде. В одном варианте воплощения изобретения, композиция содержит одну плазмиду, которая кодирует LTA_g MCV и STA_g MCV под влиянием одного промотора. В таком варианте воплощения изобретения последовательность, кодирующая LTA_g MCV, и последовательность, кодирующая STA_g MCV, могут быть связаны последовательностью пептида слияния, например последовательностью расщепления фурином. Пример аминокислотной последовательности одной конструкции, содержащей модифицированный синтетический консенсусный MCV LTA_g и MCV STA_g, связанный сайтом расщепления фурином, предложен как SEQ ID №6. В одном варианте воплощения изобретения, одиночная нуклеотидная последовательность, кодирующая модифицированный синтетический консенсусный MCV LTA_g и MCV STA_g, связанный последовательностью расщепления фурином, предложена как SEQ ID № 5, кодирующем SEQ ID № 6.

В одном варианте воплощения изобретения, оптимизированный консенсус-кодируемый Т-антиген MCV функционально связан с одним или более регуляторных элементов. В одном варианте воплощения, регуляторный элемент представляет собой лидерную последовательность. В одном варианте воплощения изобретения, лидерная последовательность представляет собой лидерную последовательность IgE. В одном варианте воплощения изобретения, лидерная последовательность IgE имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №7. Следовательно, в одном варианте воплощения, изобретение относится к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, функционально связанной с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №7. В одном варианте воплощения, изобретение относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, функционально связанную с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ

ID №7.

В одном варианте воплощения изобретения, регуляторный элемент представляет собой стартовый кодон. Следовательно, в одном варианте воплощения, изобретение относится к нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или к их фрагменту, или гомологу, функционально связанному с нуклеотидной последовательностью, содержащей стартовый кодон на 5'-конце. В одном варианте воплощения, изобретение относится к аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6, или к их фрагменту или гомологу, функционально связанному с аминокислотой, кодируемой стартовым кодоном (например, метионином) на N-конце.

В одном варианте воплощения, регуляторный элемент представляет собой по меньшей мере один стоп-кодон. Следовательно, в одном варианте воплощения, изобретение относится к нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или к их фрагменту, или гомологу, функционально связанному с нуклеотидной последовательностью, содержащей по меньшей мере один стоп-кодон на 3'-конце. В одном варианте воплощения, для повышения эффективности терминации трансляции, нуклеотидная последовательность функционально связана с двумя стоп-кодонами.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты может кодировать пептид с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6. В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, указанную в SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5. В некоторых вариантах воплощения изобретения, последовательность может являться нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по всей длине нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5. В других вариантах воплощения изобретения, последовательность может являться нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по всей длине аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность РНК, представляющую собой транскрипт последовательности ДНК, идентичный по меньшей мере приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по всей длине нуклеотидной последовательности, указанной в SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5. В некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,

91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по всей длине аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID № 2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный консенсусный Т-антиген MCV. Молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать последовательность, кодирующую SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6. Молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5. Молекула нуклеиновой кислоты может необязательно содержать кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид, такой как, например, сигнальный пептид IgE или IgG.

Консенсусный Т-антиген MCV может быть пептидом с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6. В некоторых вариантах воплощения изобретения, антиген может иметь аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на приблизительно 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% по всей длине аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID №2, SEQ ID № 4 или SEQ ID №6.

Могут быть предоставлены иммуногенные фрагменты SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 или SEQ ID № 6. Иммуногенные фрагменты могут включать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от полной длины SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6. В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммуногенные фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность иммуноглобулина, такую как лидерная последовательность IgE. В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Могут быть предоставлены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6. Такие иммуногенные фрагменты могут составлять по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 95% гомологичны SEQ ID №2, SEQ ID №4 или SEQ ID №6. Некоторые варианты воплощения изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, имеющим 96% гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей, приведенных в данном документе. Некоторые варианты воплощения изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, имеющим 97% гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты воплощения изобретения

относятся к иммуногенным фрагментам, имеющим 98% гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей, приведенных в данном документе. Некоторые варианты воплощения относятся к иммуногенным фрагментам, имеющим 99% гомологию с иммуногенными фрагментами консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения иммуногенные фрагменты включают лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность иммуноглобулина, такую как лидерная последовательность IgE. В некоторых вариантах воплощения изобретения иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

В одном варианте воплощения изобретения, иммуногенный фрагмент молекулы нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере один иммунодоминантный или субиммунодоминантный эпитоп полноразмерного оптимизированного консенсусного Т-антигена MCV.

Некоторые варианты воплощения изобретения относятся к иммуногенным фрагментам SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, составляющим по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от полной длины SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5. Иммуногенные фрагменты могут быть по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичны фрагментам SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5. В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммуногенные фрагменты включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность иммуноглобулина, например, как лидерная последовательность IgE. В некоторых вариантах воплощения изобретения, фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5.

В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность РНК, кодирующую консенсусную последовательность Т-антигена MCV, описанного в данном документе. Например, нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность РНК, кодирующую одну или более последовательностей из SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 или SEQ ID № 6, их вариант, их фрагмент или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты включает последовательность, кодирующую Т-антиген MCV без лидерной последовательности IgE на N-конце кодирующей последовательности. В некоторых

вариантах воплощения, молекула ДНК нуклеиновой кислоты дополнительно содержит лидерную последовательность IgE, присоединенную к N-концу кодирующей последовательности и функционально связанную с промотором.

Молекула нуклеиновой кислоты может дополнительно включать последовательность полиаденилирования, присоединенную на С-конце кодирующей последовательности. В одном варианте воплощения изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодон-оптимизирована.

Вакцины и иммуногенные композиции

Предложены иммуногенные композиции, такие как вакцины, содержащие оптимизированную консенсусную последовательность, оптимизированный консенсусно-кодированный антиген, его фрагмент, его вариант или их комбинацию. Иммуногенная композиция может значительно индуцировать иммунный ответ субъекта, которому вводят иммуногенную композицию против Т-антигена MCV. Вакцина может содержать множество молекул нуклеиновой кислоты или их комбинаций. Вакцина может быть предоставлена для индукции терапевтического или профилактического иммунного ответа.

Иммуногенная композиция может являться ДНК-вакциной, РНК-вакциной, пептидной вакциной или комбинированной вакциной. Вакцина может включать оптимизированную консенсусную нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген. Нуклеотидная последовательность может быть ДНК, РНК, кДНК, ее вариантом, ее фрагментом или их комбинацией. Нуклеотидная последовательность может также включать дополнительные последовательности, кодирующие линкерные, лидерные или tag-последовательности, связанные с антигеном пептидной связью. Пептидная вакцина может включать антиген, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Комбинация ДНК и пептидной вакцины может включать в себя описанную выше оптимизированную консенсусную нуклеотидную последовательность и кодируемый антиген.

Вакцина может быть ДНК-вакциной. ДНК-вакцины раскрыты в патентах США №№ 5,593,972; 5,739,118; 5,817,637; 5,830,876; 5,962,428; 5,981,505; 5,580,859; 5,703,055 и 5,676,954, ссылки на которые полностью включены в настоящее описание. ДНК-вакцина может дополнительно содержать элементы или реагенты, препятствующие ее интеграции в хромосому.

Вакцина может являться РНК одного или более Т-антигенов MCV. РНК-вакцина может быть введена в клетку.

Вакцина может являться аттенуированной живой вакциной, вакциной, использующей рекомбинантные векторы доставки антигена, субъединичной вакциной и гликопротеиновой вакциной, например, вакциной, описанной в патентах США №№ 4,510,245; 4,797,368; 4,722,848; 4,790,987; 4,920,209; 5,017,487; 5,077,044; 5,110,587; 5,112,749; 5,174,993; 5,223,424; 5,225,336; 5,240,703; 5,242,829; 5,294,441; 5,294,548; 5,310,668; 5,387,744; 5,3893,68; 5,424,065; 5,451,499; 5,453,364; 5,462,734; 5,470,734; 5,474,935; 5,482,713; 5,591,439; 5,643,579; 5,650,309; 5,698,202; 5,955,088; 6,034,298; 6,042,836; 6,156,319 и 6,589,529, каждый из которых включен в данный документ

посредством ссылки, но не ограничиваясь ими.

Вакцина, предлагаемая в настоящем изобретении, может отвечать рекомендованным для эффективных вакцин свойствам, таким как, например, безопасность, означающая, что вакцина не вызывает заболевания или смерти сама по себе; защита от болезней; индукция защитного Т-клеточного ответа; и обеспечение простоты применения, небольшое количество побочных эффектов, биологическая стабильность и низкая стоимость за дозу.

В настоящем документе предложена иммуногенная композиция, способная генерировать у млекопитающего иммунный ответ против MCV. Иммуногенная композиция может содержать любую плазмиду из обсуждаемых выше. Иммуногенная композиция может содержать множество плазмид или их комбинации. Иммуногенная композиция может быть предоставлена для индукции терапевтического или профилактического иммунного ответа.

Иммуногенные композиции могут быть использованы для доставки молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих один или более консенсусных Т-антигенов MCV. Предпочтительно, иммуногенные композиции представляют собой композиции, содержащие плазмиды.

Иммуногенная композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. Фармацевтически приемлемый наполнитель может быть функциональными молекулами в качестве носителей, адъювантов, проводников или разбавителей. Фармацевтически приемлемый наполнитель может являться облегчающим трансфекцию агентом, который может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и сквален, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы, или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию.

Агент, облегчающий трансфекцию, является полианионом, поликатионом, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид. Средство, облегчающее трансфекцию, является поли-L-глутаматом, и более предпочтительно, чтобы поли-L-глутамат присутствовал в иммуногенной композиции в концентрации менее 6 мг/мл. Агент, облегчающий трансфекцию, может также включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, и гиалуроновая кислота также может использоваться в сочетании с генетической конструкцией. В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммуногенные композиции могут также включать агент, облегчающий трансфекцию, такой как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники в виде смеси ДНК-липосом (см., например, W09324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или

наночастицы или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию. Предпочтительно, чтобы агент, облегчающий трансфекцию, представлял собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрация агента трансфекции в иммуногенной композиции является менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемый наполнитель может представлять собой один или более адъювантов. Адъювантом могут быть другие гены, экспрессируемые в той же или альтернативной плазмиде или доставляемые в виде белков в комбинации с указанной выше плазмидой в иммуногенной композиции. Один или более адъювантов могут являться белками и/или молекулами нуклеиновой кислоты, которые кодируют белки, выбранные из группы, состоящей из: CCL20, α -интерферона (ИФН- α), β -интерферона (ИФН- β), γ -интерферона, фактора роста тромбоцитов (PDGF), ФНО α , ФНО β , GM-CSF, эпидермального фактора роста (EGF), хемокина, привлекающего кожные Т-клетки (STACK), хемокина, экспрессирующего эпителиальный тимус (TECK), эпителиального хемокина, связанного со слизистыми оболочками (MEC), ИЛ-12, ИЛ-15, включая ИЛ-15 с сигнальной или кодирующей последовательностью, кодирующей удаленную сигнальную последовательность, и необязательно включая другой сигнальный пептид, такой как из IgE, или кодирующую последовательность, которая кодирует пептид дифференциального сигнала, такую как из IgE, ИЛ-28, MHC, CD80, CD86, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , ИЛ-8, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, мутантных форм ИЛ-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, ИЛ-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор ФНО, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспаза ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа на интерферон, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O χ 40, O χ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты или их комбинации.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, адъювант может представлять собой один или более белков и/или белок-кодирующих молекул нуклеиновой кислоты, выбранных из группы, состоящей из: CCL-20, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-28, STACK, TECK, MEC или RANTES. Примеры конструкций и последовательностей ИЛ-12 раскрыты в заявке на патент №. PCT/US1997/019502 и соответствующей заявке США с серийным номером 08/956865 и предварительной заявке США с серийным номером 61/569600, поданной 12 декабря 2011 г., ссылка на каждую из которых включена в настоящий документ. Примеры конструкций и последовательностей ИЛ-15 раскрыты в заявке на патент №. PCT/US04/18962 и соответствующей заявке США, серийный № 10/560650, и в заявке на

патент №. PCT/US07/00886 и соответствующей заявке США, серийный № 12/160766 и заявке на патент PCT/US10/048827, ссылки на каждую из которых включены в данный документ. Примеры конструкций и последовательностей ИЛ-28 раскрыты в заявке на патент № PCT/US09/039648 и соответствующей заявке США, серийный номер 12/936192, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры RANTES и других конструкций и последовательностей раскрыты в заявке на патент №. PCT/US1999/004332 и соответствующей серийной заявке на патент США № 09/622452, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки. Другие примеры конструкций и последовательностей RANTES раскрыты в заявке на патент №. PCT/US11/024098, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры RANTES и других конструкций и последовательностей раскрыты в заявке на патент №. PCT/US1999/004332 и соответствующей заявке США, серийный № 09/622452, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки. Другие примеры конструкций и последовательностей RANTES раскрыты в заявке на патент №. PCT/US11/024098, которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры хемокинов, конструкций и последовательностей STACK, TECK и MEC раскрыты в заявке на патент №. PCT/US 2005/042231 и соответствующей заявке США, серийный № 11/719 646, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки. Примеры OX40 и других иммуномодуляторов раскрыты в заявке США № 10/560653, которая включена сюда посредством ссылки. Примеры DR5 и других иммуномодуляторов раскрыты в заявке США, серийный № 09/622452, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Иммуногенная композиция может дополнительно включать агент, способствующий доставке генетической вакцины, описанный в заявке США серийный № 021 579, поданной 1 апреля 1994 г., которая полностью включена в данный документ в посредством ссылки.

Иммуногенная композиция может содержать консенсусные антигены и плазмиды в количестве от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или предпочтительно от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; или более предпочтительно от приблизительно 1 миллиграмма до приблизительно 2 миллиграммов. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат от приблизительно 5 нанограмм до приблизительно 1000 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 10 нанограмм до приблизительно 800 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограммов ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах воплощения изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1 до приблизительно 350 мкг ДНК. В некоторых

предпочтительных вариантах воплощения изобретения фармацевтические композиции содержат от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограммов, от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограммов, от приблизительно 1 нанограмма до 100 миллиграммов; от приблизительно 1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; от приблизительно 0,1 микрограмма до приблизительно 10 миллиграммов; от приблизительно 1 миллиграмма до приблизительно 2 миллиграммов, от приблизительно 5 нанограмм до приблизительно 1000 микрограмм, от приблизительно 10 нанограмм до приблизительно 800 микрограмм, от приблизительно 0,1 до приблизительно 500 микрограмм, от приблизительно 1 до приблизительно 350 микрограмм, от приблизительно 25 до приблизительно 250 микрограмм, от приблизительно 100 до приблизительно 200 микрограмм консенсусного антигена или его плазмиды.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, фармацевтические композиции, согласно настоящему изобретению, содержат по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 нанограмм молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в изобретении. В некоторых вариантах воплощения изобретения, фармацевтические композиции могут содержать по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760, 765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945, 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 или 1000 мкг молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в изобретении. В некоторых вариантах воплощения изобретения, фармацевтическая композиция может включать по меньшей мере 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мг или более молекул нуклеиновой кислоты, описанной в изобретении.

В других вариантах воплощения изобретения, фармацевтическая композиция может содержать вплоть до 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 нанограмм включительно молекул нуклеиновой кислоты, описанной в изобретении. В некоторых вариантах воплощения изобретения, фармацевтическая композиция может содержать вплоть до 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 605, 610, 615, 620, 625, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 660, 665, 670, 675, 680, 685, 690, 695, 700, 705, 710, 715, 720, 725, 730, 735, 740, 745, 750, 755, 760,

765, 770, 775, 780, 785, 790, 795, 800, 805, 810, 815, 820, 825, 830, 835, 840, 845, 850, 855, 860, 865, 870, 875, 880, 885, 890, 895, 900, 905, 910, 915, 920, 925, 930, 935, 940, 945 950, 955, 960, 965, 970, 975, 980, 985, 990, 995 или 1000 мкг включительно молекул нуклеиновой кислоты, описанной в изобретении. В некоторых вариантах воплощения изобретения фармацевтическая композиция может содержать вплоть до 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мг включительно молекул нуклеиновой кислоты, описанной в изобретении.

Иммуногенная композиция может быть составлена в соответствии с со способом применения. Фармацевтическая композиция для инъекционной иммуногенной композиции может быть стерильной, апиrogenной и не содержащей частиц. Может быть использован изотонический состав или раствор. Изотонические добавки могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. Иммуногенная композиция может содержать вазоконстрикторный агент. Изотонические растворы могут включать забуференный фосфатом физиологический раствор. Иммуногенная композиция может дополнительно содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизация такими компонентами как LGS или поликатионы, или полианионы в составе иммуногенной композиции может привести к достижению ею стабильности при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение продолжительных периодов времени.

Иммуногенная композиция может быть стабильной при комнатной температуре (25 ° C) в течение более 1 недели, в некоторых вариантах воплощения в течение более 2 недель, в некоторых вариантах воплощения в течение более 3 недель, в некоторых вариантах воплощения в течение более 4 недель, в некоторых вариантах воплощения в течение более 5 недель и в некоторых вариантах воплощения в течение более 6 недель. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вакцина стабильна в течение более одного месяца, более 2 месяцев, более 3 месяцев, более 4 месяцев, более 5 месяцев, более 6 месяцев, более 7 месяцев, более 8 месяцев, более 9 месяцев, более 10 месяцев, более 11 месяцев или более 12 месяцев. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вакцина стабильна в течение более 1 года, более 2 лет, более 3 лет или более 5 лет. В одном варианте воплощения изобретения, иммуногенная композиция стабильна при охлаждении (2-8°C). Соответственно, в одном варианте воплощения изобретения, иммуногенная композиция не требует соблюдения холодовой цепи. Иммуногенная композиция является стабильной, если она сохраняет свою биологическую активность в течение достаточного периода времени без потери свойств, необходимых для ее предполагаемого использования (например, для генерирования иммунного ответа у субъекта). Например, для иммуногенных композиций, которые должны храниться, отправляться и т. д., их стабильность может быть предпочтительной в течение месяцев или лет.

Иммунный ответ

Иммуногенная композиция может вызывать иммунный ответ у субъекта, которому вводят композицию. Индуцированный иммунный ответ может быть специфичным для Т-

антигена MCV. Индуцированный иммунный ответ может быть реактивным против Т-антигена MCV, связанного с оптимизированным консенсусно-кодируемым антигеном. В различных вариантах воплощения изобретения, родственные антигены включают антигены с аминокислотными последовательностями, имеющими по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% гомологии с аминокислотной последовательностью оптимизированного консенсусно-кодируемого антигена. В различных вариантах воплощения изобретения, родственные антигены включают антигены, кодируемые нуклеотидными последовательностями, имеющими по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% гомологии с оптимизированными консенсусными нуклеотидными последовательностями, раскрытыми в данном документе.

Иммуногенная композиция может вызывать гуморальный иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может быть специфичным против Т-антигена MCV. Индуцированный гуморальный иммунный ответ может быть реактивным против Т-антигена MCV, связанного с оптимизированным консенсусно-кодируемым антигеном. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, в, приблизительно от 1,5 до приблизительно в 16 раз, в приблизительно от 2 до в приблизительно 12 раз или в приблизительно от 3 до в приблизительно 10 раз. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 6,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 7,0 раза, по меньшей мере, приблизительно в 7,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 10,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 11,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 13,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 14,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 14,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 15,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 15,5 раза или, по меньшей мере приблизительно в 16,0 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный Т-

антиген MCV.

Гуморальный иммунный ответ, индуцированный иммуногенной композицией, может включать повышенный уровень антител IgG у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию. Эти антитела IgG могут быть специфичными к Т-антигену MCV, генетически связанному с оптимизированным консенсусным антигеном. Эти антитела IgG могут быть реактивными против антигена MCV Т, генетически связанного с оптимизированным консенсусным антигеном. Уровень IgG-антител субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличен от приблизительно в 1,5 раза до приблизительно в 16 раз, от приблизительно в 2 раза до приблизительно в 12 раз или от приблизительно в 3 раза до приблизительно в 10 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию. Уровень антител IgG субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличен по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 5,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 14,0 раз, по меньшей мере, приблизительно в 14,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 15,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 15,5 раз или, по меньшей мере приблизительно в 16,0 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный Т-антиген MCV.

Иммуногенная композиция может вызывать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию. Индуцированный клеточный иммунный ответ может быть специфичным для Т-антигена MCV, связанного с оптимизированным консенсусно-кодируемым антигеном. Индуцированный клеточный иммунный ответ может быть реактивным против Т-антигена MCV, связанного с оптимизированным консенсусно-кодируемым антигеном. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать выявление ответа CD8+Т-клеток. Вызванный ответ CD8+Т-клеток может быть реактивным против Т-антигена MCV, генетически связанного с оптимизированным консенсусным антигеном. Вызванный ответ CD8+Т-клеток может быть полифункциональным. Индуцированный клеточный иммунный ответ может

включать выявление ответа CD8+T-клеток, при котором CD8+T-клетки продуцируют интерферон-гамма (ИФН- γ), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), интерлейкин-2 (ИЛ-2) или комбинацию ИФН- γ и ФНО- α .

Индукцированный клеточный иммунный ответ может включать повышенный CD8+T-клеточный ответ у субъекта, которому вводили иммуногенную композицию, по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию. Ответ CD8+T-клеток субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличен приблизительно от в 2 раза до приблизительно в 30 раз, приблизительно от в 3 до приблизительно в 25 раз или от приблизительно в 4 раза до приблизительно в 20 раз по сравнению с субъектом, которому не вводят иммуногенную композицию. Ответ CD8+T-клеток субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличен по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 6,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 14,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 14,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 15 раз, по меньшей мере приблизительно в 16,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 17,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 18,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 19,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 20,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 21,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 22,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 23,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 24,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 25,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 26,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 27,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 28,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 29,0 раз или, по меньшей мере приблизительно в 30,0 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный MCV T-антиген.

Индукцированный клеточный иммунный ответ может включать повышенную частоту CD107a/ИФН γ /T-bet тройных положительных CD8 T-клеток, которые реактивны против MCV T-антигена. Частота CD107a/ИФН γ /T-bet тройных положительных CD8 T-клеток субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличена по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 11 раз, в 12 раз, в 13 раз, в 14 раз, в 15 раз, в 16 раз, в 17 раз, в 18 раз, в 19 раз или в 20 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную

композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный Т-антиген MCV.

Индукцированный клеточный иммунный ответ может включать повышенную частоту CD107a/ИФН γ дважды положительных CD8 Т-клеток, которые реактивны в отношении Т-антигена MCV. Частота двойных положительных CD107a/ИФН γ Т-клеток CD8 субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличена по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 11 раз, в 12 раз, в 13 раз или в 14 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный Т-антиген MCV.

Клеточный иммунный ответ, индуцированный иммуногенной композицией, может включать индукцию CD4+Т-клеточного ответа. Вызванный ответ CD4+Т-клеток может быть реактивным против Т-антигена MCV, генетически связанного с оптимизированным консенсусным антигеном. Вызванный ответ CD4+Т-клеток может быть полифункциональным. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать выявление ответа CD4+Т-клеток, при котором CD4+Т-клетки продуцируют ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-2 или комбинацию ИФН- γ и ФНО- α .

Индукцированный клеточный иммунный ответ может включать повышение частоты CD4+Т-клеток, продуцирующих ИФН- γ . Частота CD4+ИФН- γ +Т-клеток субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличена по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 11 раз, в 12 раз, в 13 раз, в 14 раз, в 15 раз, в 16 раз, в 17 раз, в 18 раз, в 19 раз, или в 20 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный Т-антиген MCV.

Индукцированный клеточный иммунный ответ может включать повышение частоты CD4+Т-клеток, продуцирующих ФНО- α . Частота CD4+ФНО- α +Т-клеток субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличена, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 11 раз, в 12 раз, в 13 раз, в 14 раз, в 15 раз, в 16 раз, в 17 раз, в 18 раз, в 19 раз, в 20 раз, в 21 раз или в 22 раза по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию, или субъектом, которому вводили неоптимизированный Т-антиген MCV.

Индукцированный клеточный иммунный ответ может включать повышение частоты CD4+Т-клеток, продуцирующих как ИФН- γ , так и ФНО- α . Частота CD4+ИФН- γ +ФНО- α +субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличена по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 2,5 раза, в 3,0 раза, в 3,5 раза, в 4,0 раза, в 4,5 раза, в 5,0 раз, в 5,5 раз, в 6,0 раз, в 6,5 раз, в 7,0 раз, в 7,5 раз, в 8,0 раз, в 8,5 раз, в 9,0 раз, в 9,5 раз, в 10,0 раз, в 10,5 раз, в 11,0 раз, в 11,5 раз, в 12,0 раз, в 12,5 раз, в 13,0 раз, в 13,5 раз, в 14,0 раз, в 14,5 раз, в 15,0 раз, в 15,5 раз, в 16,0 раз, в 16,5 раз, в 17,0 раз, в 17,5 раз, в 18,0 раз, в 18,5 раз, в 19,0 раз, в 19,5 раз, в 20,0 раз, в 21 раз, в 22 раза, в 23 раза, в 24 раза, в 25 раз, в 26 раз, в 27 раз, в 28 раз, в 29 раз, в 30 раз, в 31 раз, в 32 раза, в 33 раза, в 34 раза или в 35 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили иммуногенную композицию,

или субъектом, которому вводили неоптимизированный MCV T антиген.

Иммуногенная композиция может дополнительно индуцировать иммунный ответ при введении в различные ткани, такие как мышцы или кожа. Иммуногенная композиция может дополнительно вызывать иммунный ответ при введении посредством электропорации, или инъекции, или подкожно, или внутримышечно.

Вектор

Описанная выше нуклеотидная конструкция может быть помещена в один или более векторов. Один или более векторов могут содержать источник репликации. Один или более векторов могут представлять собой плазмиду, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Один или более векторов могут быть либо самовоспроизводящимся внехромосомным вектором, либо вектором, который интегрируется в геном хозяина.

Векторы включают плазмиды, векторы экспрессии, рекомбинантные вирусы, вектор рекомбинантной «голой ДНК» любой формы и тому подобное, но не ограничиваясь ими. «Вектор» включает нуклеиновую кислоту, которая может инфицировать, трансфицировать, временно или постоянно трансдуцировать клетку. Установлено, что вектор может представлять собой голую нуклеиновую кислоту или нуклеиновую кислоту в комплексе с белком или липидом. Вектор, необязательно, содержит вирусные или бактериальные нуклеиновые кислоты и/или белки и/или мембраны (например, клеточную мембрану, вирусную липидную оболочку и т.д.). Векторы включают репликоны (например, РНК-репликоны, бактериофаги), но не ограничиваясь ими, к которым фрагменты ДНК могут присоединяться и реплицироваться. Таким образом, векторы включают РНК, автономную самореплицирующуюся кольцевую или линейную ДНК или РНК (например, плазмиды, вирусы и тому подобное, например, см. патент США № 5217879), не ограничиваясь ими, и включают как экспрессирующие, так и неэкспрессирующие плазмиды. В тех случаях, когда рекомбинантный микроорганизм или клеточная культура описываются как акцепторы «вектора экспрессии», подразумевается как внехромосомная кольцевая, так и линейная ДНК и РНК, которая была включена в хромосому(ы) хозяина. Если вектор поддерживается клеткой-хозяином, вектор может либо стабильно реплицироваться клетками во время митоза в качестве автономной структуры, либо включаться в геном хозяина.

Один или более векторов могут быть экспрессирующей конструкцией, которая обычно является плазмидой, используемой для введения определенного гена в клетку-мишень. Как только вектор экспрессии оказывается внутри клетки, белок, кодируемый геном, продуцируется рибосомными комплексами клеточной транскрипции и трансляции. Плазмиду часто конструируют так, чтобы она содержала регуляторные последовательности, действующие как энхансерные и промоторные области, приводящие к эффективной транскрипции гена, переносимого вектором экспрессии. Согласно настоящему изобретению, векторы экспрессируют большие количества стабильной мессенджерной РНК и, следовательно, белков.

Векторы могут включать сигналы экспрессии, такие как сильный промотор, сильный кодон терминации, регулирование расстояния между промотором и клонированным геном и вставка последовательности терминации транскрипции и PTIS (портативная последовательность инициации трансляции).

(1) Вектор экспрессии

Один или более векторов могут являться кольцевой плазмидой или линейной нуклеиновой кислотой. Кольцевая плазида и линейная нуклеиновая кислота способны направлять экспрессию конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующей клетке субъекта. Один или более векторов, содержащих конструкт рекомбинантной нуклеиновой кислоты, могут быть химерными, что означает, что по меньшей мере один из их компонентов является гетерологичным по отношению по меньшей мере к одному из их других компонентов.

(2) Плазида

Один или более векторов могут быть плазмидами. Плазида может быть использована для трансфекции клеток рекомбинантным конструктом нуклеиновой кислоты. Плазида может быть использована для введения рекомбинантной конструкции нуклеиновой кислоты субъекту. Плазида также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии генов в клетке, в которую вводится плазида.

Плазида также может содержать источник репликации млекопитающих для поддержания существования плазмиды внехромосомно и получения множества копий плазмиды в клетке. Плазида может представлять собой pVAX1, pCER4 или pREP4 фирмы Invitrogen (Сан-Диего, Калифорния), которая может включать источник репликации вируса Эпштейна-Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, и может производить высококопийную эписомальную репликацию без интеграции. Основой плазмиды может быть pAV0242. Плазида может быть плазмидой аденовируса типа 5 (Ad5), дефектной по репликации.

Плазмидой может быть pSE420 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которая может быть использована для продуцирования белка в *Escherichia coli* (*E.coli*). Плазмидой также может быть pYES2 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которая может быть использована для продуцирования белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Плазмидой также может быть полная система экспрессии бакуловируса MAXBAC™ (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которая может быть использована для продуцирования белка в клетках насекомых. Плазмидами также могут быть pcDNA1 или pcDNA3 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), которые могут быть использованы для продуцирования белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

(3) РНК

В одном варианте воплощения изобретения, нуклеиновая кислота является молекулой РНК. В одном варианте воплощения изобретения, молекула РНК

транскрибируется с последовательности ДНК, описанной в данном документе. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула РНК кодируется последовательностью ДНК по меньшей мере на 90% гомологичной одной из SEQ ID №1, SEQ ID №3 или SEQ ID №5, или их варианту или их фрагменту. В другом варианте воплощения изобретения, нуклеотидная последовательность включает последовательность РНК, транскрибируемую последовательностью ДНК, кодирующей полипептидную последовательность по меньшей мере на 90% гомологичную одной из SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 или SEQ ID № 6 или их варианта или их фрагмента. Соответственно, в одном варианте воплощения, изобретение относится к молекуле РНК, кодирующей один или более Т-антигенов MCV. РНК может быть плюс-цепью. Соответственно, в некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула РНК может транслироваться клетками без необходимости введения каких-либо промежуточных стадий репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, используемая в изобретении, может быть 5'-кэпирована (например, 7-метилгуанозином). Кэпирование может усиливать трансляцию РНК *in vivo*. 5'-нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь 5'-трифосфатную группу. В кэпированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином через 5'-5'-мостик. Молекула РНК может иметь 3'-поли-А-хвост. Он также может включать последовательность распознавания поли-А-полимеразы (например, AAUAAA) приблизительно с ее 3'-конца. Молекула РНК, используемая в изобретении, может быть одноцепочечной. Молекула РНК, используемая в изобретении, может содержать синтетическую РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения, молекула РНК является молекулой голой РНК. В одном варианте воплощения изобретения, молекула РНК содержится в векторе.

В одном варианте воплощения изобретения, РНК имеет 5' и 3' UTR. В одном варианте воплощения изобретения, длина 5'-UTR находится в диапазоне от нуля до 3000 нуклеотидов. Длина 5'- и 3'-последовательностей UTR, добавляемых в область кодирования, может быть изменена различными способами, включая конструирование праймеров для ПЦР с отжигом в различных областях UTR, но не ограничиваясь ими. Используя этот подход, специалист в данной области техники может модифицировать 5' и 3' длины UTR, необходимые для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

5' и 3' UTR могут являться эндогенными природными 5' и 3' UTR гена, представляющего интерес. Альтернативно, последовательности UTR, не являющиеся эндогенными для представляющего интерес гена, могут быть добавлены путем включения последовательностей UTR в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, не являющихся эндогенными для интересующего гена, может быть полезным для модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что элементы, обогащенные AU на 3'-последовательностях UTR могут снижать стабильность РНК. Следовательно, 3'-UTR могут быть выбраны или разработаны для увеличения

стабильности транскрибированной РНК на основе свойств UTR, которые хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте воплощения изобретения, 5'-UTR может содержать последовательность Козак эндогенного гена. Альтернативно, в том случае, когда 5'-UTR, не являющийся эндогенным для интересующего гена, добавляется с помощью ПЦР так, как описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть изменена путем добавления 5'-последовательности UTR. Последовательности Козак могут повысить эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но, по-видимому, отсутствует необходимость обеспечения эффективной трансляции для всех РНК. Требование к последовательностям Козак для многих РНК известно в данной области техники. В других вариантах воплощения изобретения, 5'-UTR может быть получен из РНК-вируса, чей РНК-геном стабилен в клетках. В других вариантах воплощения изобретения, различные нуклеотидные аналоги могут быть использованы в 3' или 5' UTR для препятствия деградации экзонуклеазы РНК.

В одном варианте воплощения изобретения, РНК имеет как экзопирование на 5' конце, так и 3' поли (А) хвост, который определяет связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность РНК в клетке.

В одном варианте воплощения изобретения, РНК является нуклеозид-модифицированной РНК. Нуклеозид-модифицированная РНК обладает особыми преимуществами по сравнению с немодифицированной РНК, включая, например, повышенную стабильность, низкую или отсутствующую врожденную иммуногенность и улучшенную трансляцию.

(4) Кольцевой и линейный векторы

Один или более векторов могут являться кольцевой плазмидой, которая может трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономно реплицирующаяся плазида с источником репликации). Вектором может быть pVAX, pcDNA3.0 или pGroX или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Также в настоящем документе предложена линейная нуклеиновая кислота или кассета линейной экспрессии («LEC»), которая способна эффективно доставляться субъекту посредством электропорации и экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый рекомбинантной конструкцией нуклеиновой кислоты. LEC может являться любой линейной ДНК, лишенной какого-либо фосфатного остова. LEC может не содержать никаких генов устойчивости к антибиотикам и /или фосфатного остова. LEC может не содержать других нуклеотидных последовательностей, не имеющих отношения к желаемой экспрессии гена.

LEC может быть получена из любой плазмиды, способной к линейаризации. Плазида может быть способна экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или

полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Плазмидой может быть pNP (Пуэрто-Рико/34) или pM2 (Новая Каледония/99). Плазида может быть WL009, pVAX, pcDNA3.0 или pGroX или любым другим вектором экспрессии, способным экспрессировать полипептид тяжелой цепи и/или полипептид легкой цепи, кодируемый конструкцией рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

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

(5) Вирусные векторы

В одном варианте воплощения изобретения предложены вирусные векторы, способные доставлять нуклеиновую кислоту изобретения в клетку. Вектор экспрессии может быть предоставлен клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook et al. (2001) и в Ausubel et al. (1997) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, используемые в качестве векторов, включают ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы, но не ограничиваются ими. В общем, подходящий вектор содержит источник репликации, функционирующий по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, удобные сайты рестрикционной эндонуклеазы и один или более селективируемых маркеров (см., например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193). Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362.

(6) Способ подготовки векторов

В настоящем документе предложен способ получения одного или более векторов, в которые помещена рекомбинантная конструкция нуклеиновой кислоты. После заключительного этапа субклонирования, вектор может быть использован для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном ферментационном резервуаре с использованием способов, известных в данной области техники.

В других вариантах воплощения изобретения, вектор может использоваться с одним или более устройствами электропорации (ЭП) после заключительного этапа субклонирования. ЭП устройства описаны ниже более подробно.

Один или более векторов могут быть составлены или изготовлены с использованием комбинации известных устройств и технологий, но они предпочтительно изготавливаются с использованием технологии изготовления плазмиды, которая описана в лицензированной, находящейся на рассмотрении предварительной заявке США, серийный № 60/939792, поданной 23 мая 2007 г. В некоторых примерах, описанные здесь плазмидные ДНК могут быть приготовлены в концентрациях, превышающих или равных

10 мг/мл. Технологии изготовления также включают в себя различные устройства и протоколы, которые обычно известны специалистам в данной области техники, в дополнение к тем, которые описаны в заявке США серийный № 60/939792, включая те, которые описаны в лицензированном патенте США № 7238522, выданном 3 июля 2007 г. Вышеупомянутая заявка и патент, серийный № 60/939792 и патент США № 7238522, соответственно, полностью включены в настоящий документ.

Множественные векторы

Иммуногенная композиция может содержать множество копий одной молекулы нуклеиновой кислоты, такой как одна плазида, или множество копий двух или более разных молекул нуклеиновой кислоты, таких как две или более различных плазмид. Например, иммуногенная композиция может содержать множество из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти или более различных молекул нуклеиновой кислоты. Такие композиции могут содержать множество из двух, трех, четырех, пяти, шести или более различных плазмид.

Иммуногенные композиции могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность Т-антигена MCV. Иммуногенные композиции могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность нескольких антигенов. В одном варианте воплощения изобретения, антигены представляют собой Т-антиген MCV и один или более дополнительных раковых антигенов. Иммуногенные композиции могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность одного или более Т-антигенов MCV и одного или более антигенов рака.

Антигены рака

Иммуногенная композиция может содержать один или более раковых антигенов, таких как WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, идиотип, MAGE A3, p53 (не мутантный), NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras-мутант, gp100, p53 мутант, протеиназа 3 (PR1), Bcr-abl, тирозиназа, сурвивин, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG, NA17, PAX3, ALK, рецептор андрогена, циклин B1, полисиаловая кислота, MYCN, TRP-2, RhoC, GD3, фукозил GM1, мезотелин, PSCA, MAGE A1, sLe (a), CYP1B1, PLAC1, GM3 ганглиозид, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, угольная ангидраза IX, PAX5, OY-TES1, белок 17 сперматозоидов, LCK, HMWMAA, белки фиброзной оболочки спермы, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumain, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1 (протамин 2), MAD-CT-2 и FOS-связанный антиген 1 для лечения или профилактики патологии, связанной с опухолью. Иммуногенная композиция может дополнительно объединять один или более раковых антигенов WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, HER-2/neu, идиотип, MAGE A3, p53 (не мутантный), NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/MART1, Ras-мутант, gp100, p53 мутант, протеиназа 3 (PR1), Bcr-abl, тирозиназа, сурвивин, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG, NA17, PAX3, ALK, рецептор

андрогена, циклин B1, полисиаловая кислота, MYCN, TRP-2, RhoC, GD3, фукозил GM1, мезотелин, PSCA, MAGE A1, sLe (a) CYP1B1, PLAC1, GM3 ганглиозид, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, угольная ангидраза IX, PAX5, OY-TES1, белок 17 сперматозоидов, LCK, HMWMAA, белки фиброзной оболочки спермы, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumain, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1 (протамин 2), MAD-CT-2 и FOS-связанный антиген с оптимизированным консенсусно-кодируемым Т-антигеном MCV для лечения или профилактики опухолевой патологии. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики опухолевой патологии.

Способы

В настоящем документе предложены способы лечения, защиты и/или предотвращения заболевания, связанного с MCV, у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения одной или более описанных в данном документе иммуногенных композиций субъекту. Введение иммуногенной композиции субъекту может индуцировать или вызывать иммунный ответ у субъекта. Индуцированный иммунный ответ можно использовать для лечения, предотвращения и/или защиты от заболевания, например, инфекций MCV или MCC, ассоциированных с инфекцией MCV.

В настоящем документе описан способ доставки иммуногенной композиции для предоставления генетических конструкций и белков консенсусного антигена, содержащих эпитопы, делающие их особенно эффективными против MCV или MCC, против которых может быть индуцирован иммунный ответ. Способ доставки иммуногенной композиции или вакцины может быть предоставлен для индукции терапевтического и профилактического иммунного ответа. Процесс вакцинации может вызвать у млекопитающего иммунный ответ против MCV или MCC. Иммуногенная композиция может быть доставлена индивидууму для модуляции активности иммунной системы млекопитающего и усиления иммунного ответа. Доставка иммуногенной композиции может являться трансфекцией консенсусного антигена в виде молекулы нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется в клетке и доставляется на поверхность клетки, на которой иммунная система распознает и индуцирует клеточный, гуморальный или клеточный и гуморальный ответ. Доставка иммуногенной композиции может быть использована для индукции или выявления иммунного ответа у млекопитающих против MCV или MCC путем введения млекопитающим иммуногенной композиции способом, описанным выше.

При доставке иммуногенной композиции и плазмиды в клетки млекопитающего, трансфицированные клетки будут экспрессировать и секретировать консенсусные антигены для каждой из плазмид, инъектированных в иммуногенной композиции. Эти белки будут определены иммунной системой как чужеродные, и против них будут вырабатываться антитела. Эти антитела будут поддерживаться иммунной системой и позволят эффективно реагировать на последующие инфицирования MCV.

Иммуногенная композиция может быть введена млекопитающему для вызова

иммунного ответа. Млекопитающим может быть человек, примат, низший примат, корова, крупный рогатый скот, овца, коза, антилопа, бизон, буйвол, бизон, бык, олень, еж, слон, лама, альпака, мыши, крысы и курица.

Индукцированный иммунный ответ может включать индуцированный гуморальный иммунный ответ и/или индуцированный клеточный иммунный ответ. Гуморальный иммунный ответ может быть индуцирован приблизительно в от 1,5 до приблизительно в 16 раз, в от приблизительно 2 до приблизительно в 12 раз или в от приблизительно 3 до приблизительно в 10 раз. Индуцированный клеточный иммунный ответ может включать CD8+T-клеточный ответ, который индуцируется приблизительно в 2-30 раз, приблизительно в 3-25 раз или приблизительно в 4-20 раз.

Доза иммуногенной композиции может составлять от 1 мкг до 10 мг активного компонента/кг массы тела/во времени и может составлять от 20 мкг до 10 мг компонента/кг массы тела/во времени. Иммуногенную композицию можно вводить каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 день. Количество доз иммуногенной композиции для эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Иммуногенная композиция может быть составлена в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными специалистам в области фармацевтики. Такие композиции можно вводить в дозировках и по методикам, хорошо известным специалистам в области медицины, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, вес и состояние конкретного субъекта, и способ введения.

Иммуногенную композицию можно вводить профилактически или терапевтически. При профилактическом введении, иммуногенные композиции можно вводить в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа. При терапевтическом применении, иммуногенные композиции вводят нуждающемуся в этом субъекту в количестве, достаточном для достижения терапевтического эффекта. Количество, достаточное для достижения терапевтического эффекта, определяется как «терапевтически эффективная доза». Количества, эффективные для данного применения, будут зависеть, например, от конкретной композиции схемы введения иммуногенной композиции, способа введения, стадии и тяжести заболевания, общего состояния здоровья субъекта и мнения назначающего врача.

Иммуногенную композицию можно вводить способами, хорошо известными в данной области техники, как это описано у Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648 (1997)); Felgner et al. (патент США № 5,580,859, выданный 3 декабря 1996 г.); Felgner (патент США № 5,703,055, выданный 30 декабря 1997 г.); и Carson et al. (патент США № 5,679,647, выданный 21 октября 1997 г.), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. ДНК иммуногенной композиции может образовывать комплексы с частицами или шариками, которые можно вводить индивидууму, например, с помощью пистолета для вакцины. Специалист в данной области техники должен знать, что выбор фармацевтически приемлемого носителя,

включая физиологически приемлемое соединение, зависит, например, от пути введения вектора экспрессии.

Иммуногенная композиция может быть доставлена различными путями. Типичные пути доставки включают парентеральное введение, например, внутрикожное, внутримышечное или подкожное введение. Другие пути включают пероральное, интраназальное и интравагинальное введение. Что касается, в частности, ДНК иммуногенной композиции, иммуногенная композиция может быть доставлена в интерстициальные пространства тканей индивидуума (Felgner et al., патенты США № 5,580,859 и 5,703,055, ссылка на содержание которых включена в настоящий документ во всей полноте). Иммуногенная композиция также может быть введена в мышцу, или может быть введена посредством внутрикожных или подкожных инъекций, или трансдермально, например, посредством ионтофореза. Также может быть использовано эпидермальное введение иммуногенной композиции. Эпидермальное введение может включать механическое или химическое раздражение наружного слоя эпидермиса для стимуляции иммунного ответа на раздражитель (Carson et al., Патент США № 5,679,647, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте).

Иммуногенная композиция также может быть составлена для введения через носовые проходы. Композиции, подходящие для назального введения, в которых носитель представляет собой твердое вещество, могут включать грубый порошок, имеющий размер частиц, например, в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 500 микрон, вводимый таким же способом, каким употребляют нюхательный табак, т.е. путем быстрого вдыхания из контейнера с порошком, удерживаемого близко к носу, через носовой проход. Композиция может представлять собой назальный спрей, капли в нос или аэрозольное введение распылителем. Композиция может включать водные или масляные растворы иммуногенной композиции.

Иммуногенная композиция может представлять собой жидкий препарат, такой как суспензия, сироп или эликсир. Иммуногенная композиция также может быть препаратом для парентерального, подкожного, внутрикожного, внутримышечного или внутривенного введения (например, инъекционного введения), таким как стерильная суспензия или эмульсия.

Иммуногенная композиция может быть включена в липосомы, микросферы или другие полимерные матрицы (Felgner et al., патент США № 5,703,055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. Ito III (2nd ed. 1993), ссылка на содержание которых включена в настоящий документ во всей полноте). Липосомы могут состоять из фосфолипидов или других липидов и могут быть нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в изготовлении и применении.

Способ лечения рака с помощью вакцины

Вакцина может быть использована для генерирования или индукции иммунного ответа у млекопитающего, реактивного или направленного против рака или опухоли

(например, МСС) млекопитающего или субъекта, нуждающегося в этом. Вызванный иммунный ответ может предотвратить рак или рост опухоли.

Вызванный иммунный ответ может предотвращать и/или уменьшать метастазирование раковых или опухолевых клеток. Соответственно, вакцина может быть использована как способ лечения и/или предотвращения рака или опухоли у млекопитающего или субъекта, которому вводят вакцину.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может опосредовать клиренс или предотвращать рост опухолевых клеток путем индуцирования (1) гуморального иммунитета посредством В-клеточных ответов, генерируя антитела, блокирующие выработку моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), тем самым задерживая клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя рост опухоли; (2) увеличивая цитотоксические Т-лимфоциты, такие как CD8 + (CTL), для атаки и уничтожения опухолевых клеток; (3) увеличивая ответы Т-хелперов; (4) и усиливая воспалительные реакции через ИФН- γ и ФНО- α , или, предпочтительнее с учетом всего вышеупомянутого.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммунный ответ может генерировать гуморальный иммунный ответ и/или антигенспецифические цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), которые не вызывают повреждения или воспаления различных тканей или систем (например, мозга или неврологической системы и т. д.) у субъекта, которому вводят вакцину.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может увеличить выживаемость без опухоли, уменьшить массу опухоли, увеличить выживаемость с опухолью или их комбинацию у субъекта. Вводимая вакцина может увеличить выживаемость иммунизированного субъекта без опухолей на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 и 60% или более процентов. Вводимая вакцина может уменьшить массу опухоли у субъекта после иммунизации на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70% или более процентов. Вводимая вакцина может предотвращать и блокировать у субъекта повышение уровня белка 1 хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1), цитокина, секретируемого клетками-супрессорами миелоидного происхождения. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может предотвращать и блокировать увеличение MCP-1 в раковой или опухолевой ткани у субъекта, тем самым уменьшая васкуляризацию раковой или опухолевой ткани у субъекта.

Вводимая вакцина может увеличить выживаемость субъекта с опухолью на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70% или более процентов. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вакцину можно вводить периферически (как более подробно описано ниже) для установления

антигенспецифического иммунного ответа, направленного на раковые или опухолевые клетки или ткани, чтобы вычистить или устранить рак или опухоль, экспрессирующую одну или более MCV Т-антигенов, не вредя и не вызывая заболевание или смерть у субъекта, которому вводят вакцину.

Вводимая вакцина может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта приблизительно от в 50 раз до приблизительно в 6000 раз, приблизительно от в 50 раз до приблизительно в 5500 раз, приблизительно от в 50 раз до приблизительно в 5000 раз, приблизительно от в 50 раз до приблизительно в 4500 раз, приблизительно от в 100 раз до приблизительно в 6000 раз, приблизительно от в 150 раз до приблизительно в 6000 раз, приблизительно от в 200 раз до приблизительно в 6000 раз, приблизительно от в 250 раз до приблизительно в 6000 раз или от приблизительно в 300 раз до приблизительно в 6000 раз. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта приблизительно в 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, 2400 раз, 2500 раз, 2600 раз, 2700 раз, 2800 раз, 2900 раз, 3000 раз, 3100 раз, 3200 раз, 3300 раз, 3400 раз, 3500 раз, 3600 раз, 3700 раз, 3800 раз, 3900 раз, 4000 раз, 4100 раз, 4200 раз, 4300 раз, 4400 раз, 4500 раз, 4600 раз, 4700 раз, 4800 раз, 4900 раз, 5000 раз, 5100 раз, 5200 раз, 5300 раз, 5400 раз, 5500 раз, 5600 раз, 5700 раз, 5800 раз, 5900 раз или 6000 раз.

Вводимая вакцина может повышать уровни интерферона гамма (ИФН- γ) у субъекта приблизительно в 50-6000 раз, приблизительно в 50-5500 раз, приблизительно в 50-5000 раз, приблизительно в 50-4500 раз, приблизительно в 100-6000 раз, приблизительно в 150-6000 раз, приблизительно в 200-6000 раз, приблизительно в 250-6000 раз или приблизительно в 300-6000 раз. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может повышать уровни ИФН- γ у субъекта приблизительно в 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, 2400 раз, 2500 раз, 2600 раз, 2700 раз, 2800 раз, 2900 раз, 3000 раз, 3100 раз, 3200 раз, 3300 раз, 3400 раз, 3500 раз, 3600 раз, 3700 раз, 3800 раз, 3900 раз, 4000 раз, 4100 раз, 4200 раз, 4300 раз, 4400 раз, 4500 раз, 4600 раз, 4700 раз, 4800 раз, 4900 раз, 5000 раз, 5100 раз, 5200 раз, 5300 раз, 5400 раз, 5500 раз, 5600 раз, 5700 раз, 5800 раз, 5900 раз или 6000 раз.

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

эффективного лечения может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Комбинированная терапия с ингибиторами контрольных точек

Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунного ответа у млекопитающего с использованием вакцины, как описано выше, в сочетании с одним или более ингибиторов контрольной точки. В одном варианте воплощения изобретения, вакцина, описанная выше, может содержать Т-антиген MCV и антитело к контрольному белку. В контексте данного документа, термин «ингибитор контрольной точки» включает ингибиторы или молекулы, блокирующие иммунные контрольные точки, обычно известные в области иммунотерапии рака. Чаще всего ингибиторы контрольных точек представляют собой антитела, которые блокируют иммунные контрольные точки белков. Белки иммунной контрольной точки включают PD1, PDL1, PDL2, CTLA-4, LAG3, TIM3, B7-H3, BTLA, VISTA, CD40, CEACAM1, CD80, CD86, OX40, CD27, GITR, DNAM-1, TIGIT, TMIGD2 и DC-SIGN, но не ограничиваются ими. Некоторые примеры известных ингибиторов контрольной точки включают ипилимумаб, пембролизумаб, ниволумаб, пидилизумаб, авелумаб и другие, не ограничиваясь перечисленными.

Комбинация может состоять в одной композиции или может быть отдельной и вводиться последовательно (либо сначала Т-антиген MCV, а затем ингибитор контрольной точки, либо сначала ингибитор контрольной точки, а затем Т антиген MCV). В некоторых вариантах воплощения изобретения, Т-антиген MCV можно вводить субъекту приблизительно через 30 секунд, 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 60 минут, 0,25 часа, 0,5 часа, 0,75 часа, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 84 часа, 96 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель до введения ингибитора контрольной точки субъекту. В других вариантах воплощения изобретения, ингибитор контрольной точки можно вводить субъекту приблизительно через 30 секунд, 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 20 минут, 25 минут, 30 минут, 35 минут, 40 минут, 45 минут, 50 минут, 55 минут, 60 минут, 0,25 часа, 0,5 часа, 0,75 часа, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов, 18 часов, 19 часов, 20 часов, 21 час, 22 часа, 23 часа, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, 72 часа, 84 часа, 96 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель до введения Т-антигена MCV субъекту.

Комбинация Т-антигена MCV и ингибитора контрольной точки индуцирует иммунную систему более эффективно, чем вакцина, содержащая только Т-антиген MCV. Такой более эффективный иммунный ответ обеспечивает повышенную эффективность лечения и/или профилактики конкретного типа рака.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммунный ответ может быть увеличен приблизительно в 0,5-15 раз, приблизительно в 0,5-10 раз или приблизительно в 0,5-8 раз. Альтернативно, иммунный ответ субъекта, которому вводят вакцину, может быть увеличен по меньшей мере приблизительно в 0,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 1,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,0 раза, по меньшей мере приблизительно в 4,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 5,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 5,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 6,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 7,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 8,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 9,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 10,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 11,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 12,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 13,5 раз, по меньшей мере приблизительно в 14,0 раз, по меньшей мере приблизительно в 14,5 раз или, по меньшей мере приблизительно в 15,0 раз.

В других альтернативных вариантах воплощения изобретения, иммунный ответ субъекта, которому вводят вакцину, может быть увеличен от приблизительно 50% до приблизительно 1500%, от приблизительно 50% до приблизительно 1000% или от приблизительно 50% до приблизительно 800%. В других вариантах воплощения, иммунный ответ субъекта, которому вводят вакцину, может быть увеличен, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 100%, по меньшей мере приблизительно на 150%, по меньшей мере приблизительно на 200%, по меньшей мере приблизительно на 250%, по меньшей мере примерно на 300%, по меньшей мере приблизительно на 350%, по меньшей мере приблизительно на 400%, по меньшей мере приблизительно на 450%, по меньшей мере приблизительно на 500%, по меньшей мере приблизительно на 550%, по меньшей мере приблизительно на 600%, по меньшей мере приблизительно на 650%, по меньшей мере приблизительно на 700%, по меньшей мере приблизительно на 750%, по меньшей мере приблизительно на 800%, по меньшей мере приблизительно на 850%, по меньшей мере приблизительно на 900%, по меньшей мере приблизительно на 950%, по меньшей мере приблизительно на 1000%, по меньшей мере приблизительно на 1050%, по меньшей мере приблизительно на 1100%, по меньшей мере приблизительно на 1150%, по меньшей мере приблизительно на 1200%, по меньшей мере

мере приблизительно на 1250%, по меньшей мер, приблизительно на 1300%, по меньшей мере приблизительно на 1350%, по меньшей мере приблизительно на 1450% или, по меньшей мере приблизительно на 1500%.

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

Карцинома клеток Меркеля

Вакцина может быть использована для генерирования или индукции иммунного ответа у млекопитающего, реактивного или направленного против клеточной карциномы Меркеля (МСС) у млекопитающего или нуждающегося в этом субъекта. Вызванный иммунный ответ может предотвращать рост МСС. Вызванный иммунный ответ может уменьшать рост МСС. Вызванный иммунный ответ может предотвращать и/или уменьшать метастазирование раковых или опухолевых клеток МСС. Соответственно, вакцина может быть использована способом, лечащим и/или предотвращающим МСС у млекопитающего или субъекта, которому вводят вакцину.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может опосредовать клиренс или предотвращать рост МСС путем индуцирования (1) гуморального иммунитета посредством В-клеточных ответов для генерирования антител, нацеленных на Т-антиген MCV, экспрессируемый клетками МСС; (2) увеличения цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8 + (CTL), для атаки и уничтожения клеток МСС; (3) увеличения ответов Т-хелперов; и (4) усиления воспалительных реакций через ИФН- γ и ФНО- α , или путем всех вышеупомянутых пунктов.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может увеличивать выживаемость без МСС у субъекта, уменьшать массу МСС, увеличивать выживаемость с МСС или их комбинацию. Вводимая вакцина может увеличить выживаемость субъекта без МСС на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 и 45% или более. Вводимая вакцина может уменьшить массу МСС у субъекта после иммунизации на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 56, 57, 58, 59 и 60% или более. Вводимая вакцина может предотвращать и блокировать повышение уровня белка 1 хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1), цитокина, секретируемого клетками-супрессорами миелоидного происхождения у субъекта. В некоторых вариантах воплощения изобретения, вводимая вакцина может предотвращать и блокировать увеличение MCP-1 в ткани МСС у субъекта, тем самым уменьшая васкуляризацию ткани МСС у субъекта. Вводимая вакцина может увеличить выживаемость с МСС субъекта на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 и 60% или более.

Комбинированное лечение

Иммуногенную композицию можно вводить в сочетании с другими белками и/или

генами, кодирующими CCL20, α -интерферон, γ -интерферон, фактор роста, полученный из тромбоцитов (PDGF), ФНО α , ФНО β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), кожный хемоаттрактант Т-клеток (STACK), хемокин, экспрессируемый эпителиальным тимусом (TECK), эпителиальный хемокин, ассоциированный со слизистыми оболочками (MEC), ИЛ-12, ИЛ-15, включая ИЛ-15, с удаленной сигнальной последовательностью и необязательно включающий другой сигнальный пептид, такой как IgE, MHC, CD80, CD86, ИЛ-28, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , ИЛ-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, мутантные формы ИЛ-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, ИЛ-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор ФНО, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, неактивный NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гены ответа на интерферон, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAIL_{rec}, TRAIL_{rec}DRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O χ 40, O χ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты или их комбинации. В некоторых вариантах воплощения изобретения, иммуногенную композицию вводят в комбинации с одной или более из следующих молекул нуклеиновой кислоты и/или белков: молекулы нуклеиновой кислоты, выбранные из группы, состоящей из молекул нуклеиновой кислоты, содержащих кодирующую последовательность, которая кодирует один или более из CCL20, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-28, STACK, TECK, MEC и RANTES или их функциональные фрагменты, и белки, выбранные из группы, состоящей из: CCL02, белка ИЛ-12, белка ИЛ-15, белка ИЛ-28, белка STACK, белка TECK, белка MEC или белка RANTES или их функциональных фрагментов.

Иммуногенную композицию можно вводить различными путями, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, ингаляционный, буккальное введение, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно, интраназально, интратекально и внутрисуставно, или использовать их комбинации. Для ветеринарного применения, композицию можно вводить в виде композиции, приемлемой в соответствии с обычными ветеринарными практиками. Ветеринар может легко определить режим дозирования и способ введения, который наиболее подходит для конкретного животного. Иммуногенную композицию можно вводить с помощью традиционных шприцев, безыгольных инъекционных устройств, «пушек с бомбардировкой микрочастиц» или других физических способов, таких как электропорация («ЭП»), гидродинамический метод или ультразвук.

Плазида иммуногенной композиции может быть доставлена млекопитающему несколькими известными технологиями, включая инъекцию ДНК (также называемую ДНК-вакцинацией) с электропорацией и без нее *in vivo*, липосомальное введение, с

помощью наночастиц, рекомбинантные векторы, такие как рекомбинантный аденовирус, рекомбинантный вирус, ассоциированный с аденовирусом, и рекомбинантный вирус натуральной оспы. Консенсусный антиген может быть доставлен посредством инъекции ДНК и вместе с электропорацией *in vivo*.

Электропорация

Введение иммуногенной композиции посредством электропорации может быть выполнено с использованием устройств электропорации, сконфигурированных для доставки импульса энергии в желаемую ткань млекопитающего, эффективного для образования обратимых пор в клеточных мембранах, где, предпочтительно, импульс энергии является постоянным током, соответствующим входящему току, заданному пользователем. Устройство электропорации может содержать компонент электропорации и электродный узел или узел ручного управления. Компонент электропорации может включать в себя и состоять из одного или более различных элементов устройств электропорации, в том числе: контроллера, генератора сигналов тока, тестера импеданса, регистратора сигналов, элемента ввода, элемента сообщения о состоянии, порта связи, компонента памяти, источника питания и выключателя. Электропорацию можно проводить с использованием устройства электропорации *in vivo*, например, системы CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Плимут-митинг, Пенсильвания) или электропоратора Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Плимут-митинг, Пенсильвания) для облегчения трансфекции клеток плазмидой.

Компонент электропоратора может функционировать как один элемент устройства электропорации, а другие элементы являются отделенными элементами (или компонентами), связанными с компонентом электропоратора. Компонент электропоратора может функционировать как более чем один элемент устройств электропорации, которые могут быть связаны с другими элементами устройств электропорации, отделенными от компонента электропоратора. Элементы устройств электропорации, существующие как части одного электромеханического или механического устройства, не могут быть ограничены, поскольку элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы, связанные друг с другом. Компонент электропоратора может быть способен доставлять импульс энергии, производящий постоянный ток, в желаемой ткани, и включает механизм обратной связи. Узел электродов может включать в себя решетку электродов, имеющую множество электродов в пространственном расположении, причем узел электродов принимает импульс энергии от компонента электропоратора и доставляет его в желаемую ткань через электроды. По меньшей мере один из множества электродов является нейтральным во время подачи импульса энергии и измеряет импеданс в желаемой ткани и передает импеданс компоненту электропоратора. Механизм обратной связи может принимать измеренный импеданс и, в его соответствии, может регулировать импульс энергии, подаваемый компонентом электропоратора, для поддержания заданной силы постоянного тока.

Множество электродов может доставлять импульс энергии децентрализованным

образом. Множество электродов может доставлять импульс энергии децентрализованным образом посредством управления электродами в запрограммированной последовательности, а запрограммированная последовательность вводится пользователем в компонент электропоратора. Запрограммированная последовательность может содержать множество импульсов, доставляемых последовательно, причем каждый импульс из множества импульсов доставляется по меньшей мере двумя активными электродами с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс, и в котором последующий импульс из множества импульсов доставляется посредством другого по меньшей мере из двух активных электродов с одним нейтральным электродом, который измеряет импеданс.

Механизм обратной связи может быть реализован как аппаратным, так и программным обеспечением. Механизм обратной связи может быть реализован по аналоговой замкнутой схеме. Считывание значений по обратной связи происходит каждые 50 мкс, 20 мкс, 10 мкс или 1 мкс, но предпочтительнее, обратная связь должна работать в реальном времени или быть мгновенной (то есть, мгновенной по существу, определяемой доступными методами фиксации времени отклика). Нейтральный электрод может измерять импеданс в желаемой ткани и сообщать импеданс механизму обратной связи, при этом, механизм обратной связи реагирует на значение импеданса и регулирует импульс энергии для поддержания постоянного тока на значении, соответствующем заданному току. Механизм обратной связи может поддерживать постоянный ток непрерывно и мгновенно во время доставки импульса энергии.

Примеры устройств электропорации и способов электропорации, которые могут облегчать введение иммуногенных композиций согласно настоящему изобретению, включают описанные в патенте США № 7,245,963, Draghia-Akli и др., патентной публикации США 2005/0052630, поданной Smith и др., ссылки на содержание которых в полном объеме включены в настоящее описание. Другие устройства электропорации и способы электропорации, которые можно использовать для облегчения введения иммуногенных композиций, включают в себя устройства, представленные в одновременно находящейся на рассмотрении и заявке того же заявителя на патент США, серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 г., которая заявляет о преимуществе в соответствии с 35 USC 119 (e) для предварительных заявок США Сер. 60/852149, поданной 17 октября 2006 года, и 60/978982, поданной 10 октября 2007 года, включенных в настоящий документ в полном объеме.

Патент США № 7,245,963, авторства Draghia-Akli и соавт. описывает модульные электродные системы и их использование для облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Модульные электродные системы могут содержать множество игольчатых электродов; иглу для подкожных инъекций; электрический разъем, который обеспечивает проводящую связь от программируемого импульсного контроллера постоянного тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может охватить множество игольчатых электродов,

установленных на опорной конструкции, и плотно вставить их в выбранную ткань тела или растения. Затем биомолекулы вводят через подкожную иглу в выбранную ткань. Активируется программируемый контроллер импульсов постоянного тока, и электрический импульс постоянного тока подается на множество игольчатых электродов. Прилагаемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение биомолекулы в ячейку между совокупностью электродов. Ссылки на все содержание патента США № 7,245,963 полностью включены в настоящее описание изобретения.

Патентная публикация США 2005/0052630, представленная Smith и соавт. описывает устройство электропорации, которое можно использовать для эффективного облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Устройство электропорации содержит электрокинетическое устройство («устройство ЕKD»), работа которого задается внешним программным обеспечением или встроенным программным обеспечением. Устройство ЕKD генерирует серию программируемых шаблонных импульсов постоянного тока между массивом электродов на основании пользовательского управления и введенных параметров импульсов, и позволяет хранить и получать данные о форме колебаний сигнала тока. Устройство электропорации также содержит сменный электродный диск, имеющий ряд игольчатых электродов, центральный канал для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Ссылки на все содержание патента США 2005/0052630 полностью включены в настоящее описание изобретения.

Электродный массив и способы, описанные в патентах США №7,245,963 и 2005/0052630 можно адаптировать для глубокого проникновения не только в такие ткани, как мышцы, но и в другие ткани или органы. Из-за конфигурации электродного массива, инъекционная игла (для доставки желаемой биомолекулы) также полностью вставляется в целевой орган, а инъекция вводится перпендикулярно целевой ткани в области, которая предварительно очерчена электродами. Electrodes, которые описаны в патенте США № 7,245,963 и в патенте США 2005/005263, предпочтительно, имеют длину 20 мм и калибр 21.

Кроме того, в некоторых вариантах воплощения изобретения, которые включают устройства электропорации и их использование, присутствуют устройства электропорации, которые описаны в следующих патентах: патент США 5,273,525, выданный 28 декабря 1993 г., патенты США 6,110,161, выданный 29 августа 2000 г., 6 261 281, выданный 17 июля 2001 г. и 6,958,060, выданный 25 октября 2005 г., и патент США 6,939,862, выданный 6 сентября 2005 г. Кроме того, в настоящем документе рассматриваются патенты, охватывающие предмет, предоставленный в патенте США 6,697,669, выданном 24 февраля 2004 г., который касается введения ДНК с использованием любого из множества устройств и патент США 7,328,064, выданный 5 февраля 2008 г., на способ инъекции ДНК. Ссылки на вышеуказанные патенты включены в данное описание во всей их полноте.

Поколение антигенов *in vitro* и *ex vivo*

В одном варианте воплощения изобретения, оптимизированный консенсусный Т-

антиген MCV генерируется *in vitro* или *ex vivo*. Например, в одном варианте воплощения изобретения, нуклеиновая кислота, кодирующая оптимизированный консенсусный Т-антиген MCV, может быть введена и экспрессирована в клетке *in vitro* или *ex vivo*.

В данной области техники известны способы введения и экспрессии генов в клетке. В контексте вектора экспрессии, вектор может быть легко введен в клетку-хозяина, например в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяина физическим, химическим или биологическим способом.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфата кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и тому подобные. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook et al. (2012, Молекулярное клонирование: лабораторное руководство, Лаборатория Колд-Спринг-Харбор, Нью-Йорк). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция.

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например в клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, патенты США №№ 5,350,674 и 5,585,362.

Химические средства введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, шарики и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-вода, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, везикула с искусственной мембраной).

В случае, когда используется невирусная система доставки, типовым средством доставки является липосома. Предполагается использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте, нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водной внутренней части липосомы, вкраплена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, образовывать комплекс с липосомой, диспергировать в растворе, содержащем липид, смешиваться с липидом, объединяться с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплекс с мицеллой, или иным образом связываться с липидом. Композиции, связанные с липидом, комплексом липид/ДНК или липид/экспрессирующий вектор, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в

растворе. Например, они могут присутствовать в виде двухслойной структуры, в виде мицелл, или в виде «сжатой» структуры. Они также могут просто вкрапляться в раствор, возможно, образуя агрегаты, не являющиеся однородными по размеру или форме. Липиды являются жирными веществами, которые либо могут встречаться в природе, либо являются синтетическими. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминокислоты и альдегиды.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующем примере. Следует понимать, что, хотя эти примеры и указывают предпочтительные варианты воплощения изобретения, они приведены только в качестве иллюстрации. Специалист в данной области техники может определить основные характеристики этого изобретения используя приведенные выше обсуждения и данные примеры и, не отступая от сущности и объема изобретения, он может вносить различные изменения и модификации изобретения для его адаптации к различным применениям и условиям. Таким образом, различные модификации изобретения в дополнение показанным и описанным здесь, будут очевидны для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Такие модификации также попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Вакцина на основе нуклеиновой кислоты, нацеленная против полиомавируса клеток Меркеля

Была разработана вакцина из нуклеиновых кислот, нацеленная против Т-антигенов полиомавируса клеток Меркеля (MCV) (фиг. 1 и фиг. 2). Оптимизированные синтетические консенсусные последовательности Т-антигена MCV, представляющие большой Т-антиген (LTA_g) и малый t-антиген (STA_g), отдельно клонировали в экспрессионно-плазмидную ДНК млекопитающего (фиг. 3) и доставляли мышам посредством внутримышечной электропорации (фиг. 4А). После иммунизации, конструкторы ДНК-вакцины генерировали устойчивые ответы антител и Т-клеток против пептидов Т-антигена MCV (фиг. 4В - фиг. 15).

Фигура 4В, Фигура 7, Фигура 12 и Фигура 14 демонстрируют, что вакцина LTA_g является высокоиммуногенной у беспородных мышей линий C57Bl/6 и CD-1. Фигуры с 8 по 10 демонстрируют, что вакцинация LTA_g приводит к устойчивому образованию полифункциональных CD4 и CD8 Т-клеток и цитотоксических CD8 Т-клеток.

Фигура 4В и фигура 15 демонстрируют, что вакцина STA_g является иммуногенной у мышей линий C57Bl/6 и CD-1. На фигуре 15 показано, что и CD4, и CD8 ответы были обнаружены для ИФН γ /ФНО α у мышей линии CD-1.

Фигура 11 демонстрирует, что обе вакцины вызывают гуморальный ответ у мышей C57Bl/6.

Пример 2: Последовательности

SEQ ID №1: Нуклеотидная последовательность, кодирующая модифицированный

синтетический консенсусный LTA_g MCV

ATGGACCTGGTGCTGAACAGGAAGGAGAGAGAGGCCCTGTGCAAGCTGCTG
GAGATCGCCCCCAACTGTTACGGCAATATCCCTCTGATGAAGGCCGCCTTCAAGCGG
AGCTGCCTGAAGCACCAACCAACAAGGGCGGCAACCCTGTGATCATGATGGAGCT
GAATACCCTGTGGTCCAAGTTTCAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGTCCGATTTCTC
TATGTTTGACGAGGTGGATGAGGCCCTATCTACGGCACCAAGTTCAAGGAGT
GGTGGCGCTCCGGCGGCTTCTCTTTTGGCAAGGCCTACGAGTACGGCCCTAACCCAC
ACGGCACCAATAGCAGGTCCAGAAAGCCAAGCTCCAACGCCAGCAGGGGAGCACCC
ATCCGGATCTAGCCCACCTCACAGCCAGTCCTCTAGCTCCGGCTACGGCTCTTTTAG
CGCCTCCCAGGCCTCTGACAGCCAGTCCAGAGGCCCGATATCCCACCCGAGCACCC
ACGAGGAGCCTACCTCTAGCTCCGGCTCTAGCTCCCGGGAGGAGACAACCAACAGC
GGCAGGGAGTCTAGCACCCCAAACGGCACCTCCGTGCCAAGGAATTCCTCTAGGAC
CGACGGAACCGCCGAGGACCTGTTCTGCGATAAGTCCCTGAGCTCCCCTGAGCCTCC
ATCTAGCTCCGAGGAGCCAGAGGAGCCCCCTTCTAGCAGGTCCTCTCCCAGACAGCC
ACCAAGCTCCTCTGCCGAGGAGGCAAGCTCCTCTCAGTTCACCGACGAGGAGTACA
GGAGCTCCTCTTTTACCACCCCTAAGACCCCTCCACCCTTCTCCCGGAAGCGCAAGT
TTGGAGGCTCTAGGAGCTCCGCCTCTAGCGCCTCCTCTGCCAGCTTCACCTCCACCC
CTCCAAAGCCCAAGAAGAACAGAGAGACACCCGTGCCTACCGACTTTCCTATCGAC
CTGAGCGATTACCTGTCCCACGCCGTGTACTCTAATAAGACCGTGAGCTGTTTCGCC
ATCTACACCACCAGCGACAAGGCCATCGAGCTGTACGATAAGATCGAGAAGTTCAA
GGTGGACTTCAAGTCCAGGCACGCATGCGAGCTGGGATGTATCCTGCTGTTTCATCAC
CCTGTCCAAGCACCGCGTGTCTGCCATCAAGAACTTCTGCAGCACCTTTTGTACCAT
CTCCTTTCTGATCTGCAAGGGCGTGAATAAGATGCCTGAGATGTACAACAACCTGTG
CAAGCCCCCTTACAAGCTGCTGCAGGAGAACAAGCCACTGCTGAATTACGAGTTCC
AGGAGAAGGAGAAGGAGGCCAGCTGCAACTGGAATCTGGTGGCCGAGTTCGCCTGT
GAGTACGAGCTGGACGATCACTTTATCATCCTGGCCCACTACCTGGACTTCGCCAAG
CCATTTCCCTGCCAGAAGTGTGAGAACAGGTCTAGACTGAAGCCACACAAGGCCCA
CGAGGCCCACTCAATGCCAAGCTGTTTTACGAGTCTAAGAGCCAGAAGACCA
TCTGCCAGCAGGCAGCAGACACCGTGCTGGCAAAGAGGAGACTGGAGATGCTGGAG
ATGACCAGGACCGAGATGCTGTGCAAGAAGTTCAAGAAGCACCTGGAGCGGCTGCG
CGACCTGGATAACCATCGATCTGCTGTACTACATGGGCGGCGTGGCCTGGTACTGCTG
TCTGTTTCGAGGAGTTTGAGAAGAAGCTGCAGAAGATCATCCAGCTGCTGACCGAGA
ACATCCCAAAGTACAGAAATATCTGGTTCAAGGGCCCCATCAACTCTGGCAAGACC
AGCTTCGCCGCCGCCCTGATCGACCTGCTGGAGGGCAAGGCCCTGAACATCAATTGC
CCTAGCGATAAGCTGCCATTTCGAGCTGGGCTGTGCCCTGGACAAGTTTCATGGTGGTG
TTTGAGGATGTGAAGGGCCAGAACTCCCTGAATAAGGACCTGCAGCCCGGCCAGGG
CATCAACAATCTGGATAACCTGCGGGACCACCTGGATGGAGCAGTGGCCGTGAGCC
TGGAGAAGAAGCACGTGAACAAGAAGCACCATCTTCCCACCCTGCATCGTGACC
GCCAATGACTACTTTATCCCAAAGACCCTGATCGCCCGCTTCTCTTACACCCTGCACT
TTAGCCCCAAGGCCAACCTGAGGGACAGCCTGGATCAGAATATGGAGATCAGAAAG

AGGCGCATCCTGCAGTCCGGAACCACTGCTGCTGTGCCTGATCTGGTGTCTGCCT
GACACCACCTTCAAGCCATGCCTGCAGGAGGAGATCAAGAACTGGAAGCAGATCCT
GCAGTCTGAGATCAGCTACGGCAAGTTTTGTCAGATGATCGAGAACGTGGAGGCCG
GCCAGGACCCCCTGCTGAATATCCTGATCGAGGAGGAGGGCCCAGAGGAGACAGAG
GAGACACAGGACTCCGGCACCTTCTCTCAG

SEQ ID №2: Аминокислотная последовательность модифицированного синтетического консенсусного LTA_g MCV

MDLVLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSLKHHPNKGGNPVMIME
LNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTFKEWWRSGGFSFGKAYEYGPNP
GTNSRSRKPSNASRGAPSGSSPPHSQSSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHIPTSS
SGSSSREETNSGRESSTPNGTSVPRNSSRTDGTAEFLCDKSLSSPEPPSSSEPEPPSSR
SSPRQPPSSSAEEASSSQFTDEEYRSSSFTTPKTPPPFSRKRKFGGSRSSASSASSASFTSTP
PKPKKNRETPVPTDFPIDLSDYLSHAVYSNKTVSCFAIYTTSDKAIELYDKIEFKVDFKS
RHACELGCILLFITLSKHRVSAIKNFCSTFCTISFLICKGVNKMPEMYNNLCKPPYKLLQE
NKPLLNYEFQEKEKEASCNWNLVAEFACEYELDDHFILAHYLDFAKPFPCQKCENRSR
LKPHKAHEAHSNAKLFYESKSQKTICQQAADTVLAKRRLEMLEMTRTEMLCKKFKK
HLERLRDLDTIDLLYYMGGVAWYCCLFEEFEKKLQKIIQLLTENIPKYRNIWFKGPINS
KTSFAAALIDLLEGKALNINCPDKLPFELGCALDKFMVVFEDVKGQNSLNKDLQPGQG
INNLDNLRDHLDGAVAVSLEKKHVNNKKHQIFPPCIVTANDYFIPKTLIARFSYTLHFSPK
ANLRDSLQDNMEIRKRRILQSGTTLLLCLIWCLPDTTFKPCLEEIKNWKQILQSEISYGK
FCQMIENVEAGQDPLLILIEEEGPEETEETQDSGTFSQ

SEQ ID №3: Нуклеотидная последовательность, кодирующая модифицированный синтетический консенсусный STA_g MCV

ATGGACCTGGTGTCTGAACCGAAAGGAGAGGGAGGCCCTGTGCAAGCTGCTG
GAGATCGCCCCTAACTGTTACGGCAATATCCCACTGATGAAGGCCGCCTTCAAGAG
GTCTTGCCTGAAGCACCACCCAAACAAGGGCGGCAATCCCGTGATCATGATGGAGC
TGAACACCCTGTGGAGCAAGTTTCAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGAGCGACTTC
TCCATGTTTGATGAGGTGAGCACCAAGTTCCCCTGGGAGGAGTACGGAACAGCAGC
AGCAGCAGCACAGTCCGGCTATAACGCCAGGTTTTGCAGAGGCCCTGGCTGTATGCT
GAAGCAGCTGCGGGACTCCAAGTGCGCCTGTATCTCTTGCAAGCTGAGCCGCCAGC
ACTGTTCTCTGAAGACCCTGAAGCAGAAGAATTGCGCCACATGGGGCGAGTGCTTCT
GTTATCAGTGTTTTATCCTGTGGTTCGGCTTTCCCCCTACATGGGAGTCCTTCGATTG
GTGGCAGAAAACCCTGGAAGAAACCGACTACTGTCTGCTGCATCTGCATCTGTTC

SEQ ID №4: Аминокислотная последовательность модифицированного синтетического консенсусного STA_g MCV

MDLVLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSLKHHPNKGGNPVMIME
LNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVSTKFPWEEYGTAAAAAQSGYNARFCRGP
GCMKQLRDSKACISCKLSRQHCSLTKLQKNCATWGECFCYQCFILWFGFPPTWESFDWWQ
KTLEETDYCLLHLHLF

SEQ ID №5: Нуклеотидная последовательность, кодирующая модифицированные

синтетические консенсусные LTag и STAg, связанные с сайтом расщепления фурином

ATGGACCTGGTGCTGAACAGGAAGGAGAGAGAGGCCCTGTGCAAGCTGCTG
GAGATCGCCCCCAACTGTTACGGCAATATCCCTCTGATGAAGGCCGCCTTCAAGCGG
AGCTGCCTGAAGCACCAACCAACAAGGGCGGCAACCCTGTGATCATGATGGAGCT
GAATACCTGTGGTCCAAGTTTCAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGTCCGATTTCTC
TATGTTTGACGAGGTGGATGAGGCCCTATCTACGGCACCAAGTTCAAGGAGT
GGTGGCGCTCCGGCGGCTTCTCTTTTGGCAAGGCCTACGAGTACGGCCCTAACCCAC
ACGGCACCAATAGCAGGTCCAGAAAGCCAAGCTCCAACGCCAGCAGGGGAGCACC
ATCCGGATCTAGCCCACCTCACAGCCAGTCCTCTAGCTCCGGCTACGGCTCTTTTAG
CGCCTCCCAGGCCTCTGACAGCCAGTCCAGAGGCCCGATATCCCACCCGAGCACC
ACGAGGAGCCTACCTCTAGCTCCGGCTCTAGCTCCCGGGAGGAGACAACCAACAGC
GGCAGGGAGTCTAGCACCCCAAACGGCACCTCCGTGCCAAGGAATTCCTCTAGGAC
CGACGGAACCGCCGAGGACCTGTTCTGCGATAAGTCCCTGAGCTCCCCTGAGCCTCC
ATCTAGCTCCGAGGAGCCAGAGGAGCCCCCTTCTAGCAGGTCCTCTCCCAGACAGCC
ACCAAGCTCCTCTGCCGAGGAGGCAAGCTCCTCTCAGTTCACCGACGAGGAGTACA
GGAGCTCCTCTTTTACCACCCCTAAGACCCCTCCACCCTTCTCCCGGAAGCGCAAGT
TTGGAGGCTCTAGGAGCTCCGCCTCTAGCGCCTCCTCTGCCAGCTTCACCTCCACCC
CTCCAAAGCCCAAGAAGAACAGAGAGACACCCGTGCCTACCGACTTTCCTATCGAC
CTGAGCGATTACCTGTCCCACGCCGTGTACTCTAATAAGACCGTGAGCTGTTTCGCC
ATCTACACCACCAGCGACAAGGCCATCGAGCTGTACGATAAGATCGAGAAGTTCAA
GGTGGACTTCAAGTCCAGGCACGCATGCGAGCTGGGATGTATCCTGCTGTTTCATCAC
CCTGTCCAAGCACCGCGTGTCTGCCATCAAGAACTTCTGCAGCACCTTTTGTACCAT
CTCCTTTCTGATCTGCAAGGGCGTGAATAAGATGCCTGAGATGTACAACAACCTGTG
CAAGCCCCCTTACAAGCTGCTGCAGGAGAACAAGCCACTGCTGAATTACGAGTTCC
AGGAGAAGGAGAAGGAGGCCAGCTGCAACTGGAATCTGGTGGCCGAGTTCGCCTGT
GAGTACGAGCTGGACGATCACTTTATCATCCTGGCCCACTACCTGGACTTCGCCAAG
CCATTTCCCTGCCAGAAGTGTGAGAACAGGTCTAGACTGAAGCCACACAAGGCCCA
CGAGGCCCACTCAATGCCAAGCTGTTTTACGAGTCTAAGAGCCAGAAGACCA
TCTGCCAGCAGGCAGCAGACACCGTGCTGGCAAAGAGGAGACTGGAGATGCTGGAG
ATGACCAGGACCGAGATGCTGTGCAAGAAGTTCAAGAAGCACCTGGAGCGGCTGCG
CGACCTGGATAACCATCGATCTGCTGTACTACATGGGCGGCGTGGCCTGGTACTGCTG
TCTGTTTCGAGGAGTTTGAGAAGAAGCTGCAGAAGATCATCCAGCTGCTGACCGAGA
ACATCCCAAAGTACAGAAATATCTGGTTCAAGGGCCCCATCAACTCTGGCAAGACC
AGCTTCGCCGCCGCCCTGATCGACCTGCTGGAGGGCAAGGCCCTGAACATCAATTGC
CCTAGCGATAAGCTGCCATTTCGAGCTGGGCTGTGCCCTGGACAAGTTCATGGTGGTG
TTTGAGGATGTGAAGGGCCAGAACTCCCTGAATAAGGACCTGCAGCCCGGCCAGGG
CATCAACAATCTGGATAACCTGCGGGACCACCTGGATGGAGCAGTGGCCGTGAGCC
TGGAGAAGAAGCACGTGAACAAGAAGCACCATCTTCCCACCCTGCATCGTGACC
GCCAATGACTACTTTATCCCAAAGACCCTGATCGCCCGCTTCTCTTACACCCTGCACT
TTAGCCCCAAGGCCAACCTGAGGGACAGCCTGGATCAGAATATGGAGATCAGAAAG

AGGCGCATCCTGCAGTCCGGAACCAACCTGCTGCTGTGCCTGATCTGGTGTCTGCCT
 GACACCACCTTCAAGCCATGCCTGCAGGAGGAGATCAAGAACTGGAAGCAGATCCT
 GCAGTCTGAGATCAGCTACGGCAAGTTTTGTGATGATCGAGAACGTGGAGGCCG
 GCCAGGACCCCCTGCTGAATATCCTGATCGAGGAGGAGGGCCCAGAGGAGACAGAG
 GAGACACAGGACTCCGGCACCTTCTCTCAGAGAGGCCGCAAAAGGAGGTCTGATCT
 GGTGCTGAATCGGAAAGAGAGAGAAGCCCTGTGCAAACTGCTGGAAATCGCCCCAA
 ACTGTTACGGCAACATCCCCCTGATGAAGGCCGCCTTCAAGAGGTCTTGCCTGAAGC
 ACCACCCAAACAAGGGCGGCAATCCCGTGATCATGATGGAGCTGAACACCCTGTGG
 AGCAAGTTTCAGCAGAATATCCACAAGCTGCGGAGCGACTTCTCCATGTTTGATGAG
 GTGAGCACCAAGTTCCTTGGGAGGAGTACGGAACAGCAGCAGCAGCAGCACAGTC
 CGGCTATAACGCCAGGTTTTGCAGAGGCCAGGCTGTATGCTGAAGCAGCTGCGGG
 ACTCCAAGTGCGCCTGTATCTCTTGCAAGCTGAGCCGCCAGCACTGTTCTCTGAAGA
 CCCTGAAGCAGAAGAATTGCGCCACATGGGGCGAGTGCTTCTGTTATCAGTGTTTTA
 TCCTGTGGTTCGGCTTTCCCCCTACATGGGAGTCCTTCGATTGGTGGCAGAAAACCC
 TGGAGGAACTGATTACTGTCTGCTGCACCTGCACCTGTTC

SEQ ID №6: Аминокислотная последовательность модифицированных синтетических консенсусных LTA_g и STA_g, связанная с сайтом расщепления фурином.

MDLVNLRKEREALCKLLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPNKGGNPVIMME
 LNTLWSKFQQNIHKLRSDFSMFDEVDEAPIYGTTFKKEWWRSGGFSFGKAYEYGPNP
 GTNSRSRKPSNASRGAPSGSSPPHSQSSSSGYGSFSASQASDSQSRGPDIPPEHHHEPTSS
 SGSSSREETNSGRESSTPNGTSVPRNSSRTDGTAE DLFCDKSLSSPEPPSSSEEPPEPPSSR
 SSPRQPPSSSAEEASSSQFTDEEYRSSSF TTPKTPPPFSRKRKFGGSRSSASSASSASFTSTP
 PKPKKNRETPVPTDFPIDLS DYLSHAVYSNKTVSCFAIYTTS DKAIELYDKIEKFVDFKS
 RHACELGCILLFITLSKHRVSAIKNFCSTFCTISFLICKGVNKMPEMYNNLCKPPYKLLQE
 NKPLLNYEFQEKEKEASCNWNLVAEFACEYELDDHFILAHYLDFAKPFPCQKCENRSR
 LKPHKAHEAHHSNAKLFYESKSQKTICQQAADTVLAKRRLEMLEMTRTEMLCKKFKK
 HLERLRDLDTIDLLYYMGGVAWYCCLFEEFEKKLQKIIQLLTENIPKYRNIWFKGPINS
 KTSFAAALIDLLEGKALNINCP SDKLPFELGCALDKFMVVFEDVKGQNSLNKDLQPGQG
 INNLDNLRDHLDGAVAVSLEKKHV NKKHQIFPPCIVTANDYFIPKTLIARFSYTLHFSPK
 ANLRDSL DQNMEIRKRRILQSGTTLLLCLIWCLPDTTFKPCLQEEIKNWKQILQSEISYGK
 FCQMIENVEAGQDPLLNIIEEEGPEETEETQDSGTF SQRGRKRRSDLVLNRKEREALCK
 LLEIAPNCYGNIPLMKAAFKRSCLKHHPNKGGNPVIMMELNTLWSKFQQNIHKLRSDFS
 MFDEVSTKFPWEEYGTAAAAAQSGYNARFCRGP GCMLKQLRDSKACISCKLSRQHCS
 LKTLKQKNCATWGECFCYQCFILWFGFPPTWESFDWWQKTLEETDYCLLHLHLF

SEQ ID №7: Аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE

MDWTWILFLVAAATRVHS

Понятно, что вышеприведенное подробное описание и сопровождающие примеры являются просто иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих объем изобретения, определяемого исключительно прилагаемой

формулой изобретения и ее эквивалентами.

Различные изменения и модификации раскрытых вариантов воплощения изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники. Такие изменения и модификации, включая изменения, относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным соединениям, синтезам, композициям, составам или способам применения изобретения, но не ограничиваясь ими, могут быть произведены без отклонения от сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один модифицированный Т-антиген полиомавируса клеток Меркеля (MCV), при этом Т-антиген содержит по меньшей мере одну мутацию, нарушающую по меньшей мере одну онкогенную функцию нативного Т-антигена MCV.

2. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере один онкогенный признак выбран из группы, состоящей из: связывания CR1, связывания DnaJ, связывания фосфатазы pp2A, связывания Rb, АТФазной активности, геликазной активности, связывания белка шаперона, связывания hVam6p, связывания Fbxw7, связывания точки начала репликации, и трансформации.

3. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна мутация представляет собой мутацию в аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из: D44, W209, E216, L142, L91, K92, D93, Y94 и M95.

4. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна мутация выбрана из группы, состоящей из: мутации D44N, мутации W209A, мутации E216K, мутации L142A, мутации L91A, мутации K92A, мутации D93A, мутации Y94A и мутации M95A.

5. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что Т-антиген MCV выбран из группы, состоящей из: большого Т-антигена (LTA_g), малого t-антигена (STA_g) и их комбинации.

6. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты кодирует пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере на приблизительно 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6, и

иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6.

7. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из молекулы ДНК и молекулы РНК.

8. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, по меньшей мере на приблизительно 90%

идентичной по всей длине нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

б) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, идентичного по меньшей мере на приблизительно 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

в) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5, и

г) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранного из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5.

9. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая пептид, функционально связана по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: стартового кодона, лидерной последовательности IgE и стоп-кодона.

10. Иммуногенная композиция по п.9, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты кодирует пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

б) иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере на приблизительно 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

в) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6, и

г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6, функционально связанного с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №7.

11. Иммуногенная композиция по п.10, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5

б) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, идентичного по меньшей мере на приблизительно 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

в) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID

№1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5, и

г) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранного из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5, функционально связанного с нуклеотидной последовательностью, кодирующей SEQ ID №7.

12. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит вектор экспрессии.

13. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты включена в вирусную частицу.

14. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит фармацевтически приемлемый наполнитель.

15. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит адъювант.

16. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

б) иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере на приблизительно 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

в) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6, и

г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6.

17. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из молекулы ДНК и молекулы РНК.

18. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

б) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

в) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5, и

г) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранного из

группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5.

19. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16, отличающаяся тем, что кодируемый пептид функционально связан по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: стартового кодона, лидерной последовательности IgE и стоп-кодона.

20. Молекула нуклеиновой кислоты по п.19, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты кодирует пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

б) иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

в) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 and SEQ ID №6, и

г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID № 2, SEQ ID № 4 и SEQ ID № 6, функционально связанного с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID № 7.

21. Молекула нуклеиновой кислоты по п.20, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

б) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, идентичной по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5,

в) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5, и

г) иммуногенного фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранного из группы, состоящей из: SEQ ID №1, SEQ ID №3 и SEQ ID №5, функционально связанного с нуклеотидной последовательностью, кодирующей SEQ ID №7.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит вектор экспрессии.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по п.16, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит вирусную частицу.

24. Иммуногенная композиция, содержащая пептид, в которой пептид включает

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 and SEQ ID №6,

б) иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

в) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6 и

г) иммуногенного фрагмента, содержащего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6.

25. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на приблизительно 90% по всей длине аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

б) иммуногенного фрагмента, идентичного по меньшей мере приблизительно на 90% по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6,

в) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6, и

г) иммуногенного фрагмента, включающего по меньшей мере 60% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID №2, SEQ ID №4 и SEQ ID №6.

26. Способ индукции иммунного ответа против Т-антигена MCV у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение иммуногенной композиции субъекту по п.1 формулы изобретения.

27. Способ по п.26, отличающийся тем, что введение включает по меньшей мере один из способов: электропорация и инъекция.

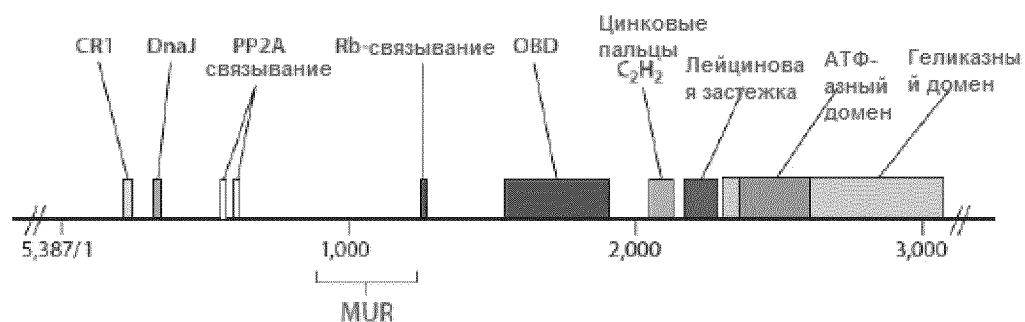
28. Способ лечения или профилактики MCV-ассоциированной патологии у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение иммуногенной композиции субъекту по п.1 формулы изобретения.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что введение включает по меньшей мере один из способов: электропорация и инъекция.

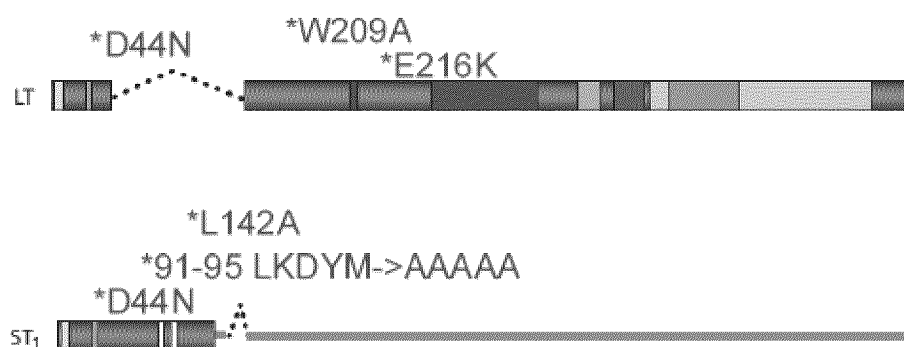
30. Способ по п.28, отличающийся тем, что MCV-ассоциированная патология представляет собой по меньшей мере одну из следующих: инфекция MCV и карцинома клеток Меркеля.

По доверенности

A



B

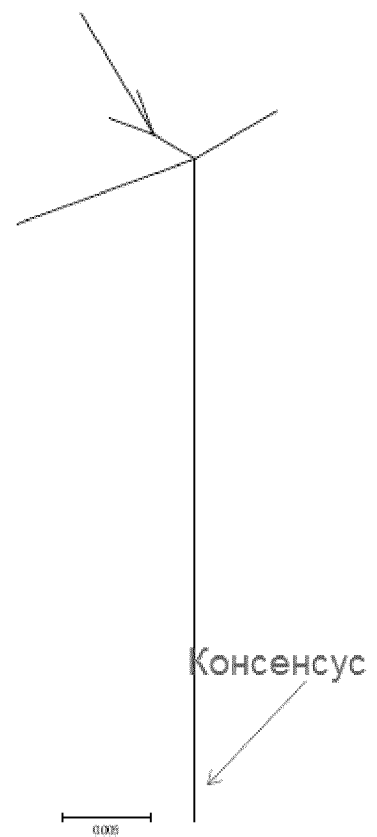


Фигура 1A-1B

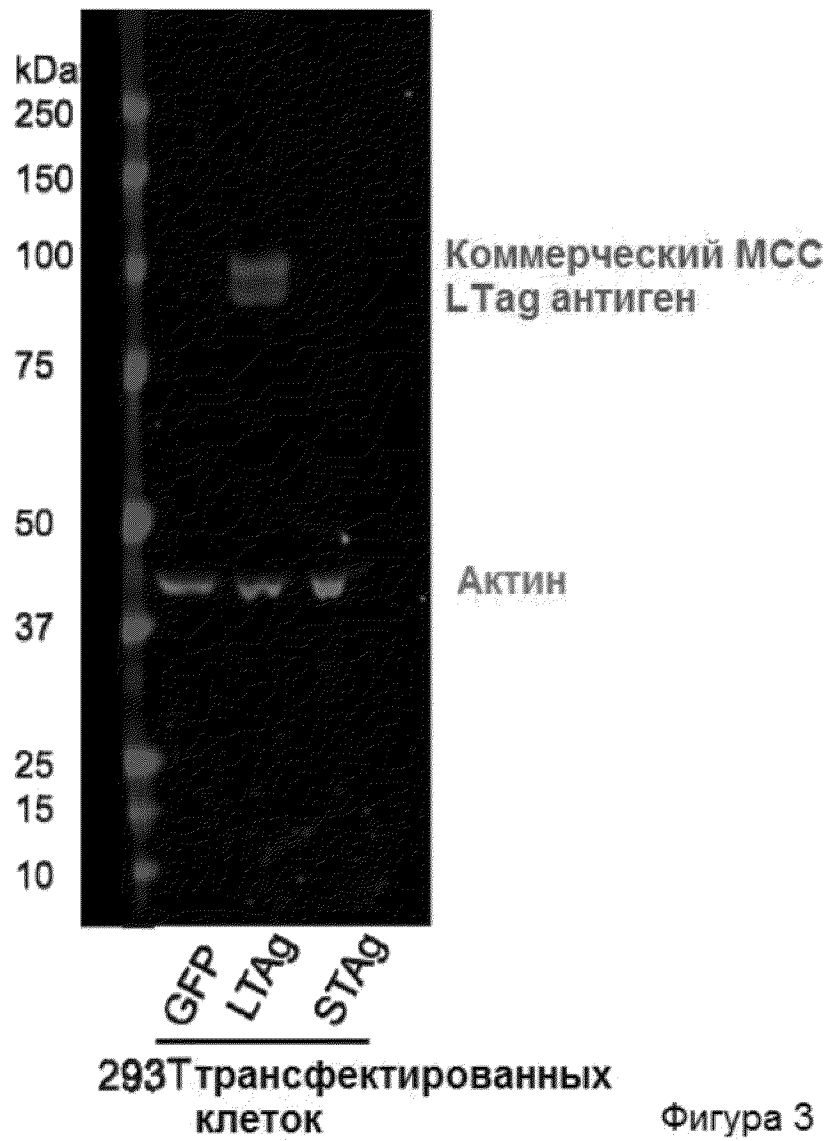
A МСС большой Т-
антиген



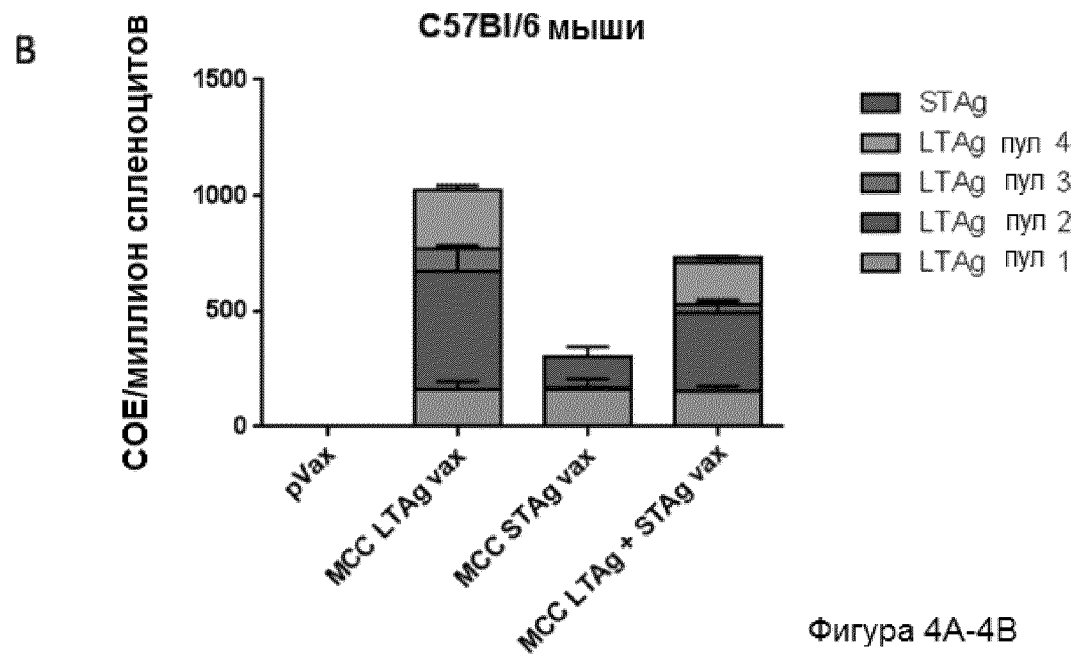
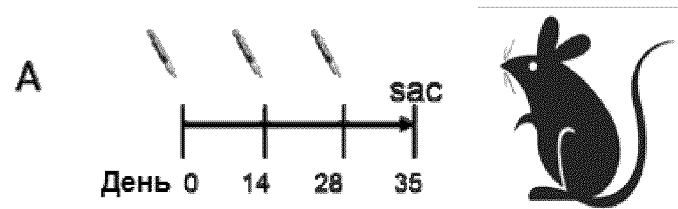
B МСС малый t-
антиген



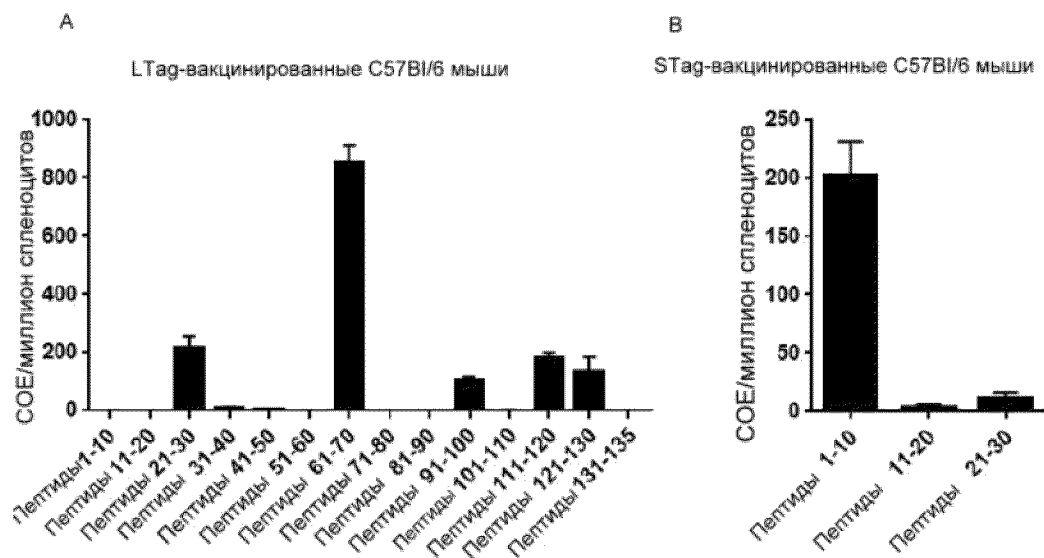
Фигура 2А-2В



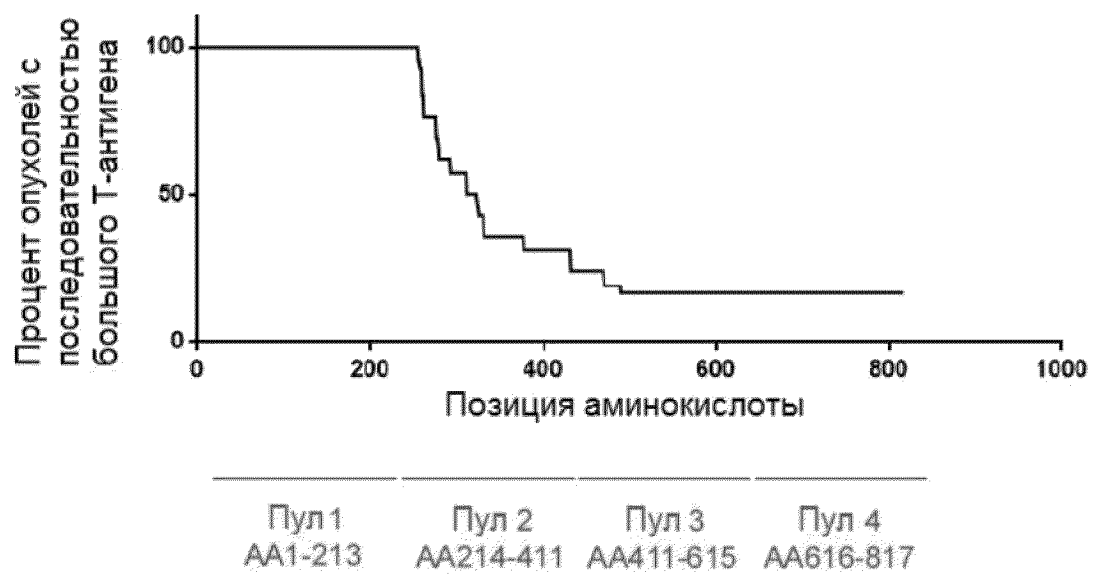
Фигура 3



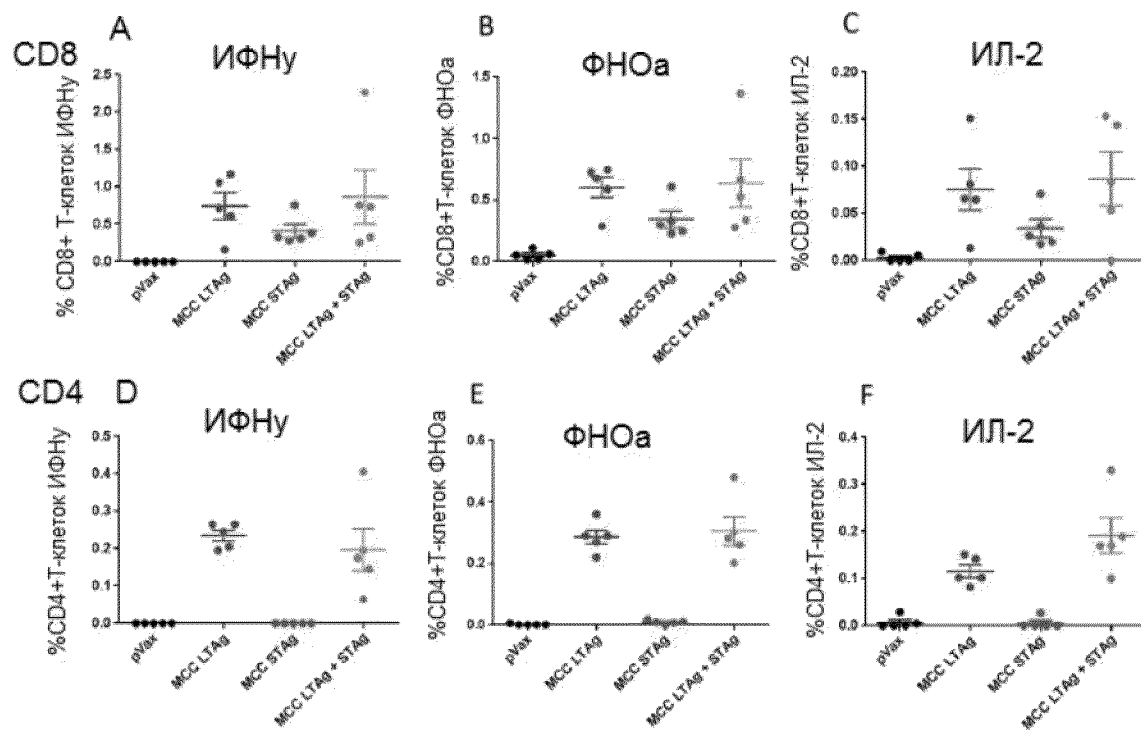
Фигура 4А-4В



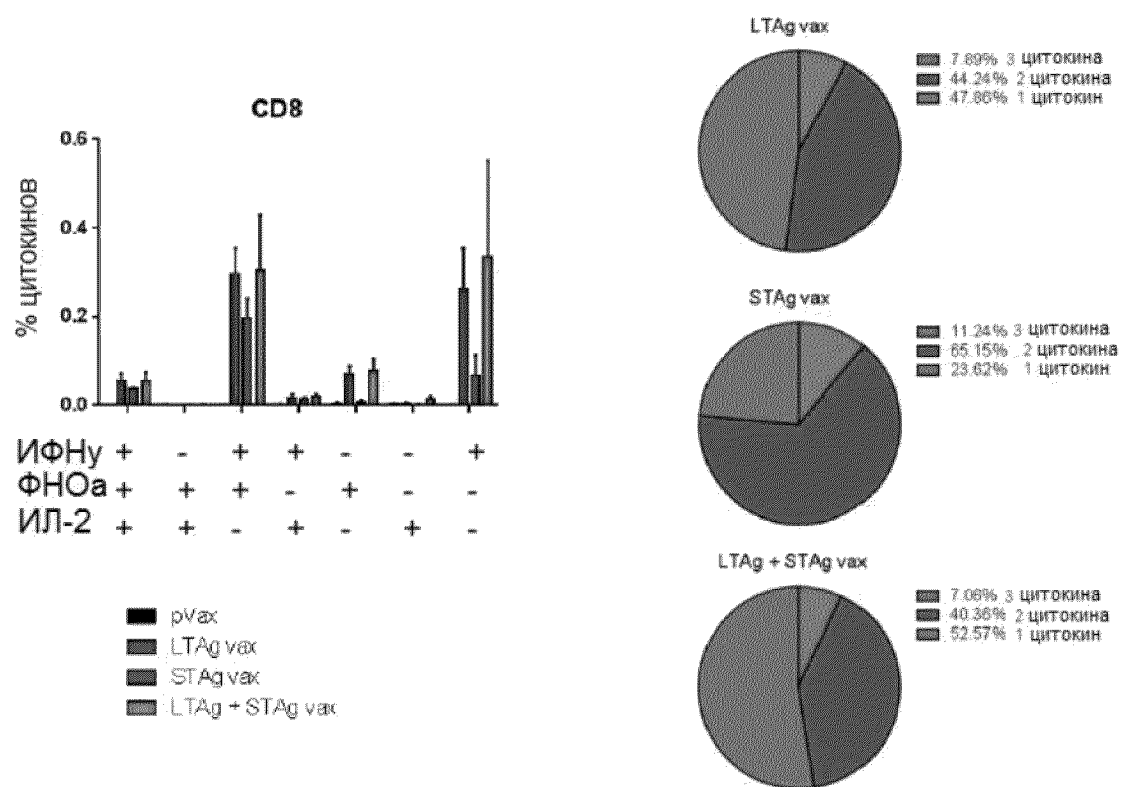
Фигура 5А-5В



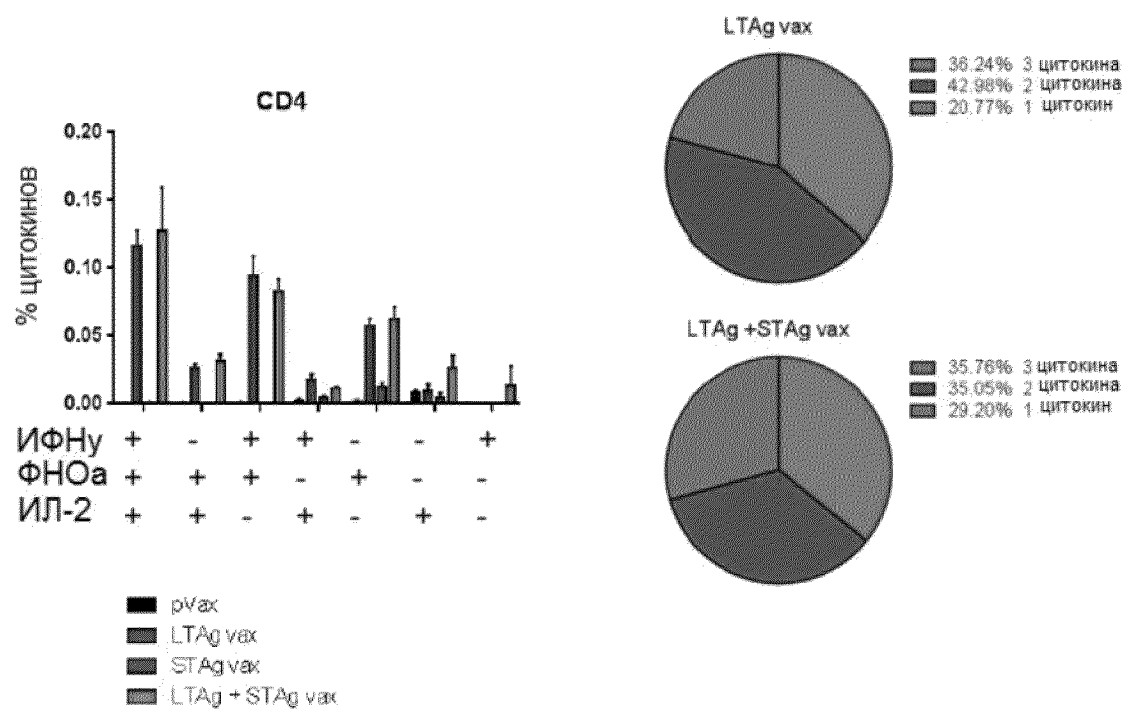
Фигура 6



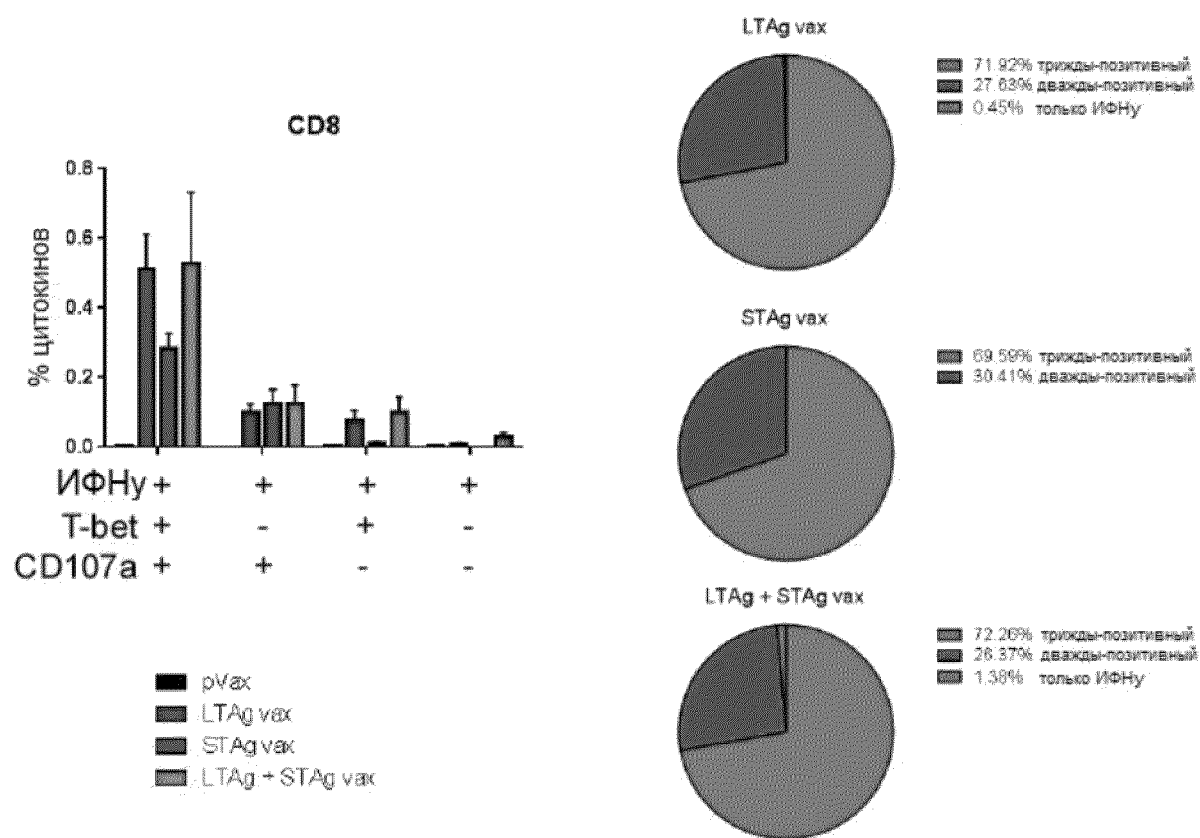
Фигура 7A-7F



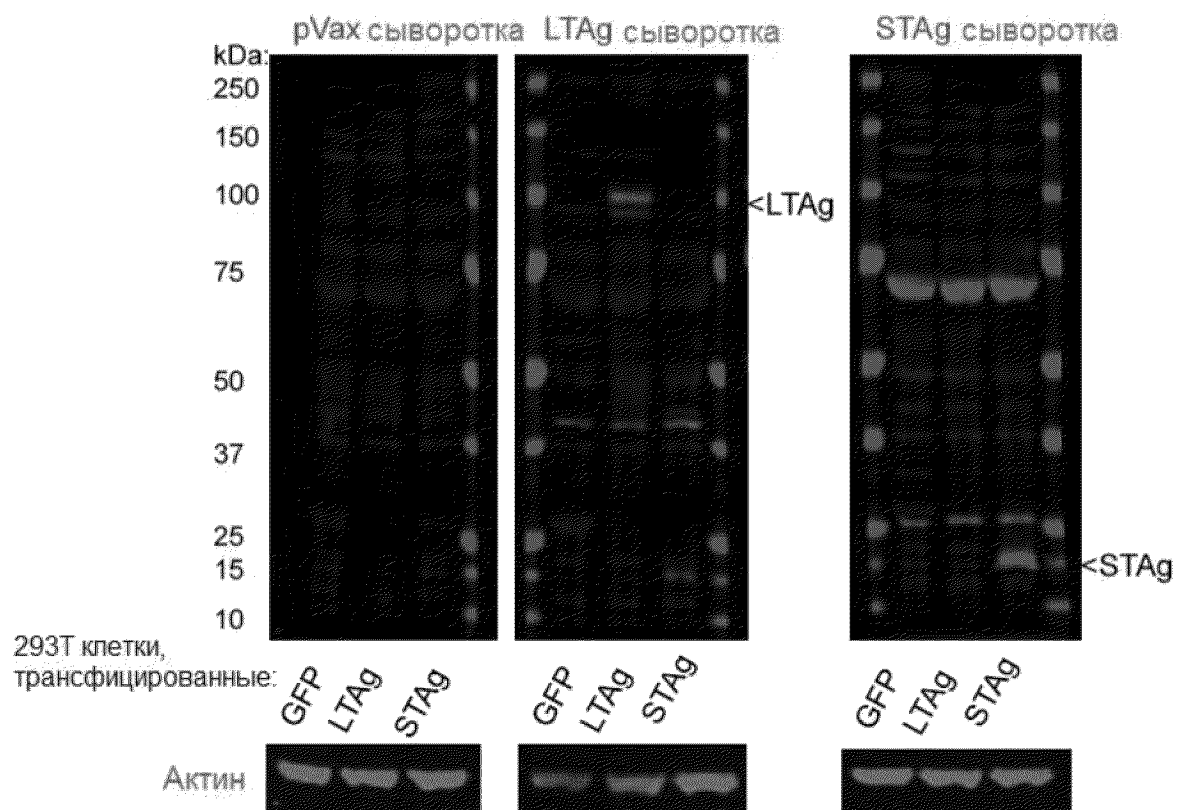
Фигура 8



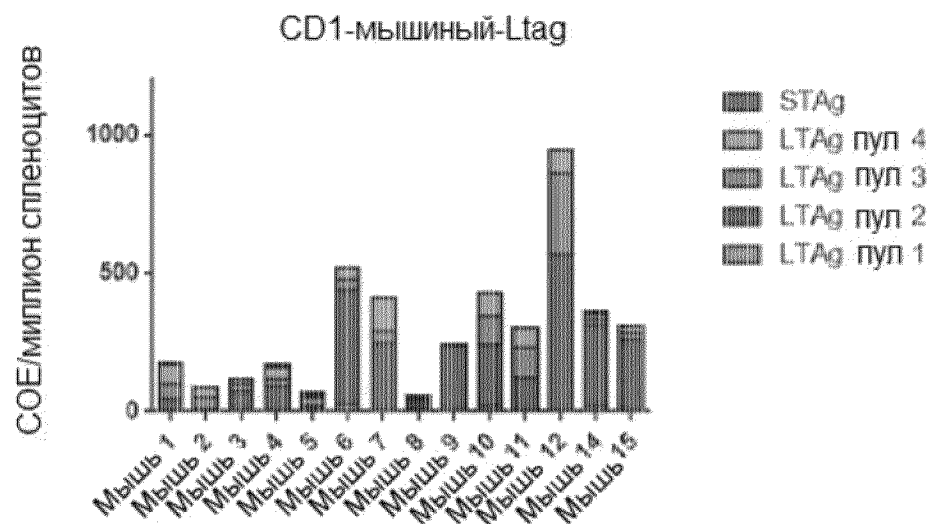
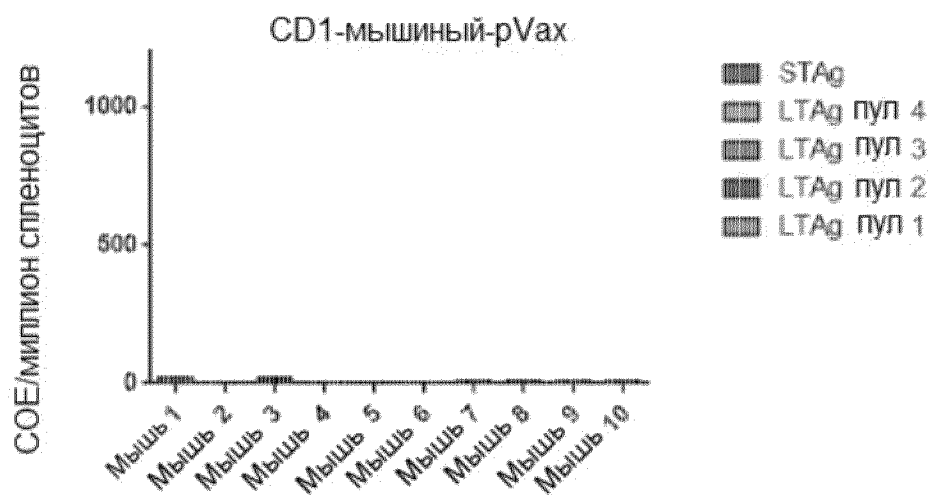
Фигура 9



Фигура 10

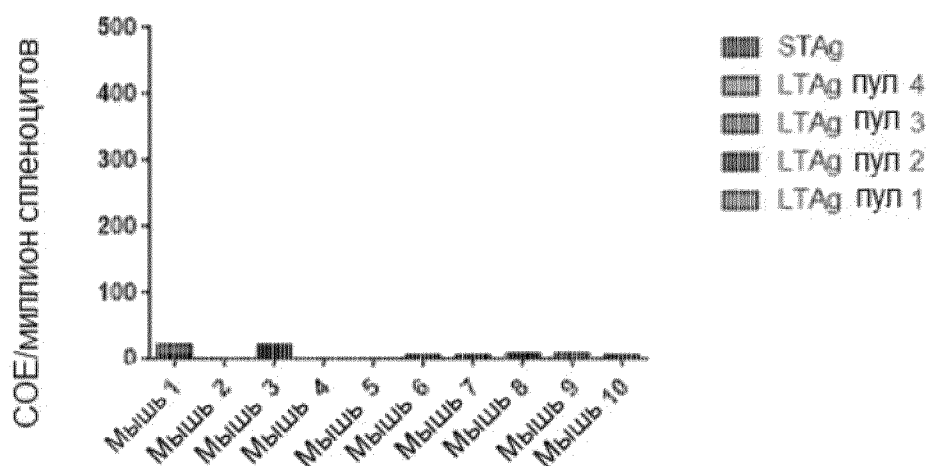


Фигура 11

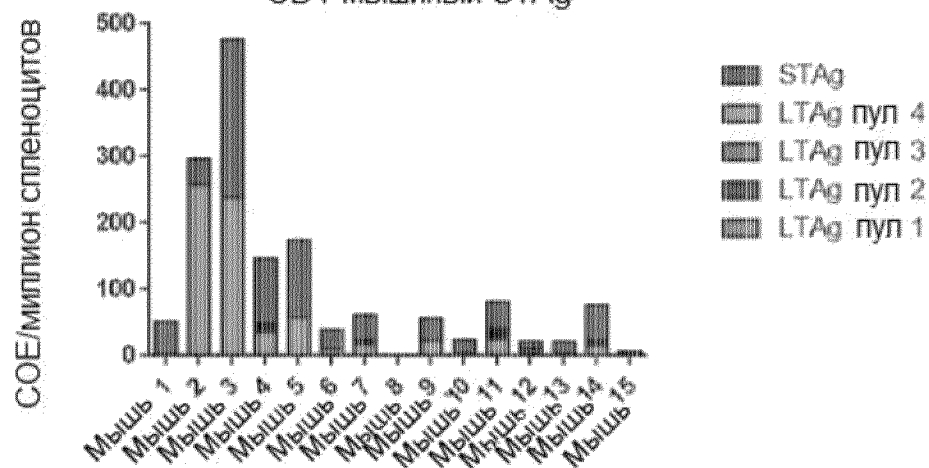


Фигура 12

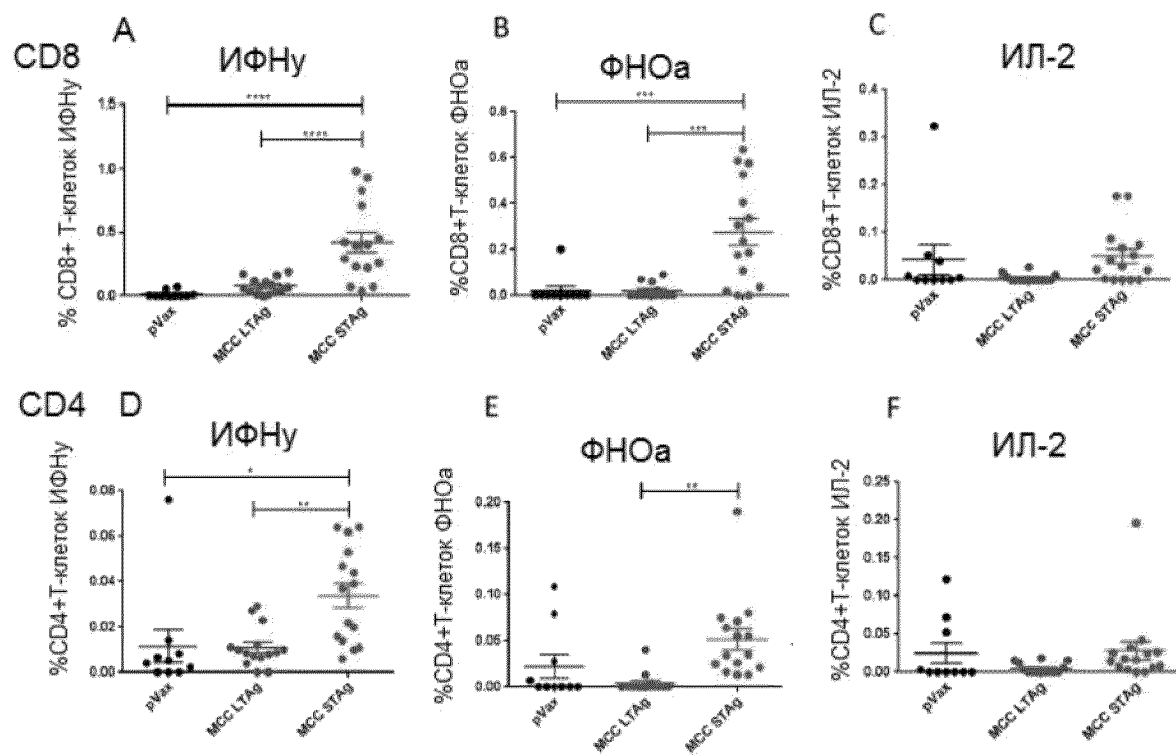
CD1-мышинный-pVax



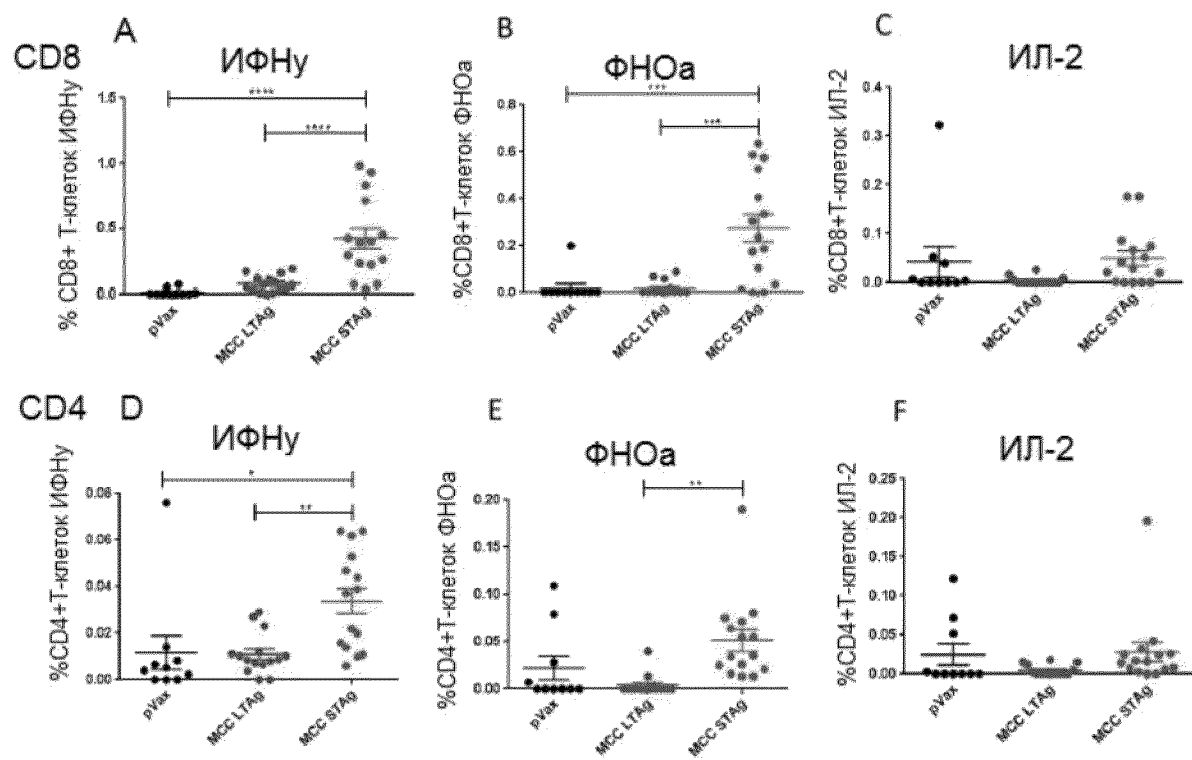
CD1-мышинный-STAg



Фигура 13



Фигура 14А-14F



Фигура 15А-15F