



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.20

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201600189

(22) Дата подачи заявки
2014.08.21

(54) КОМПОЗИЦИЯ И ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ЛЕГКИХ

(31) РСТ/EP2013/002514

(32) 2013.08.21

(33) EP

(43) 2016.08.31

(86) РСТ/EP2014/002299

(87) WO 2015/024666 2015.02.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КУРЕВАК АГ (DE)

(72) Изобретатель:
**Каллен Карл-Йозеф, Фотин-Млечек
Мариола, Гнад-Фогт Ульрике (DE)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2012116714
WO-A1-2012116715
BENJAMIN PETSCH ET AL.: "Protective
efficacy of in vitro synthesized, specific
mRNA vaccines against influenza A virus

infection", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 12, December 2012 (2012-12), pages 1210-1216, XP055051005, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2436 Abstract * Discussion* Online Methods

THOMAS SCHLAKE ET AL.: "Developing mRNA-vaccine technologies", RNA BIOLOGY, vol. 9, no. 11, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 1319-1330, XP055098782, ISSN: 1547-6286, DOI: 10.4161/rna.22269 the whole document

FOTIN-MLECZEK MARIOLA ET AL.: "Highly potent mRNA based cancer vaccines represent an attractive platform for combination therapies supporting an improved therapeutic effect", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, vol. 14, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 428-439, XP002719717, ISSN: 1521-2254 the whole document
WO-A2-2006015789

BAUER ASLI PETRA ET AL.: "The impact of intragenic CpG content on gene expression", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 38, no. 12, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 3891-3908, XP002719718, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB
ISSN: 1362-4962 the whole document

WO-A1-2012019630

WO-A1-2009046739

WO-A1-2011067161

WO-A2-2009046974

(57) Описана композиция, содержащая по меньшей мере одну мРНК, кодирующую комбинацию антигенов, которые могут вызывать (адаптивный) иммунный ответ у млекопитающего, в которой антигены выбраны из группы, состоящей из 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), сурвивина (белок, содержащий бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов 5; BIRC5), NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1; STAG1B), MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1), MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2) и MUC1 (муцин 1). Описаны также вакцина, содержащая по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует указанную комбинацию антигенов, и применение указанной композиции (для приготовления вакцины) и/или вакцины для вызывания (адаптивного) иммунного ответа для лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких (NSCLC), и связанных с ним заболеваний или нарушений. И, наконец, описаны наборы, прежде всего наборы компонентов, которые содержат композицию и/или вакцину.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композиции, которая содержит по меньшей мере одну мРНК, кодирующую комбинацию антигенов, которые обладают способностью вызвать (адаптивный) иммунный ответ у млекопитающего, где антигены выбирают из группы, состоящей из 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), сурвивина (белок 5, содержащий бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов; BIRC5), NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, CTAG1B), MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1), MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2) и MUC1 (муцин 1). Изобретение относится также к вакцине, содержащей по меньшей мере одну мРНК, кодирующую указанную комбинацию антигенов, и к применению указанной композиции (для приготовления вакцины) и/или вакцины для вызывания (адаптивного) иммунного ответа с целью лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких (NSCLC), и связанных с ним заболеваний или нарушений. И, наконец, изобретение относится к наборам, прежде всего наборам компонентов, которые содержат композицию и/или вакцину.

Предпосылки создания изобретения

Из всех злокачественных опухолей 25% приходится на бронхиальные карциномы (карциномы легких). Во всем мире они являются наиболее часто встречающейся причиной связанной с раком смерти у мужчин и второй из наиболее часто встречающихся причин у женщин. В Германии этот тип карцином является третьим по распространенности после карциномы предстательной железы и колоректальной карциномы. Ежегодно они вызывают 1,3 млн смертельных случаев во всем мире. В Центральной Европе заболеваемость им составляет примерно 60 на 100000 населения, и количество людей, у которых впервые диагностирован рак легких, постоянно возрастает (в Германии в настоящее время количество случаев составляет примерно 50000 в год). После диагностирования рака легких средний уровень общей пятилетней выживаемости составляет только 5%. Однако продолжительность жизни каждого отдельного пациента полностью зависит от стадии болезни (TMN-классификация) и рассматриваемого подтипа карциномы (рак легких) (см. ниже).

Основные подтипы рака легких, которые классифицируют по размеру и внешнему виду злокачественных клеток, идентифицируемых с помощью микроскопа, представляют собой мелкоклеточный рак легких (20%) и немелкоклеточный рак легких (NSCLC) (80%). Эта классификация, хотя она основывается на простых гистологических критериях, имеет очень важное значение в клинической практике и для прогнозирования заболевания, при этом мелкоклеточный рак легких, как правило, поддается лечению с помощью химиотерапии, а при немелкоклеточном раке легких наиболее часто используют хирургическое вмешательство в качестве лечения первой линии.

Подтипы немелкоклеточного рака легких (NSCLC) объединяют в одну группу на основании того, что их прогнозирование и пути их лечения являются примерно одинаковыми. Имеются три основных подтипа: плоскоклеточная карцинома легких, аденокарцинома и крупноклеточная карцинома легких. Хирургия является основным путем лечения; однако только для четверти пациентов резекция оказывается успешной, при этом частота рецидивов составляет 50%. Терапевтические подходы на запущенной стадии заболевания включают (после хирургического вмешательства) адъювантную химиотерапию и/или адъювантную лучевую терапию, в то время как монотерапия (терапия первой линии), по-видимому, представляет собой подход, ассоциированный с относительно плохими результатами. При сравнении четырех обычно применяемых режимов комбинированной химиотерапии ни у одной из них не обнаружено преимуществ. Уровни ответа варьировались от 15 до 22%, при этом уровни однолетней выживаемости составляли от 31 до 36% (см., например, O'Mahony D., S. Kummar и др., "Non-small-cell lung cancer vaccine therapy: a concise review", J. Clin. Oncol. 23(35), 2005, сс. 9022-9028). Таким образом, даже хотя предоперационная химиотерапия, по-видимому, не приводит к удлинению продолжительности жизни, установлено, что адъювантная химиотерапия, если ее применяют в сочетании с лучевой терапией, также существенно увеличивает продолжительность жизни.

Одним из применяемых в настоящее время химиотерапевтических подходов включает комбинации субстанций на основе платины, например, с гемцитабином, даже в качестве терапии первой линии, а, например, пеметрексед применяют в качестве терапии второй линии.

Другим подходом, применяемым для лечения NSCLC, является так называемая "таргетная (направленная) терапия", с помощью которой пытаются повышать успех классической цитотоксической химиотерапии путем воздействия на специфические для опухоли структуры-мишени на молекулярном уровне. Применяемые для этой цели субстанции включают бевацизумаб (ингибитор ангиогенеза) или эрлотиниб, мишенью которого являются рецепторные тирозинкиназы эпидермального фактора роста (EGFR).

Даже несмотря на то, что при применении современных терапевтических подходов к лечению рака легких, прежде всего NSCLC, наблюдается несомненная положительная динамика, все еще существуют серьезные трудности (учитывая высокий уровень смертности), что определяет настоящую потребность в дополнительных, альтернативных или усовершенствованных путях лечения.

Таким образом, в настоящем изобретении предлагается использовать иммунную систему при лечении NSCLC. Иммунная система играет важную роль при лечении и предупреждении многочисленных заболеваний. Согласно существующему уровню техники у млекопитающих имеются различные меха-

низмы защиты организма, основанные на идентификации и уничтожении, например, опухолевых клеток. Эти опухолевые клетки необходимо распознавать и отличать от здоровых клеток и тканей организма.

Иммунная система позвоночных животных, таких как человек, состоит из многих типов белков, клеток, органов и тканей, которые участвуют в сложной и динамической системе. В качестве компонента такого более сложного иммунного ответа система позвоночных животных адаптировалась со временем к более эффективному распознаванию конкретных патогенов или опухолевых клеток. Процесс адаптации создает иммунологическую память и позволяет еще более эффективно обеспечивать защиту в процессе последующих "столкновений" с патогенами. Указанный процесс адаптивного (искусственного) или приобретенного иммунитета формирует основу стратегий вакцинации.

Адаптивная иммунная система является антигенспецифической и включает распознавание специфических "своих" или "чужих" (не своих) антигенов в процессе, который называется презентацией антигена. Антигенная специфичность позволяет вырабатывать ответы, направленные на специфические патогены, или инфицированные патогеном клетки, или опухолевые клетки. Способность создавать такие приспособленные ответы, как правило, поддерживается в организме "клетками памяти". Если патоген инфицирует организм более одного раза, то указанные специфические клетки памяти используются для его быстрой элиминации. Таким образом, адаптивная иммунная система обеспечивает более сильный иммунный ответ, а также иммунологическую память, с помощью которой каждый патоген или опухолевая клетка "запоминаются" по одному или нескольким сигнатурным антигенам.

Основными компонентами адаптивной иммунной системы позвоночных являются, прежде всего, лимфоциты на клеточном уровне и антитела на молекулярном уровне. Лимфоциты в качестве клеточных компонентов адаптивной иммунной системы включают В-клетки и Т-клетки, происходящие из гематопоэтических стволовых клеток в костном мозге. В-клетки участвуют в гуморальном ответе, а Т-клетки участвуют в опосредуемом клетками иммунном ответе. Как В-клетки, так и Т-клетки несут рецепторные молекулы, которые распознают специфические мишени. Т-клетки распознают "чужую" мишень, такую как патогенная структура-мишень, только после процессирования и презентации антигенов (например, небольших фрагментов патогена) в комбинации со "своим" рецептором, который называют молекулой главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). В противоположность этому В-клеточный антигенспецифический рецептор представляет собой молекулу антитела на поверхности В-клетки, и он распознает сами патогены, когда антитела на ее поверхности связываются со специфическим чужеродным антигеном. Указанный комплекс антиген/антитело поглощается В-клеткой и процессируется в результате протеолиза с образованием пептидов. Затем В-клетка презентует указанные антигенные пептиды на своей поверхности с молекулами ГКГС класса II. Указанная комбинация ГКГС и антигена привлекает соответствующую Т-клетку-хелпера, которая высвобождает лимфокины и активирует В-клетку. Поскольку затем активированная В-клетка начинает делиться, то ее потомство секретирует миллионы копий антител, которые распознают антиген. Указанные антитела циркулируют в плазме крови и лимфе, связываются с патогенами или опухолевыми клетками, которые экспрессируют антиген, и тем самым "маркируют" их для последующего разрушения в результате активации комплемента или поглощения и разрушения фагоцитами.

В качестве клеточного компонента адаптивной иммунной системы цитотоксические Т-клетки ($CD8^+$) могут формировать ЦТЛ-ответ. Цитотоксические Т-клетки ($CD8^+$) могут распознавать пептиды из эндогенных патогенов и аутоантигенов, связанные молекулами ГКГС типа I. $CD8^+$ -Т-клетки выполняют свою цитолитическую функцию посредством высвобождения цитотоксических белков в клетку.

Механизмы иммунной системы формируют мишени, пригодные для лечебных целей. Соответствующие методы, как правило, основываются на введении адъювантов для вызывания врожденного иммунного ответа или на введении антигенов или иммуногенов для вызывания адаптивного иммунного ответа. Поскольку основой антигенов, как правило, являются специфические компоненты патогенов (например, поверхностные белки) или их фрагменты, то предусматривается также введение нуклеиновых кислот пациенту, что сопровождается экспрессией требуемых полипептидов, белков или антигенов.

Известные к настоящему времени общепринятые методы вызывания иммунного ответа, иммунизации или вакцинации основываются на применении молекул ДНК для включения требуемой генетической информации в клетку. Разработаны различные методы интродукции ДНК в клетки, такие как трансфекция с использованием фосфата кальция, трансфекция полипреномом, слияние протопластов, электропорация, микроинъекция и липофекция, при этом доказано, что липофекция является наиболее приемлемым методом. Аналогичным образом ДНК вирусов можно использовать также в качестве ДНК-носителя. Благодаря их инфекционным свойствам при использовании указанных вирусов достигается очень высокая скорость трансфекции. Применяемые вирусы являются генетически модифицированными так, чтобы исключить образование функциональных инфекционных частиц в трансфектированной клетке. Однако несмотря на указанные меры предосторожности, невозможно исключить риск неконтролируемого размножения интродуцированного гена и вирусных генов, например, из-за потенциально возможных случаев рекомбинации. Это также влечет за собой риск того, что ДНК может встраиваться в интактный ген генома клетки-хозяина, например, путем рекомбинации, что приводит к тому, что этот ген может быть изменен в результате мутации и, как следствие, полностью или частично инактивирован, или может при-

водить к ошибочной информации. Другими словами, синтез генного продукта, который является жизненно важным для клетки, может полностью подавляться или в другом варианте может иметь место экспрессия модифицированный или неправильный генный продукт. Особый риск представляет собой интеграция ДНК в ген, который участвует в регуляции клеточного роста. В этом случае клетка-хозяин может вырождаться и приводить к образованию рака или опухоли. Кроме того, если ДНК, интродуцированная в клетку, должна экспрессироваться, то необходимо, чтобы соответствующий переносчик ДНК содержал сильный промотор, такой как промотор вируса CMV. Интеграция указанных промоторов в геном обработанной клетки может приводить к нежелательным изменениям регуляции генной экспрессии в клетке. Другим риском при применении ДНК в качестве агента для индукции иммунного ответа (например, в виде вакцины) является индукция патогенных антител к ДНК у пациента, которому интродуцирована чужеродная ДНК, что приводит к вызыванию (возможно фатального) иммунного ответа.

Таким образом, для эффективной стимуляции иммунной системы для лечения рака легких, позволяющей исключить проблемы, связанные с неконтролируемым размножением интродуцированного гена в результате применения композиций на основе ДНК, разработаны композиции на основе РНК. В WO 2009/046738 представлена композиция, содержащая по меньшей мере одну РНК, которая кодирует по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из NY-ESO-1, MAGE-C1 и MAGE-C2, и которая также кодирует по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, состоящей из hTERT, WT1, MAGE-A2, 5T4, MAGE-A3, MUC1, Her-2/neu, NY-ESO-1, CEA, сурвивина, MAGE-C1 и/или MAGE-C2. Даже хотя комбинация по меньшей мере двух антигенов в указанной композиции представляет собой важный шаг к активной иммунотерапии рака легких, практикующий врач при рассмотрении варианта лечения для индивидуального пациента все еще сталкивается с проблемой выбора приемлемой комбинации антигенов, которая обладала бы и эффективностью и хорошей переносимостью.

Таким образом, в целом, имеется и возможность, и необходимость создания эффективной системы, которую можно применять для эффективной стимуляции иммунной системы с целью лечения рака легких, прежде всего немелкоклеточного рака легких (NSCLC), в которой отсутствуют проблемы, возникающие при применении композиций, известных в данной области.

Таким образом, в основу настоящего изобретения положена задача разработать композицию, которая а) позволяет лечить рак легких путем стимуляции иммунной системы и при этом б) лишена указанных выше недостатков.

Таким образом, в основу настоящего изобретения положена задача разработать вакцину против рака легких или композицию для лечения рака легких путем стимуляции иммунной системы.

Задача, положенная в основу настоящего изобретения, решается с помощью представленного в формуле изобретения объекта изобретения.

Краткое изложение сущности изобретения

Указанная задача решается с помощью объекта настоящего изобретения, прежде всего с помощью композиции, которая содержит по меньшей мере одну мРНК, где по меньшей мере одна мРНК кодирует следующие антигены:

5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG);
сурвивин (белок 5, содержащий бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов; BIRC5);

NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1; CTAG1B);

MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1);

MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2) и

MUC1 (муцин 1),

или их фрагменты, и где по меньшей мере одна мРНК является моно-, би- или полицистронной.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что специфическая комбинация антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов из указанной выше группы, кодируемых по меньшей мере одной мРНК, входящей в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, обладает способностью эффективно стимулировать (адаптивную) иммунную систему, что позволяет лечить рак легких, предпочтительно подтипы немелкоклеточного рака легких, и связанные с ними заболевания или нарушения. Обладающие преимуществом воздействия на лечение указанных выше заболеваний и нарушений достигаются вне зависимости от того, применяют ли комбинацию антигенов, предлагаемых в изобретении, в качестве одной композиции, или путем отдельного введения индивидуальных антигенов. Таким образом, любая комбинация антигенов, указанных в настоящем описании, например, в форме шести различных препаратов мРНК, может быть предназначена для решения одинаковых задач и достигать требуемого действия. Ожидается, что количество респондеров на такую стратегию вакцинации должно быть существенно большим по сравнению с другими подходами. В контексте настоящего описания понятия антигены, антигенные белки или антигенные пептиды можно применять в качестве синонимов. В контексте настоящего изобретения под композицией, предлагаемой в изобретении, следует понимать также композицию, которая обладает способностью вызывать иммунный ответ, предпочтительно адаптивный иммунный ответ, указанный в настоящем описании, благодаря по меньшей мере одному компоненту(ам), входящему(им) в композицию, или скорее благодаря по меньшей мере одному из антигенов, кодируемых

по меньшей мере одним из компонентов композиции, т.е. благодаря по меньшей мере одной мРНК, кодирующей указанные выше антигены. Согласно изобретению комбинация антигенов, либо введенных по отдельности (например, одновременно) или в виде одной композиции, обладает способностью вызывать требуемый иммунный ответ. Раздельное введение может означать, что различные мРНК либо вводят практически одновременно, например, в пределах 10 мин, или в различные моменты в течение более продолжительного периода времени, например, составляющего более 30 мин.

Ниже комбинация антигенов, предлагаемых в изобретении, будет проиллюстрирована путем описания композиции, которая содержит по меньшей мере одну мРНК, кодирующую комбинацию антигенов. Следует понимать, что по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, отличается представленными в настоящем описании особенностями вне зависимости от того, применяют ли ее в одной композиции или в форме различных препаратов, например, приготовленных в виде шести различных мРНК, каждая из которых кодирует один антиген, и которые применяют по отдельности (например, одновременно).

Среди большого количества антигенов, экспрессируемых в клетках рака легких, согласно настоящему изобретению отобраны шесть антигенов, которые представлены в настоящем описании, т.е. 5T4, сурвивин, NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2 и MUC1. Указанные антигены идентифицированы в качестве потенциальных мишеней для иммунотерапии. Согласно изобретению один или несколько указанных выше антигенов кодируются по меньшей мере одной ОРС/кодирующей областью/кодирующей последовательностью, присутствующей по меньшей мере в одной мРНК. В данном контексте матричная мРНК, как правило, представляет собой одноцепочечную РНК, которая состоит (по меньшей мере) из нескольких структурных элементов, например, необязательной 5'UTR-области, расположенного против хода транскрипции сайта связывания рибосом, за которым располагается кодирующая область, необязательной 3'UTR-области, за которой может находиться поли-А-хвост (и/или поли-С-хвост). Согласно изобретению композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует по меньшей мере шесть антигенов, указанных выше. При этом одна мРНК может кодировать один или несколько антигенов, если полученная композиция содержит по меньшей мере шесть указанных выше антигенов. Таким образом, по меньшей мере одна мРНК в композиции может содержать более одной ОРС/кодирующей области/кодирующей последовательности, если композиция в целом содержит по меньшей мере одну кодирующую область каждого из по меньшей мере шести антигенов, указанных выше. Альтернативно этому кодирующая область для каждого по меньшей мере из шести антигенов может быть локализована на различных мРНК в композиции. Ниже представлены более предпочтительные варианты по меньшей мере одной мРНК:

Согласно настоящему изобретению по меньшей мере одна мРНК в композиции кодирует 5T4. "5T4" представляет собой трофобластический гликопротеин. Harrop, Connolly и др. в 2006 г. описали, что человеческий карциноэмбриональный антиген 5T4 представляет собой имеющий молекулярную массу 72 кДа богатый лейцином мембранный гликопротеин, высокий уровень экспрессии которого обнаружен в плаценте, а также в широком разнообразии человеческого карцином, включая колоректальный рак, рак желудка, почки и яичника, но экспрессия которого редко наблюдается в здоровых тканях (см. Harrop R., N. Connolly и др., "Vaccination of colorectal cancer patients with modified Vaccinia Ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax) induces immune responses which correlate with disease control: a phase I/II trial", Clin. Cancer. Res. 12(11 Pt. 1), 2006, сс. 3416-3424). Сверхэкспрессия 5T4 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с колоректальной карциномой, карциномой желудка и яичника. Несмотря на указанное сочетание факторов, 5T4-специфический клеточный и/или гуморальный иммунные ответы индуцировались у большинства пациентов (16 из 17; 94%) после иммунизации TroVax, что рассматривается как обнадеживающий результат по сравнению со многими другими испытаниями противораковой иммунотерапии. В целом, обнаружена безопасность и иммуногенность TroVax при введении i.m.- и i.d.-путями. Zhao и Wang (2007) (Zhao Y. и Y. Wang, "5T4 oncotrophoblast glycoprotein: janus molecule in life and a novel potential target against tumors", Cell.Mol. Immunol. 4(2), 2007, сс. 99-104) описали, что 5T4 канцеротрофобластический гликопротеин представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый в эмбриональной ткани и на поверхности клеток различных злокачественных опухолей. Он играет жизненно важную роль в многочисленных биологических и патологических процессах, включая массивную клеточную миграцию в процессе эмбриогенеза, клеточную инвазию, ассоциированную с имплантацией, и неопластические метастазы при развитии онкогенеза. Согласно Kopreski, Benko и др. (2001) 5T4 представляет собой трофобластический гликопротеин, часто сверхэкспрессирующийся при эпителиальных злокачественных новообразованиях, поэтому он представляет собой потенциальную мишень для противораковых терапевтических средств (см. Kopreski M.S., Benko F.A. и др., "Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum", Ann N Y Acad. Sci. 945, 2001, сс. 172-178). Получали образцы сыворотки у 19 пациентов с запущенным раком молочной железы (5 пациентов) или немелкоклеточным раком легких (14 пациентов) и 25 здоровых контрольных добровольцев с подающимися амплификации уровнями РНК. РНК, экстрагированные из сыворотки, амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР, используя полугнездовые двухстадийные реакции, продукты выявляли с помощью гель-электрофореза. мРНК 5T4 воспроизводимо выявляли в сыворотке 8/19 (42%) пациентов, включая

сыворотку 2/5 пациентов с раком молочной железы и сыворотку 6/14 пациентов с раком легких, но только в 3/25 (12%) образцов контрольной сыворотки здоровых людей ($p=0,035$).

В контексте настоящего изобретения предпочтительная последовательность по меньшей мере одной мРНК, кодирующей антиген 5T4, может содержать кодирующую последовательность, представленную на фиг. 3 (SEQ ID NO: 2), и более предпочтительно последовательность, представленную на фиг. 4 (SEQ ID NO: 3). Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мРНК содержит или состоит из последовательности, представленной на фиг. 1 или 2 (SEQ ID NO: 1 или 19). Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции может альтернативно этому кодировать антиген 5T4, выбранный из фрагмента, варианта или эпитопа 5T4, где по меньшей мере одна мРНК содержит фрагмент или вариант последовательности, представленной на любой из фиг. 1, 2, 3 или 4 (SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 19).

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК предпочтительно содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 28 (SEQ ID NO: 75), или ее фрагмент, вариант или эпитоп.

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК в композиции кодирует сурвивин. "Сурвивин" представляет собой белок, содержащий бакуловиральный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов 5 (сурвивин). Сурвивин описан у Grube, Moritz и др. (2007) (см. Grube M., Moritz S. и др., "CD8+ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma", Clin. Cancer. Res. 13(3), 2007, сс. 1053-1060). Сурвивин является представителем семейства ингибиторов апоптоза, и он сверхэкспрессируется в различных типах злокачественных новообразований. Цитотоксические Т-клетки, которые распознают эпитопы сурвивина, могут образовываться *in vitro* и с помощью вакцинации пациентов, страдающих лейкозом, раком молочной железы и меланомой. Исследовали наличие сурвивинспецифических CD8⁺-Т-клеток у пациентов с множественной миеломой, и Т-клетки, распознающие HLA-A2.1-связывающий пептид сурвивина, обнаружены у 9 из 23 пациентов и 1 из 21 здорового добровольца. Сурвивинреактивные Т-клетки идентифицированы как окончательно (полностью) дифференцированные эффекторные Т-клетки (CD8+, CD45RA+ и CCR7-). Позитивная реакция в отношении экспрессии сурвивина в клетках миеломы в образцах костного мозга обнаружена у 7 из 11 пациентов. Высокий уровень экспрессии сурвивина обнаружен в большинстве человеческих раковых клеток эпителиального и гематопоезического происхождения, и его сверхэкспрессия ассоциирована с прогрессированием рака, неблагоприятным прогнозом, устойчивостью и коротким временем выживания пациента. Duffy, O'Donovan (2007) описали, что сурвивин представляет собой имеющий молекулярную массу 16,5 кДа белок, сверхэкспрессирующийся практически при всех злокачественных новообразованиях, но редко обнаруживаемый в здоровых дифференцированных тканях взрослых (см. Duffy M.J., O'Donovan N. и др., "Survivin: a promising tumor biomarker", Cancer. Lett. 249(1), 2007, сс. 49-60). Установлено, что функционально сурвивин ингибирует апоптоз, усиливает клеточную пролиферацию и повышает ангиогенез. Описано, что в соответствии с его ролью в указанных процессах сурвивин имеет важное значение для прогрессирования рака. Из-за большого различия в экспрессии в здоровой и злокачественной ткани и его решающей ролью в прогрессировании рака сурвивин в настоящее время подвергается интенсивному исследованию в качестве потенциального маркера опухолей. Полученные данные позволили предположить, что измерение уровней сурвивина может способствовать ранней диагностике рака мочевого пузыря, определению прогноза при множестве типов рака и прогнозированию ответа на различные противораковые терапии. Zeis, Siegel и др. (2003) продемонстрировали, что человеческие сурвивинспецифические ЦТЛ (цитотоксические лимфоциты), образовавшиеся из РВМС путем стимуляции аутологичными дендритными клетками, трансфектированными РНК сурвивина, обладали цитотоксическим действием в отношении ряда гематопоезических линий злокачественных клеток и клеток первичных опухолей, выделенных из пациентов с острым миелоидным лейкозом (см. Zeis M., Siegel S. и др., "Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells", J. Immunol. 170(11), 2003, сс. 5391-5397). Продemonстрировано также, что вакцинация мышей трансфектированными кодирующей сурвивин РНК дендритными клетками приводила к пролонгированной устойчивости к контрольному заражению экспрессирующей сурвивин лимфомой, что демонстрирует потенциал сурвивина в качестве Ag, связанного с отторжением опухоли.

В контексте настоящего изобретения предпочтительная последовательность по меньшей мере одной мРНК, кодирующей сурвивин, может содержать кодирующую последовательность, представленную на фиг. 7 (SEQ ID NO: 5), и более предпочтительно последовательность, представленную на фиг. 8 (SEQ ID NO: 6). Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мРНК содержит или состоит из последовательности, представленной на фиг. 5 или 6 (SEQ ID NO: 4 или 20). Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции может альтернативно этому кодировать антиген сурвивина, выбранный из фрагмента, варианта или эпитопа сурвивина, где по меньшей мере одна мРНК содержит фрагмент или вариант последовательности, представленной на любой из фиг. 5, 6, 7 или 8 (SEQ ID NO: 4, 5, 6 или 20).

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК предпочтительно содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 29 или 30 (SEQ ID NO: 76 или

77), или ее фрагмент, вариант или эпитоп.

Кроме того, по меньшей мере одна мПНК в композиции кодирует NY-ESO-1. "NY-ESO-1" представляет собой раково-тестикулярный антиген 1B. Chen, Scanlan и др. (1997) описали определение с помощью ОТ-ПЦР экспрессии мПНК NY-ESO-1 в различных человеческих опухолях, установив ее встречаемость при меланоме в 23 случаев из 67 (23/67), при раке яичника 2/8, раке молочной железы 10/33, раке щитовидной железы 2/5, раке предстательной железы 4/16, раке мочевого пузыря 4/5, раке ободочной кишки 0/16, лимфоме Беркитта 1/2, глиоме 0/15, базальноклеточной карциноме 0/2, раке желудка 0/12, лейомиосаркоме 0/2, раке легких 2/12, других саркомах 0/2, раке почки 0/10, раке поджелудочной железы 0/2, лимфоме 0/10, семиноме 0/1, гепатоме 2/7, опухоли спинного мозга 0/1 (см. Chen Y.T., Scanlan M.J. и др., "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(5), 1997, сс. 1914-1918). Jager, Karbach и др. (2006) описали, что NY-ESO-1 представляет собой раково-тестикулярный антиген, экспрессируемый при широком спектре человеческих злокачественных новообразований, и описали разработку нескольких стратегий на основе вакцин, направленных против NY-ESO-1 (см. Jager E., Karbach J. и др., "Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(39), 2006, сс. 14453-14458). В указанном исследовании анализировали безопасность и иммуногенность рекомбинантного вируса коровьей оспы-NY-ESO-1 и рекомбинантного вируса куриной оспы-NY-ESO-1 на группах из 36 пациентов с целым рядом различных типов опухолей. Каждую конструкцию сначала тестировали индивидуально при двух различных уровнях доз и затем согласно "прайм-буст" протоколу с использованием рекомбинантного вируса коровьей оспы-NY-ESO-1, а затем рекомбинантного вируса куриной оспы-NY-ESO-1. Вакцины хорошо переносились как при индивидуальном, так и при совместном применении. Специфические в отношении NY-ESO-1 гуморальные иммунные ответы/или специфические CD8- и CD4-Т-клеточные ответы против широкого спектра эпитопов NY-ESO-1 индуцировались в процессе по меньшей мере четырех вакцинаций с месячными интервалами у большей части пациентов. Установлено, что клоны CD8-Т-клеток, полученные из пяти вакцинированных пациентов, лизировали экспрессирующие NY-ESO-1 клетки меланомы-мишени. У нескольких пациентов с меланомой обнаружено сильное проявление, при этом вакцинация оказывала благоприятное воздействие на естественное течение болезни. Davis, Chen и др. (2004) описали, что HLA-A2-ограниченные пептиды NY-ESO-1, инъецированные внутривенно, обладали безопасностью и иммуногенностью (Davis I.D., Chen W. и др., "Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(29), 2004, сс. 10697-10702). Хотя указанные опыты планировались только для определения безопасности и иммуногенности, у некоторых пациентов был обнаружен регресс опухолей или стабилизация заболевания. Кроме того, у Jager, Gnjatic и др. (2000) описано, что широкий спектр NY-ESO-1-специфических иммунных ответов, включая ответы в виде образования антител и ответы CD4- и CD8-Т-клеток, обнаружены после иммунизации рекомбинантным белком NY-ESO-1 в сочетании с адъювантом ISCOMATRIX (фирма CSL Ltd., Парквилль, шт. Виктория, Австралия) у пациентов с резецированной экспрессирующей NY-ESO-1 меланомой (см. Jager E., S. Gnjatic и др., "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(22), 2000, сс. 12198-12203). Пролонгированный период выживания без болезни, по-видимому, ассоциирован с указанным иммунным ответом на вакцину. Кроме того, Odunsi, Qian и др. (2007) описали, что вакцинация NY-ESO-1-пептидом индуцировала интегрированный гуморальный и Т-клеточный ответы при раке яичника (см. Odunsi K., Qian F. и др., "Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(31), 2007, сс. 12837-12842).

В контексте настоящего изобретения предпочтительная последовательность по меньшей мере одной мПНК, кодирующей антиген NY-ESO-1, может содержать кодирующую последовательность, представленную на фиг. 11 (SEQ ID NO: 8), и более предпочтительно представленную на фиг. 12 (SEQ ID NO: 9). Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мПНК содержит или состоит из последовательности, представленной на фиг. 9 или 10 (SEQ ID NO: 7 или 21). Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мПНК в композиции может альтернативно этому кодировать антиген NY-ESO-1, выбранный из фрагмента, варианта или эпитопа NY-ESO-1, где по меньшей мере одна мПНК содержит фрагмент или вариант последовательности, представленной на любой из фиг. 9, 10, 11 или 12 (SEQ ID NO: 7, 8, 9 или 21).

Кроме того, по меньшей мере одна мПНК предпочтительно содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 31 (SEQ ID NO: 78), или ее фрагмент, вариант или эпитоп.

Кроме того, по меньшей мере одна мПНК в композиции кодирует MAGE-C1. "MAGE-C1" представляет собой меланомный антиген семейства C, 1. Lucas, De Smet и др. (1998) впервые идентифицировали MAGE-C1 с помощью метода репрезентативного дифференциального анализа (RDA) (см. Lucas S., C. De Smet и др., "Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis", *Cancer. Res.* 58(4), 1998, сс. 743-752). MAGE-C1 не экспрессировался в панели протес-

тированных здоровых тканей за исключением яичек. Из опухолевых образцов MAGE-C1 часто экспрессировался в семиномах, меланомах и карциномах мочевого пузыря. Он экспрессировался также в значительной фракции карцином головы и шеи, карцином молочной железы, немелкоклеточных карцином легких, аденокарцином предстательной железы и сарком. Jungbluth, Chen и др. (2002) описали его экспрессию при раке молочной железы, раке яичника, раке печени, раке яичек, раке мочевого пузыря, меланоме и немелкоклеточном раке легких (39%) (см., Jungbluth A.A., Chen Y.T. и др., "CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues", *Int. J. Cancer*. 99(6), 2002, сс. 839-845). Gure, Chua и др. (2005) проанализировали опухоли у 523 пациентов, страдающих немелкоклеточным раком легких (NSCLC), в отношении экспрессии раково-тестикулярных антигенов (см. Gure A.O., Chua R. и др., "Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer", *Clin. Cancer. Res.* 11(22), 2005, сс. 8055-8062). MAGE-C1 обнаружен у 18,8%. Scanlan, Altorki и др., в 2000 г. описали также экспрессию раково-тестикулярных (CT) антигенов в 33 образцах немелкоклеточного рака легких: MAGE-C1: 30% (см. Scanlan M.J., Altorki N.K. и др., "Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9", *Cancer. Lett.* 150(2), 2000, сс. 155-164).

В контексте настоящего изобретения предпочтительная последовательность по меньшей мере одной мРНК, кодирующей антиген MAGE-C1, может содержать кодирующую последовательность, представленную на фиг. 15 (SEQ ID NO: 11), более предпочтительно последовательность, представленную на фиг. 16 (SEQ ID NO: 12), и наиболее предпочтительно последовательность, представленную на фиг. 17 (SEQ ID NO: 25). Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мРНК содержит или состоит из последовательности, представленной на фиг. 13 или 14 (SEQ ID NO: 10 или 22). Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции может альтернативно этому кодировать антиген MAGE-C1, выбранный из фрагмента, варианта или эпитопа MAGE-C1, где по меньшей мере одна мРНК содержит фрагмент или вариант последовательности, представленной на любой из фиг. 13, 14, 15, 16 или 17 (SEQ ID NO: 10, 11, 12, 22 или 25).

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК предпочтительно содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 32 (SEQ ID NO: 79), или ее фрагмент, вариант или эпитоп.

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК в композиции кодирует MAGE-C2. "MAGE-C2" представляет собой меланомный антиген семейства C2. Lucas, De Plaen и др. (2000) впервые идентифицировали MAGE-C2 путем осуществления RDA (см. Lucas, S., De Plaen E. и др., "MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression", *Int. J. Cancer*. 87(1), 2000, сс. 55-60). MAGE-C2 не экспрессировался в панели протестированных здоровых тканей за исключением яичек. Из опухолевых образцов MAGE-C2 часто экспрессировался в семиномах, меланомах и карциномах мочевого пузыря. Он экспрессировался также в значительной фракции карцином головы и шеи, карцином молочной железы, немелкоклеточных карцином легких, аденокарцином предстательной железы и сарком. Scanlan, Altorki и др. (2000) описали экспрессию CT-антигенов в 33 образцах немелкоклеточного рака легких: MAGE-C2: 30% (см. Scanlan M.J., Altorki N.K. и др., "Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9", *Cancer. Lett.* 150(2), 2000, сс. 155-164).

В контексте настоящего изобретения предпочтительная последовательность по меньшей мере одной мРНК, кодирующей антиген MAGE-C2, может содержать кодирующую последовательность, представленную на фиг. 20 (SEQ ID NO: 14), и более предпочтительно последовательность, представленную на фиг. 21 (SEQ ID NO: 15). Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мРНК содержит или состоит из последовательности, представленной на фиг. 18 или 19 (SEQ ID NO: 13 или 23). Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции может альтернативно этому кодировать антиген MAGE-C2, выбранный из фрагмента, варианта или эпитопа MAGE-C2, где по меньшей мере одна мРНК содержит фрагмент или вариант последовательности, представленной на любой из фиг. 18, 19, 20 или 21 (SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 23).

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК предпочтительно содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 33 (SEQ ID NO: 80), или ее фрагмент, вариант или эпитоп.

И, наконец, по меньшей мере одна мРНК в композиции кодирует также MUC1. "MUC1" обозначает муцин 1. Считается, что ассоциированные с раком муцины ускоряют образование метастазов, облегчая прикрепление злокачественных клеток к поверхности эндотелиальных клеток. Согласно Denda-Nagai и Irimura (2000) (Denda-Nagai K. и Irimura T., "MUC1 in carcinoma-host interactions", *Glycoconj J.* 17(7-9), 2000, сс. 649-658) MUC-1 сверхэкспрессируется в 90% всех аденокарцином, включая аденокарциномы молочной железы, легких, поджелудочной железы, предстательной железы, желудка, ободочной кишки и яичника. Kontani, Taguchi с соавторами (2001) описали, что MUC-1 экспрессируется в 60% образцов рака легких (см. Kontani K., Taguchi O. и др., "Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes", *Br J. Cancer*. 84(9), 2001, сс. 1258-1264), в то время как Kontani, Taguchi и др. (2003) установили в опыте, в котором анализировали применение активированных

антигенами MUC1 ДК (дендритных клеток), для образования клеточного иммунитета при MUC1-позитивных типах рака, что в клинических условиях семь из девяти MUC1-позитивных пациентов реагировали на лечение либо снижением уровней опухолевого маркера, либо исчезновением злокачественной плевральной эффузии (см. Kontani K., Taguchi O. и др., "Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin", *Int. J. Mol. Med.* 12(4), 2003, сс. 493-502). Три из указанных реагирующих на лечение пациентов имели NSCLC. Palmer, Parker и др. (2001) описали данные о безопасности и переносимости, полученные на фазе I клинического испытания с использованием пептида MUC1 на стадии III/IV NSCLC (см. Palmer M., Parker J. и др., "Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage III/IV non-small-cell lung cancer", *Clin. Lung. Cancer.* 3(1), 2001, сс. 49-57; обсуждение 58). Пять из 12 пациентов (42%) давали иммунологические ответы, а у 4 из 12 пациентов (33%) достигалась стабилизация заболевания. Wierecky, Mueller и др. (2006) дополнительно идентифицировали два связывающих HLA-A2 новых 9-мерных пептида TAA MUC1, которые экспрессировались при различных гематологических и эпителиальных злокачественных новообразованиях (см. Wierecky J., Mueller M. и др., "Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1", *Cancer Immunol Immunother* 55(1), 2006, сс. 63-67). Цитотоксические Т-клетки образовавшиеся после активации ДК указанными пептидами, обладали способностью индуцировать лизис опухолевых клеток, экспрессирующих MUC1 в антигенспецифическом и HLA-ограниченном виде. В двух клинических испытаниях продемонстрировано, что вакцинация пациентов с запущенным раком с использованием ДК, активированных полученными из MUC1 пептидами, хорошо переносилась без признаков серьезных побочных действий и могла индуцировать иммунологические ответы. Из 20 пациентов с метастатической почечно-клеточной карциномой у 6 пациентов обнаружен регресс метастазов, что описывалось 3 объективными ответами (1 CR (полный ответ), 2 PR (частичный ответ)).

В контексте настоящего изобретения предпочтительная последовательность по меньшей мере одной мРНК, кодирующей антиген MUC1, может содержать кодирующую последовательность, представленную на фиг. 24 или 36 (SEQ ID NO: 17 или 83), и более предпочтительно последовательность, представленную на фиг. 25 (SEQ ID NO: 18). Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мРНК содержит или состоит из последовательности, представленной на фиг. 22 или 23 (SEQ ID NO: 16 или 24). Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции может альтернативно этому кодировать антиген MUC1, выбранный из фрагмента, варианта или эпитопа MUC1, где по меньшей мере одна мРНК содержит фрагмент или вариант последовательности, представленной на любой из фиг. 22, 24, 25, 23 или 36 (SEQ ID NO: 16, 17, 18, 24 или 83).

Кроме того, по меньшей мере одна мРНК предпочтительно содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 34 или 35 (SEQ ID NO: 81 или 82), или ее фрагмент, вариант или эпитоп.

Когда в контексте настоящего изобретения ссылка делается на антигены или их фрагменты, эпитопы или варианты, то следует понимать, что ссылка касается антигена или пептида, кодируемого одной или несколькими из последовательностей мРНК, представленных в настоящем изобретении. Кроме того, антигены, антигенные белки или антигенные пептиды, указанные выше, которые кодируются по меньшей мере одной мРНК, входящей в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, могут содержать фрагменты или варианты указанных последовательностей. Такие фрагменты или варианты могут, как правило, содержать область последовательности, имеющую гомологию с последовательностью или с последовательностями одного из указанных выше антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов или с последовательностями кодирующих их нуклеиновых кислот, составляющую по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60%, предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% или даже 97% относительно полной последовательности дикого типа, либо на уровне нуклеиновых кислот, либо на уровне аминокислот.

В контексте настоящего изобретения "фрагменты" антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов могут содержать последовательность антигена, антигенного белка или антигенного пептида, как она определена в настоящем описании, которая касательно ее аминокислотной последовательности (или кодирующей ее молекулы нуклеиновой кислоты) укорочена на N-конце, С-конце и/или внутри последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью исходного (нативного) белка (или кодирующей его молекулой нуклеиновой кислоты). Таким образом, указанное укорочение может иметь место либо на аминокислотном уровне, либо, соответственно, на уровне нуклеиновой кислоты. Следовательно, гомология последовательности применительно к такому фрагменту, как он определен в настоящем описании, предпочтительно может относиться к полному антигену, антигенному белку или антигенному пептиду, как они определены в настоящем описании, или к полной (кодирующей) молекуле нуклеиновой кислоты, указанного антигена, антигенного белка или антигенного пептида.

В контексте настоящего изобретения фрагменты антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов могут содержать также последовательность антигена, антигенного белка или антигенного пептида, указанного выше, которая содержит от примерно 6 до примерно 20 или даже большее количество аминокислот, например, фрагменты, процессированные и презентуемые молекулами ГКГС класса I,

предпочтительно имеют длину от примерно 8 до примерно 10 аминокислот, например 8, 9 или 10 (или даже 6, 7, 11 или 12 аминокислот), или фрагменты, процессированные и презентуемые молекулами ГКГС класса II, предпочтительно состоят примерно из 13 или большего количества аминокислот, например из 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или даже большего количества аминокислот, при этом указанные фрагменты можно выбирать из любой области аминокислотной последовательности. Указанные фрагменты, как правило, распознаются Т-клетками в форме комплекса, состоящего из пептидного фрагмента и молекул ГКГС, т.е. фрагменты, как правило, не распознаются в их нативной форме.

Фрагменты антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанные в настоящем описании, могут содержать также эпитопы указанных антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов. Эпитопы (которые называют также "антигенными детерминантами") в контексте настоящего изобретения, как правило, обозначают фрагменты, локализованные на наружной поверхности (нативных) антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных в настоящем описании, которые состоят предпочтительно из 5-15 аминокислот, более предпочтительно из 5-12 аминокислот, еще более предпочтительно из 6-9 аминокислот, и которые могут распознаваться антителами или В-клеточными рецепторами, т.е. они могут распознаваться в их нативной форме. Указанные эпитопы антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов можно выбирать также из любых указанных в настоящем описании вариантов таких антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов. В этом контексте антигенные детерминанты могут представлять собой конформационные или прерывистые эпитопы, состоящие из сегментов антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных в настоящем описании, которые представляют собой прерывистую аминокислотную последовательность антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных в настоящем описании, но собранную вместе в виде трехмерной структуры, или могут представлять собой непрерывные или линейные эпитопы, которые состоят из одной полипептидной цепи.

"Варианты" антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных выше, могут кодироваться по меньшей мере одной мРНК, которая входит в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, где нуклеиновые кислоты по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует антиген, антигенный белок или антигенный пептид, указанный выше, изменены. Так, можно создавать антиген, антигенный белок или антигенный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая отличается от исходной последовательности одной мутацией или несколькими мутациями, например, одной или несколькими замененной(ыми), встроенной(ыми) и/или удаленной(ыми) путем делеции аминокислотой(ами). Предпочтительно эти фрагменты и/или варианты имеют такую же биологическую функцию или специфическую активность, что и полноразмерный нативный антиген, антигенный белок или антигенный пептид, например, присущие ему антигенные свойства.

По меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в изобретении, может кодировать также антиген или антигенный белок, указанный выше, в котором кодируемая аминокислотная последовательность содержит консервативную(ые) аминокислотную(ые) замену(ы) относительно ее встречающейся в физиологических условиях последовательности. Эти аминокислотные последовательности, а также кодирующие их нуклеотидные последовательности подпадают под понятие вариантов, указанных в настоящем описании. Замены, при осуществлении которых аминокислоты, относящиеся к одному и тому же классу, заменяют друг на друга, называют консервативными заменами. В частности, они представляют собой аминокислоты, которые имеют алифатические боковые цепи, положительно или отрицательно заряженные боковые цепи, ароматические группы в боковых цепях или аминокислоты, боковые цепи которых могут входить в водородные мостики, например боковые цепи которых имеют гидроксильную функцию. Это означает, что, например, аминокислоту, имеющую полярную боковую цепь, заменяют на другую аминокислоту, имеющую аналогичную полярную боковую цепь, или, например, аминокислоту, характеризующуюся гидрофобной боковой цепью, заменяют на другую аминокислоту, которая имеет аналогичную гидрофобную боковую цепь (например) серин (треонин) на треонин (серин) или лейцин (изолейцин) на изолейцин (лейцин)). Возможны inserции или замены, в частности, в тех положениях в последовательности, которые не приводят к модификации трехмерной структуры или не влияют на связывающую область. Модификации трехмерной структуры, полученные путем inserции(ий) или делеции(ий), можно легко определять с помощью, например CD-спектров (спектры циркулярного дихроизма) (Urry, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, в: Modern Physical Methods in Biochemistry, под ред. Neuberger и др., изд-во Elsevier, Amsterdam).

Кроме того, варианты антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных выше, которые могут кодироваться по меньшей мере одной мРНК, которая входит в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, могут включать также такие последовательности, в которых нуклеиновые кислоты по меньшей мере одной мРНК изменены в результате вырожденности генетического кода, что не приводит к изменению соответствующей аминокислотной последовательности антигена, антигенного белка или антигенного пептида, т.е. аминокислотная последовательность или по меньшей мере ее часть может не отличаться одной или несколькими мутацией(ями) от исходной последовательности, как она определена выше.

Кроме того, варианты антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных выше,

которые могут кодироваться по меньшей мере одной мРНК, которая входит в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, могут содержать также такие ДНК-последовательности, которые соответствуют РНК-последовательностям, указанным в настоящем описании, и содержат также РНК-последовательности, которые соответствуют ДНК-последовательностям, указанным в настоящем описании. Специалисту в данной области известно, как осуществлять трансляцию РНК-последовательности в ДНК-последовательность (или наоборот) или создавать последовательность комплементарной цепи (т.е. путем замены U-остатков на Т-остатки и/или путем конструирования цепи, комплементарной относительно данной последовательности).

Для определения процента идентичности двух последовательностей (нуклеотидных последовательностей, например последовательностей РНК или мРНК, указанных в настоящем описании, или аминокислотных последовательностей, предпочтительно кодируемых ими аминокислотных последовательностей, например аминокислотных последовательностей антигенов, антигенных белков или антигенных пептидов, указанных выше) последовательности можно выравнивать для последующего сравнения друг с другом. Для этого, например, можно встраивать бреши в последовательность первой последовательности и компонент в соответствующем положении второй последовательности можно сравнивать. Если положение в первой последовательности занято тем же компонентом, который находится в этом положении во второй последовательности, то две последовательности являются идентичными в этом положении. Процент идентичности двух последовательностей является функцией количества идентичных положений, деленной на общее количество положений. Процент идентичности двух последовательностей можно определять с помощью математического алгоритма.

Предпочтительным примером математического алгоритма, который можно применять, является (но не ограничиваясь только им) алгоритм, предложенный Karlin и др., PNAS USA, 90, 1993, сс. 5873-5877 или Altschul и др., Nucleic Acids Res., 25, 1997, сс. 3389-3402. Указанный алгоритм входит в программу BLAST. С помощью этой программы можно идентифицировать последовательности, обладающие конкретной степенью идентичности с последовательностями, предлагаемыми в настоящем изобретении.

В контексте настоящего описания понятие "композиция" относится по меньшей мере к одной мРНК и необязательно дополнительным эксципиентам. Таким образом, понятие "композиция" включает любую смесь мРНК (виды мРНК), кодирующих указанные выше антигены, вне зависимости от того, являются ли мРНК моно-, би- или полицистронными. Согласно настоящему изобретению понятие "композиция" относится также к варианту осуществления изобретения, включающему полицистронную мРНК, которая кодирует все шесть антигенов, указанных выше. Предпочтительно композиция содержит по меньшей мере шесть различных видов мРНК, где каждый вид мРНК кодирует один из указанных выше антигенов. Понятие "композиция" предпочтительно относится по меньшей мере к одной мРНК в сочетании по меньшей мере с одной другой пригодной субстанцией. Как правило, композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, созданную для применения в области медицины. Таким образом, композиция, как правило, содержит по меньшей мере один дополнительный эксципиент, который является фармацевтически приемлемым и который можно выбирать, например, из носителей, наполнителей и т.п. "Композиция" может представлять собой жидкую или сухую композицию. Если композиция является жидкой, то она предпочтительно представляет собой водный раствор или дисперсию по меньшей мере одной мРНК. Если "композиция" представляет собой сухую композицию, то она, как правило, представляет собой лиофилизированную композицию по меньшей мере одной мРНК. Понятие "композиция" в контексте настоящего описания относится также по меньшей мере к одной мРНК, предлагаемой в изобретении, в комбинации с дополнительным действующим веществом. Предпочтительно композиция представляет собой иммуностимулирующую композицию, т.е. композицию, содержащую по меньшей мере один компонент, который может индуцировать иммунный ответ или из которого может образовываться компонент, который может индуцировать иммунный ответ. В этом контексте иммунный ответ может являться результатом активности адаптивной и/или врожденной иммунной системы.

Композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере одну мРНК, кодирующую по меньшей мере шесть антигенов, указанных выше, поскольку установлено, что конкретная комбинация указанных антигенов обладает способностью эффективно стимулировать (адаптивную) иммунную систему, что позволяет лечить рак легких, предпочтительно немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

В целом, задача, положенная в основу изобретения, решается созданием композиции, содержащей по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует новую комбинацию указанных в настоящем описании антигенов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть антигенов (ST4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), сурвивин (белок 5, содержащий бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов; BIRC5), NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, CTAG1B), MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1), MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2) и MUC1 (муцин 1)), которые кодируются шестью моноцистронными мРНК, каждая из указанных мРНК кодирует отдельный антиген, выбранный из указанной группы антигенов. Альтернативно этому композиция может содержать комбинацию моноцистронных, би- и/или полицистронных

мРНК, при этом более одного из шести антигенов кодируется би- и/или полицистронной мРНК. Согласно изобретению рассматривается любая комбинация моно-, би- или полицистронных мРНК, которая кодирует все шесть антигенов, указанных в настоящем описании, например, три бицистронных мРНК, каждая из которых кодирует два из указанных выше шести антигенов, или две бицистронных и две моноцистронных мРНК.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, которая содержит по меньшей мере одну кодирующую последовательность, выбранную из последовательностей РНК, которые идентичны или по меньшей мере на 80% идентичны последовательности РНК, представленной в SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 14 или 17. Еще более предпочтительно композиция содержит шесть мРНК, где кодирующая последовательность каждой мРНК идентична или по меньшей мере на 80% идентична одной из последовательностей РНК, представленных в SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 14 и 17.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения каждый по меньшей мере из шести антигенов композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может кодироваться одной (моноцистронной) мРНК. Другими словами, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать шесть (моноцистронных) мРНК, где каждая из указанных шести (моноцистронных) мРНК может кодировать только один указанный выше антиген.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, где одна мРНК кодирует 5T4 (соответствует SEQ ID NO: 75), одна мРНК кодирует сурвивин (соответствует SEQ ID NO: 76 или 77), одна мРНК кодирует NY-ESO-1 (соответствует SEQ ID NO: 78), одна мРНК кодирует MAGE-C1 (соответствует SEQ ID NO: 79), одна мРНК кодирует MAGE-C2 (соответствует SEQ ID NO: 80) и одна мРНК кодирует MUC1 (соответствует SEQ ID NO: 81 или 82) или их фрагменты или варианты соответственно.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, где одна мРНК кодирует 5T4 и содержит кодирующую последовательность, идентичную или по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 2, одна мРНК кодирует сурвивин и содержит кодирующую последовательность, идентичную или по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 5, одна мРНК кодирует NY-ESO-1 и содержит кодирующую последовательность, идентичную или по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 8, одна мРНК кодирует MAGE-C1 и содержит кодирующую последовательность, идентичную или по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 11, одна мРНК кодирует MAGE-C2 и содержит кодирующую последовательность, идентичную или по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 14, и одна мРНК кодирует MUC1 и содержит кодирующую последовательность, идентичную или по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 17 (или фрагменты или варианты каждой из указанных последовательностей), и необязательно дополнительно содержит эксципиенты.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, где одна мРНК кодирует 5T4 и содержит кодирующую последовательность SEQ ID NO: 2, одна мРНК кодирует сурвивин и содержит кодирующую последовательность SEQ ID NO: 5, одна мРНК кодирует NY-ESO-1 и содержит кодирующую последовательность SEQ ID NO: 8, одна мРНК кодирует MAGE-C1 и содержит кодирующую последовательность SEQ ID NO: 11, одна мРНК кодирует MAGE-C2 и содержит кодирующую последовательность SEQ ID NO: 14 и одна мРНК кодирует MUC1 и содержит кодирующую последовательность SEQ ID NO: 17 или их фрагменты соответственно.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции содержит гистоновую структуру типа "стебель-петля" в 3'UTR-области. Предпочтительно композиция содержит шесть мРНК, где каждая мРНК содержит гистоновую структуру типа "стебель-петля", указанную выше.

Согласно другому наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать (по меньшей мере) одну би- или даже полицистронную мРНК, т.е. (по меньшей мере) одну мРНК, которая несет кодирующие последовательности двух или большего количества антигенов, предлагаемых в изобретении. Указанные кодирующие последовательности двух или большего количества антигенов (по меньшей мере) одной би- или даже полицистронной мРНК, могут разделяться по меньшей мере одной последовательностью IRES (участок внутренней посадки (связывания) рибосомы), указанной ниже. Таким образом, понятие "кодирует два или большее количество антигенов" может означать (но не ограничиваясь только ими), что (по меньшей мере) одна (би- или даже полицистронная) мРНК может кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть (предпочтительно различных) антигенов из упомянутых выше антигенов или их фрагментов или вариантов, которые подпадают под указанные выше определения. Более предпочтительно (но не ограничиваясь только ими) (по меньшей мере) одна (би- или даже полицистронная) мРНК может кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть (предпочтительно различных) антигенов из упомянутых выше антигенов или их фрагментов или вариантов, которые подпадают под указанные выше определения. В этом контексте так называемая последовательность IRES (участок внутренней посадки (связывания) рибосомы), указанная выше, может функционировать в качестве един-

2'-азидо-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфат).

По меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может дополнительно или альтернативно вышесказанному содержать также по меньшей мере одну модификацию основания, которая предпочтительно может повышать уровень экспрессии кодируемого белка по сравнению с неизменной, т.е. встречающейся в естественных условиях (нативной) последовательностью мРНК. В этом случае существенным является повышение уровня экспрессии белка по сравнению с его экспрессией нативной последовательности мРНК по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30, 40, 50 или 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70, 80, 90% или даже 100% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 150%, 200% или даже на 300% или более. В контексте настоящего изобретения нуклеотид, имеющий такую модификацию основания, предпочтительно выбирают из группы нуклеотидов с модифицированными основаниями, включающей 2-амино-6-хлорпуридинрибозид-5'-трифосфат, 2-аминоаденозин-5'-трифосфат, 2-тиоцитидин-5'-трифосфат, 2-тиоуридин-5'-трифосфат, 4-тиоуридин-5'-трифосфат, 5-аминоаллилцитидин-5'-трифосфат, 5-аминоаллилуридин-5'-трифосфат, 5-бромцитидин-5'-трифосфат, 5-бромгуанидин-5'-трифосфат, 5-йодцитидин-5'-трифосфат, 5-йодуридин-5'-трифосфат, 5-метилцитидин-5'-трифосфат, 5-метилуридин-5'-трифосфат, 6-азацитидин-5'-трифосфат, 6-азауридин-5'-трифосфат, 6-хлорпуридинрибозид-5'-трифосфат, 7-деазааденозин-5'-трифосфат, 7-деазагуанозин-5'-трифосфат, 8-азааденозин-5'-трифосфат, 8-азидоаденозин-5'-трифосфат, бензимидазолрибозид-5'-трифосфат, N1-метиладенозин-5'-трифосфат, N1-метилгуанозин-5'-трифосфат, N6-метиладенозин-5'-трифосфат, O6-метилгуанозин-5'-трифосфат, псевдоуридин-5'-трифосфат или пуромидин-5'-трифосфат, ксантозин-5'-трифосфат. Наиболее предпочтительные нуклеотиды для модификаций оснований выбирают из группы нуклеотидов с модифицированными основаниями, включающей 5-метилцитидин-5'-трифосфат, 7-деазагуанозин-5'-трифосфат, 5-бромцитидин-5'-трифосфат и псевдоуридин-5'-трифосфат.

Согласно другому варианту осуществления изобретения по меньшей мере одну мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно также модифицировать (и предпочтительно стабилизировать) путем интродукции дополнительных модифицированных нуклеотидов, которые содержат модификации в их рибозных остатках или в основаниях. Как правило, по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может содержать любой нативный (встречающийся в естественных условиях) нуклеотид, например, гуанозин, урацил, аденозин и/или цитозин или их аналог. В этом контексте нуклеотидные аналоги определяют как не встречающиеся в естественных условиях варианты встречающихся в естественных условиях нуклеотидов. Таким образом, аналоги представляют собой химически дериватизированные нуклеотиды с не встречающимися в естественных условиях функциональными группами, которые предпочтительно добавляют или изымают путем делеции из встречающегося в естественных условиях нуклеотида или которыми заменяют встречающиеся в естественных условиях функциональные группы нуклеотида. Таким образом, каждый компонент встречающегося в естественных условиях нуклеотида может быть модифицирован, а именно компонент, представляющий собой основание, компонент, представляющий собой сахар (рибозу), и/или фосфатный компонент, образующий каркас (см. выше) последовательности РНК. Аналоги гуанозина, урацила, аденозина и цитозина включают (но не ограничиваясь только ими) любой встречающийся в естественных условиях или не встречающийся в естественных условиях гуанозин, урацил, аденозин, тимидин или цитозин, который был изменен химически, например, ацелированием, метилированием, гидрокселированием и т.д., включая, например, 1-метиладенозин, 1-метилгуанозин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанозин, 2,6-диаминопурин, 2'-амино-2'-дезоксаденозин, 2'-амино-2'-дезоксцитидин, 2'-амино-2'-дезоксигуанозин, 2'-амино-2'-дезоксинуридин, 2-амино-6-хлорпуридинрибозид, 2-аминопуринрибозид, 2'-арааденозин, 2'-арацитидин, 2'-арауридин, 2'-азидо-2'-дезоксаденозин, 2'-азидо-2'-дезоксцитидин, 2'-азидо-2'-дезоксигуанозин, 2'-азидо-2'-дезоксинуридин, 2-хлораденозин, 2'-фтор-2'-дезоксаденозин, 2'-фтор-2'-дезоксцитидин, 2'-фтор-2'-дезоксигуанозин, 2'-фтор-2'-дезоксинуридин, 2'-фтортимидин, 2-метиладенозин, 2-метилгуанозин, 2-метилтио-N6-изопенениладенозин, 2'-О-метил-2-аминоаденозин, 2'-О-метил-2'-дезоксаденозин, 2'-О-метил-2'-дезоксцитидин, 2'-О-метил-2'-дезоксигуанозин, 2'-О-метил-2'-дезоксинуридин, 2'-О-метил-5-метилуридин, 2'-О-метилюридин, 2'-О-метилпсевдоуридин, 2-тиоцитидин, 2-тиоцитозин, 3-метилцитозин, 4-ацетилцитозин, 4-тиоуридин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5,6-дигидроуридин, 5-аминоаллилцитидин, 5-аминоаллилдезоксинуридин, 5-бромгуанидин, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил, 5-хлорарацитозин, 5-фторуридин, 5-йодуридин, 5-метоксикарбонилметилуридин, 5-метоксинуридин, 5-метил-2-тиоуридин, 6-азацитидин, 6-азауридин, 6-хлор-7-деазагуанозин, 6-хлорпуридинрибозид, 6-меркаптогуанозин, 6-метилмеркаптопуридинрибозид, 7-деаза-2'-дезоксигуанозин, 7-деазааденозин, 7-метилгуанозин, 8-азааденозин, 8-бroadенозин, 8-бромгуанозин, 8-меркапторгуанозин, 8-оксогуанозин, бензимидазолрибозид, β-D-маннозилквеозин, дигидроурацил, инозин, N1-метиладенозин, N6-([6-аминогексил]карбамоилметил)аденозин, N6-изопентениладенозин, N6-метиладенозин, N7-метилксантозин, метиловый эфир N-урацил-5-оксиуксусной кислоты, пуромидин, квеозин, урацил-5-оксиуксусная кислота, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, вибутоксозин, ксантозин и ксилоаденозин. Получение таких аналогов известно специалисту в данной области, например описано в US 4373071, US 4401796, US 4415732,

US 4458066, US 4500707, US 4668777, US 4973679, US 5047524, US 5132418, US 5153319, US 5262530 и 5700642. Касательно аналогов, описанных выше, наиболее предпочтительными согласно изобретению могут быть те аналоги, которые повышают иммуногенность мРНК, которая входит в композицию, предлагаемую в изобретении, и/или не взаимодействуют с другой интродуцированной модификацией мРНК.

Согласно конкретному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может содержать липидную модификацию. Такая модифицированная липидами мРНК, как правило, содержит указанную в настоящем описании мРНК, которая кодирует по меньшей мере один из шести антигенов, указанных выше. Такая модифицированная липидами мРНК, как правило, дополнительно содержит по меньшей мере один линкер, ковалентно связанный с указанной мРНК, и по меньшей мере один липид, ковалентно связанный с соответствующим линкером. Альтернативно этому модифицированная липидами мРНК содержит (по меньшей мере одну) мРНК, указанную в настоящем описании, и по меньшей мере один (бифункциональный) липид, ковалентно связанный (без линкера) с указанной мРНК. Согласно третьей альтернативе модифицированная липидами мРНК содержит мРНК, указанную в настоящем описании, по меньшей мере один линкер, ковалентно связанный с указанной мРНК, и по меньшей мере один липид, ковалентно связанный с соответствующим линкером, и также по меньшей мере один (бифункциональный) липид, ковалентно связанный (без линкера) с указанной мРНК.

Липид, содержащийся по меньшей мере в одной мРНК в предлагаемой в изобретении композиции (образующий с ней комплекс или ковалентно связанный)), как правило, представляет собой липид или липофильный фрагмент, который сам является биологически активным. Указанные липиды предпочтительно включают встречающиеся в естественных условиях субстанции или соединения, такие, например, как витамины, например α -токоферол (витамин E), включая RRR- α -токоферол (прежнее название D- α -токоферол), L- α -токоферол, рацемат D,L- α -токоферола, сукцинат витамина E (VES) или витамин A и его производные, например ретиноевая кислота, ретинол, витамин D и его производные, например витамин D, а также его эргостерольные предшественники, витамин E и его производные, витамин K и его производные, например витамин K и родственные хиноны или фитолы, или стероиды, такие как желчные кислоты, например холевая кислота, дезоксихолевая кислота, дегидрохолевая кислота, кортизон, дигоксигенин, тестостерон, холестерин или тиохолестерин. Дополнительные липиды или липофильные фрагменты, подпадающие под объем настоящего изобретения, включают (но не ограничиваясь только ими) полиалкиленгликоли (Oberhauser и др., *Nucl. Acids Res.*, 20, 1992, с. 533), алифатические группы, такие, например, как C₁-C₂₀-алканы, C₁-C₂₀-алкены или C₁-C₂₀-алканольные производные и т.д., такие, например, как додекандиольные, гексадеканольные или ундецильные фрагменты (Saison-Behmoaras и др., *EMBO J.*, 10, 1991, с. 111; Kabanov и др., *FEBS Lett.*, 259, 1990, с. 327; Svinarchuk и др., *Biochimie*, 75, 1993, с. 49), фосфолипиды, такие, например, как фосфатидилглицерин, диацилфосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, дипальмитоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, дигексадецил-гас-глицерин, сфинголипиды, цереброзиды, ганглиозиды или триэтиламмоний-1,2-ди-О-гексадецил-гас-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan и др., *Tetrahedron Lett.*, 36, 1995, с. 3651; Shea и др., *Nucl. Acids Res.*, 18, 1990, с. 3777), полиамины или полиалкиленгликоли, такие, например, как полиэтиленгликоль (ПЭГ) (Manoharan и др., *Nucleosides & Nucleotides*, 14, 1995, с. 969), гексаэтиленгликоль (ГЭГ), пальмитин или пальмитильные фрагменты (Mishra и др., *Biochim. Biophys. Acta*, 1264, 1995, с. 229), октадециламины или гексиламинокарбонилокси холестеринные остатки (Crooke и др., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 1996, с. 923), а также воски, терпены, ациклические углеводороды, фрагменты насыщенных и моно- или полиненасыщенных жирных кислот и т.д.

По меньшей мере одну мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно также стабилизировать для предотвращения расщепления мРНК *in vivo* с помощью нескольких подходов. В данной области известно, что нестабильность и (быстрое) расщепление мРНК или РНК *in vivo*, как правило, может представлять собой серьезную проблему при применении композиций на основе РНК. Такая нестабильность РНК, как правило, связана с расщепляющими РНК ферментами, "РНКазами" (рибонуклеазы), причем загрязнение указанными рибонуклеазами может иногда приводить к полному расщеплению РНК в растворе. Таким образом, имеющее место в естественных условиях расщепление РНК в цитоплазме клеток следует очень точно регулировать и загрязнение РНКазой можно предотвращать с помощью специальной обработки перед применением указанных композиций, в частности с помощью диэтилпирикарбоната (ДЭПК). Из существующего уровня техники известно несколько механизмов защиты от имеющего место в естественных условиях расщепления, которые можно также применять. Например, концевая структура, как правило, имеет решающее значение для мРНК *in vivo*. Например, на 5'-конце встречающихся в естественных условиях мРНК обычно находится структура в виде так называемого "кэпа" (модифицированный гуанозиновый нуклеотид), а на 3'-конце, как правило, находится последовательность, включающая вплоть до 200 аденозиновых нуклеотидов (так называемый поли-А хвост).

Таким образом, по меньшей мере одну мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно стабилизировать для предотвращения расщепления РНКазами путем добавления структуры так называемого "5'-кэпа". Наиболее предпочтительной в этом контексте является m7G(5')ppp

(5'(A,G(5')ppp(5')A или G(5')ppp(5')G в качестве структуры "5'-кэпа". Однако указанную модификацию интродуцируют только, если модификация, например липидная модификация, еще не интродуцирована на 5'-конец мРНК в предлагаемой в изобретении композиции или если модификация не оказывает влияние на иммуногенные свойства (немодифицированной или химически модифицированной) мРНК.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может содержать поли-А-хвост на 3'-конце, как правило, состоящий примерно из 10-200 аденозиновых нуклеотидов, предпочтительно примерно из 10-100 аденозиновых нуклеотидов, более предпочтительно 40-80 аденозиновых нуклеотидов или еще более предпочтительно 50-70 аденозиновых нуклеотидов.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может содержать поли-С-хвост на 3'-конце, как правило, состоящий примерно из 10-200 цитозиновых нуклеотидов, предпочтительно примерно из 10-100 цитозиновых нуклеотидов, более предпочтительно 20-70 цитозиновых нуклеотидов или еще более предпочтительно 20-60 или даже 10-40 цитозиновых нуклеотидов.

По меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, предпочтительно содержит по меньшей мере одну гистоновую структуру типа "стебель-петля". В контексте настоящего изобретения указанную гистоновую структуру типа "стебель-петля" (вне зависимости от того, представляет ли она гистоновую "стебель-петлю" или нет), как правило, получают из генов гистонов, и она содержит внутримолекулярные спаривающиеся основания двух соседних полностью или частично обратных комплементарных последовательностей, которые, таким образом, образуют структуру типа "стебель-петля". Структура типа "стебель-петля" может находиться в одноцепочечной ДНК или, что является наиболее распространенным, в РНК.

В контексте настоящего описания последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" может описываться ее ДНК- или соответствующей РНК-последовательностью. Таким образом, в контексте настоящего описания любая ссылка на последовательности гистоновой структуры типа "стебель-петля", которая в контексте настоящего описания соответствует последовательностям ДНК (например, SEQ ID NO: 38-67 и 71), относится также к соответствующей последовательности РНК. Это относится, в частности, к последовательностям гистоновой структуры типа "стебель-петля", которые содержатся по меньшей мере в одной мРНК, предлагаемой в изобретении. Соответственно, под ссылкой на специфическую последовательность ДНК, которая определяет гистоновую структуру типа "стебель-петля", подпадает также соответствующая последовательность РНК. Эту структуру называют также "шпилькой" или "шпильчатой петлей", и она, как правило, состоит из стебля и (концевой) петли в непрерывной последовательности, при этом стебель образован двумя соседними полностью или частично обратными комплементарными последовательностями, которые разделены короткой последовательностью типа спейсера, образуя петлю структуры типа "стебель-петля". Две соседние полностью или частично обратные комплементарные последовательности можно обозначать, например, как элементы stem1 и stem2 структуры типа "стебель-петля". Структура типа "стебель-петля" образуется в том случае, когда эти две соседние полностью или частично обратные комплементарные последовательности, например элементы stem1 и stem2 структуры типа "стебель-петля", образуют пары оснований друг с другом, что приводит к созданию двухцепочечной нуклеотидной последовательности, содержащей неспаренную петлю в концевой области, которая состоит из короткой последовательности, локализованной между элементами stem1 и stem2 структуры типа "стебель-петля" на непрерывной последовательности. Таким образом, неспаренная петля, как правило, представляет собой область нуклеиновой кислоты, которая не обладает способностью к спариванию оснований с любым из указанных элементов структуры типа "стебель-петля". Образовавшаяся имеющая форму "леденца на палочке" структура представляет собой основной конструктивный элемент многих вторичных структур РНК. Таким образом, образование структуры типа "стебель-петля" зависит от стабильности образовавшихся областей стебля и "петли", при этом первой предпосылкой является, как правило, присутствие последовательности, которая может обладать способностью к обратной укладке на самой себе с формированием спаренной двойной цепи. Стабильность спаренных элементов структуры типа "стебель-петля" определяется длиной, количеством мисмэтчей или выпуклостей, которые она содержит (небольшое количество мисмэтчей, как правило, является допустимым, прежде всего в случае длинной двойной цепи) и составом оснований спаренной области. В контексте настоящего изобретения оптимальная длина петли составляет 3-15 оснований, при этом более предпочтительно длина петли составляет 3-10 оснований, более предпочтительно 3-8, 3-7, 3-6 или еще более предпочтительно 4-5 оснований и наиболее предпочтительно 4 основания. Последовательность, образующая область стебля в гистоновой структуре типа "стебель-петля", как правило, состоит из 5-10 оснований, более предпочтительно 5-8 оснований, при этом предпочтительно по меньшей мере одно из оснований представляет собой мисмэтч, т.е. не представляет собой пару оснований.

В контексте настоящего изобретения гистоновую структуру типа "стебель-петля", как правило, получают из генов гистонов (например, генов из гистоновых семейств H1, H2A, H2B, H3, H4), и она содержит внутримолекулярные спаривающиеся основания двух соседних полностью или частично обратных комплементарных последовательностей, которые образуют, таким образом, структуру типа "стебель-

петля". Как правило, гистоновая 3'UTR структура типа "стебель-петля" представляет собой элемент РНК, участвующий в ядерно-цитоплазматическом транспорте гистоновых мРНК и в регуляции стабильности и эффективности трансляции в цитоплазме. В мРНК гистоновых генов многоклеточных организмов отсутствует полиаденилирование и поли-А-хвост, вместо этого имеет место 3'-концевой процессинг в сайте между высококонсервативной структурой типа "стебель-петля" и богатой пуринами области, состоящей примерно из 20 нуклеотидов, расположенной в прямом направлении (расположенный в прямом направлении гистоновый элемент (HDE)). Гистоновая структура типа "стебель-петля" связывается с помощью имеющего молекулярную массу 31 кДа белка, связывающего структуру типа "стебель-петля" (SLBP, его обозначают также как связывающий гистоновую шпильку белок или НБР). Указанные гистоновые структуры типа "стебель-петля" согласно настоящему изобретению предпочтительно применяют в сочетании с другими элементами и структурами последовательности, которые не встречаются в естественных условиях (т.е. в нетрансформированных живых организмах/клетках) в генах гистонов, но при объединении согласно настоящему изобретению образуют искусственную гетерологичную нуклеиновую кислоту. Таким образом, в настоящем изобретении предложена искусственная (ненативная) комбинация гистоновой структуры типа "стебель-петля" с другими элементами гетерологичной последовательности, которые не присутствуют в генах гистонов или в генах гистонов многоклеточных организмов, и которые выделяют из областей функциональных и/или регуляторных последовательностей (влияющих на транскрипцию и/или трансляцию) генов, кодирующих белки, отличные от гистонов, с достижением обладающих преимуществом эффектов. Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения является комбинация гистоновой структуры типа "стебель-петля" с поли(А)-последовательностью или последовательностью, представляющей собой сигнал полиаденилирования (3'-конец кодирующей области), которая не встречается в генах гистонов многоклеточных организмов. Другим предпочтительным объектом изобретения является комбинация гистоновой структуры типа "стебель-петля" с кодирующей областью, которая кодирует по меньшей мере один из указанных выше антигенов, предлагаемых в изобретении, которая предпочтительно не встречается в генах гистонов многоклеточных организмов (кодирующая область и последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" являются гетерологичными).

Таким образом, гистоновая структура типа "стебель-петля" представляет собой структуру типа "стебель-петля", представленную в настоящем описании, которая предпочтительно обладает определенной функцией, если она обладает/сохраняет способность связываться с ее встречающимся в естественных условиях партнером по связыванию, т.е. белком, связывающим структуру типа "стебель-петля" (SLBP, его обозначают также как связывающий гистоновую шпильку белок или НБР).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" не получают из мышинового гистонного белка. Более конкретно последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" не получают из мышинового гена гистона H2A614. Кроме того, по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, может не содержать ни мышиную последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", ни мышинный ген гистона H2A614. Кроме того, по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, может не содержать сигнал процессинга структуры типа "стебель-петля", более конкретно мышинный сигнал процессинга структуры типа "стебель-петля" и наиболее предпочтительно мышинный сигнал процессинга структуры типа "стебель-петля" H2kA614, даже если по меньшей мере одна мРНК содержит по меньшей мере один ген гистона млекопитающих. Однако по меньшей мере один ген гистона млекопитающих не может иметь последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 в WO 01/12824.

По меньшей мере одна мРНК, указанная выше, может предпочтительно содержать 5'UTR, кодирующую область, которая кодирует указанные выше антигены или их фрагмент, вариант или производное; и/или 3'UTR, предпочтительно содержащую по меньшей мере одну гистоновую структуру типа "стебель-петля". Когда помимо антигенов, указанных выше, дополнительный пептид или белок кодируется по меньшей мере одной мРНК, то кодируемый пептид или белок предпочтительно не представляет собой гистоновый белок, репортерный белок и/или не представляет собой маркерный или селективируемый белок, указанный выше. 3'UTR по меньшей мере одной мРНК предпочтительно содержит также поли(А)- и/или поли(С)-последовательность, указанную в настоящем описании. Сигнальные элементы 3'UTR могут встречаться в ней в любом порядке от 5'-конца к 3'-концу вдоль последовательности по меньшей мере одной мРНК. Кроме того, могут присутствовать также дополнительные элементы, указанные в настоящем описании, такие как указанная в настоящем описании стабилизирующая последовательность (например, полученная из UTR гена глобина), IRES-последовательности и т.д. Каждый из указанных элементов может также повторяться по меньшей мере в одной мРНК, предлагаемой в изобретении, по меньшей мере один раз (прежде всего в би- или полицистронных конструкциях), предпочтительно два или большее количество раз. Например, сигнальные элементы могут присутствовать по меньшей мере в одной мРНК в следующем порядке:

5' - кодирующая область - гистоновая структура "стебель-петля" - поли(А)/(С)-последовательность - 3'; или

5' - кодирующая область - поли(А)/(С)-последовательность - гистоновая структура "стебель-петля" - 3'; или

5' - кодирующая область - гистоновая структура "стебель-петля" - сигнал полиаденилирования - 3';
или

5' - кодирующая область - сигнал полиаденилирования - гистоновая структура "стебель-петля" - 3';
или

5' - кодирующая область - гистоновая структура "стебель-петля" - гистоновая структура "стебель-петля" - поли(A)/(C)-последовательность - 3'; или

5' - кодирующая область - гистоновая структура "стебель-петля" - гистоновая структура "стебель-петля" - сигнал полиаденилирования - 3'; или

5' - кодирующая область - стабилизирующая последовательность - поли(A)/(C)-последовательность - гистоновая структура "стебель-петля" - 3'; или

5' - кодирующая область - стабилизирующая последовательность -поли(A)/(C)-последовательность - поли(A)/(C)-последовательность - гистоновая структура "стебель-петля" - 3' и т.д.

В этом контексте наиболее предпочтительно, если помимо антигенов, указанных выше, по меньшей мере одной мРНК кодируется дополнительный пептид или белок, то кодируемый пептид или белок предпочтительно не представляет собой ни гистоновый белок, ни репортерный белок (например, люциферазу, GFP, EGFP, β -галактозидазу, прежде всего EGFP) и ни маркерный белок или селективируемый белок (например, α -глобин, галактокиназу и ксантин:гуанинфосфорибозилтрансферазу (GPT)).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК, предлагаемая в изобретении, не содержит репортерный ген или маркерный ген. Предпочтительно мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует, например, люциферазу; зеленый флуоресцентный белок (GFP) и его варианты (такие как eGFP, RFP или BFP); α -глобин; гипоксантин:гуанинфосфорибозилтрансферазу (HGPRT); β -галактозидазу; галактокиназу; щелочную фосфатазу; секретируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP)) или ген, обуславливающий устойчивость (такой как ген, обуславливающий устойчивость к неомицину, пурамицину, гиромоцину и зеоцину). В предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует люциферазу. В другом варианте осуществления изобретения мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует GFP или его вариант.

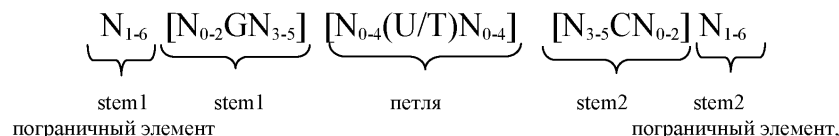
В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует белок (или фрагмент белка), происходящий из вируса, предпочтительно из вируса, принадлежащего к семейству Orthomyxoviridae. Предпочтительно мРНК не кодирует белок, происходящий из вируса гриппа, более предпочтительно вируса гриппа А. Предпочтительно мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует белок вируса гриппа А, выбранный из группы, состоящей из гемагглютинина (HA), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), M1, M2, NS1, NS2 (NEP: белок ядерного экспорта), PA, PB1 (основная полимераз 1), PB1-F2 и PB2. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует овальбумин (OVA) или его фрагмент. Предпочтительно мРНК, предлагаемая в изобретении, не кодирует белок вируса А или овальбумин.

Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, содержит по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", предпочтительно соответствующую по меньшей мере одной из следующих формул (I) или (II):

формула (I) (последовательность структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля)



формула (II) (последовательность структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля)



в которых

пограничные элементы stem1 или stem2 N_{1-6} обозначают непрерывную

последовательность, состоящую из 1-6,

предпочтительно 2-6, более предпочтительно 2-

stem1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$

5, еще более предпочтительно 3-5, наиболее предпочтительно 4-5 или 5 N, где N каждый независимо друг от друга выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или их нуклеотидного аналога;

обозначает последовательность, обратно комплементарную или частично обратно комплементарную элементу stem2, и представляет собой непрерывную последовательность, состоящую из 5-7 нуклеотидов;

в которой N_{0-2} обозначает непрерывную последовательность, состоящую из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N, где N каждый независимо друг от друга выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или его нуклеотидного аналога;

в которой N_{3-5} обозначает непрерывную последовательность, состоящую из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где N каждый независимо друг от друга выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или его нуклеотидного аналога, и в которой G обозначает гуанозин или его аналог и необязательно может быть заменен на цитидин или его аналог при условии, что комплементарный ему нуклеотид цитидин в stem2 заменен на гуанозин;

последовательность петли $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ локализована между элементами stem1 и

stem2 и обозначает непрерывную последовательность, состоящую из 3-5 нуклеотидов, более предпочтительно 4 нуклеотидов;

stem2 [$N_{3-5}CN_{0-2}$]

в которой N_{0-4} каждый независимо друг от друга обозначает непрерывную последовательность, состоящую из 0-4, предпочтительно 1-3, более предпочтительно 1-2 N , где N каждый независимо друг от друга выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или его нуклеотидного аналога; и в которой U/T обозначает уридин или необязательно тимидин;

обозначает последовательность, обратно комплементарную или частично обратно комплементарную элементу stem1, и представляет собой непрерывную последовательность, состоящую из 5-7 нуклеотидов;

в которой N_{3-5} обозначает непрерывную последовательность, состоящую из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N , где N каждый независимо друг от друга выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C или его нуклеотидного аналога;

в которой N_{0-2} обозначает непрерывную последовательность, состоящую из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N , где N каждый независимо друг от друга выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G или C или его нуклеотидного аналога; и в которой C обозначает цитидин или его аналог и необязательно может быть заменен на гуанозин или его аналог при условии, что комплементарный ему нуклеотид гуанозин в stem1 заменен на цитидин;

где у элементов stem1 и stem2 может происходить спаривание оснований друг с другом с образованием обратно комплементарной последовательности, где спаривание оснований может иметь место между stem1 и stem2, например, посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику нуклеотидов A и U/T или G и C, или посредством спаривания оснований не по Уотсону-Крику, например, посредством спаривания "качающихся" оснований ("качающегося" спаривания оснований), обратного спариванию оснований по Уотсону-Крику, посредством хугстиновского спаривания оснований, посредством обратного хугстиновскому спаривания оснований, или у них может происходить спаривание оснований друг с другом с образованием частично обратно комплементарной последовательности, при этом неполное спаривание оснований может иметь место между stem1 и stem2 вследствие того, что для одного или нескольких оснований в одном стебле не имеется комплементарного основания в обратно комплементарной последо-

вательности другого стебля.

В указанном выше контексте спаривание "качающихся" оснований, как правило, представляет собой спаривание оснований не по Уотсону-Крику между двумя нуклеотидами. В контексте настоящего описания четыре основные пары "качающихся" оснований, которые можно применять, представляют собой гуанозин-уридин, инозин-уридин, инозин-аденозин, инозин-цитидин (G-U/T, I-U/T, I-A и I-C) и аденозин-цитидин (A-C).

Таким образом, в контексте настоящего изобретения "качающееся" основание представляет собой основание, которое формирует "качающуюся" пару оснований с другим основанием, как указано выше. Таким образом, спаривание оснований не по Уотсону-Крику, например "качающееся" спаривание оснований, может иметь место в стебле гистоновой структуры типа "стебель-петля" по меньшей мере в одной мРНК, предлагаемой в настоящем изобретении.

В указанном выше контексте частично обратная комплементарная последовательность содержит максимум 2, предпочтительно только один мисмэтч, в структуре стебля последовательности структуры "стебель-петля", образованные(образованное) в результате спаривания оснований элементов stem1 и stem2. Другими словами, stem1 и stem2 предпочтительно обладают способностью к (полному) спариванию оснований друг с другом на всем протяжении полной последовательности stem1 и stem2 (100% от возможных спариваний оснований по Уотсону-Крику или не по Уотсону-Крику), формируя тем самым обратную комплементарную последовательность, где каждое основание имеет правильное соответствующее ему парное по Уотсону-Крику или не по Уотсону-Крику основание в качестве комплементарно связывающего партнера. В альтернативном варианте stem1 и stem2 предпочтительно обладают способностью к спариванию оснований друг с другом на протяжении полной последовательности stem1 и stem2, где по меньшей мере примерно 70, 75, 80, 85, 90 или 95% из 100% от возможных правильных спариваний оснований по Уотсону-Крику или не по Уотсону-Крику соответствуют правильным спариваниям оснований по Уотсону-Крику или не по Уотсону-Крику и максимум примерно 30, 25, 20, 15, 10 или 5% оставшихся оснований остаются неспаренными.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" (с пограничными элементами стебля) по меньшей мере одной мРНК, представленной в настоящем описании, содержит от примерно 15 до примерно 45 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 15 до примерно 40 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 15 до примерно 35 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 15 до примерно 30 нуклеотидов и еще более предпочтительно от примерно 20 до примерно 30 и наиболее предпочтительно от примерно 24 до примерно 28 нуклеотидов.

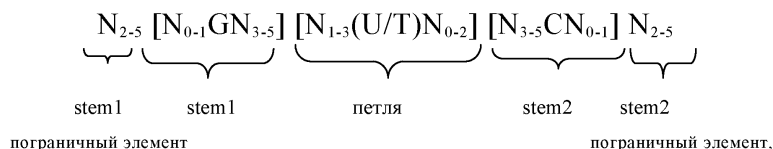
Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" (без пограничных элементов стебля) по меньшей мере одной мРНК, представленной в настоящем описании, содержит от примерно 10 до примерно 30 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 10 до примерно 20 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 12 до примерно 20 нуклеотидов, предпочтительно от примерно 14 до примерно 20 нуклеотидов и еще более предпочтительно от примерно 15 до примерно 17 и наиболее предпочтительно примерно 16 нуклеотидов.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", соответствующую по меньшей мере одной из следующих конкретных формул (Ia) или (IIa):

формула (Ia) (последовательность структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля)



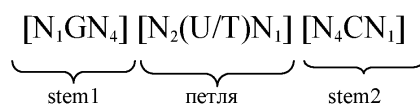
формула (IIa) (последовательность структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля)



в которой N, C, G, T и U имеют указанные выше значения.

Согласно другому более предпочтительному варианту осуществления первого объекта изобретения по меньшей мере одна мРНК может содержать или кодировать по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", соответствующую по меньшей мере одной из следующих конкретных формул (Ib) или (IIb):

формула (Ib) (последовательность структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля)



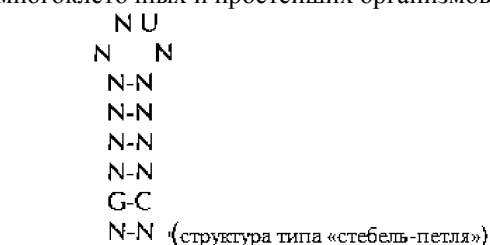
формула (IIb) (последовательность структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля)



в которой N, C, G, T и U имеют указанные выше значения.

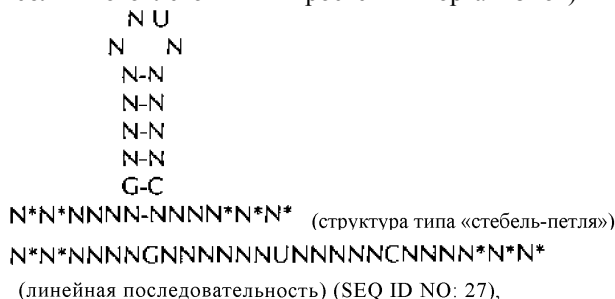
Согласно еще более предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", соответствующую по меньшей мере одной из следующих конкретных формул (Ic)-(Ih) или (IIc)-(IIh), которые являются альтернативными по структуре типа "стебель-петля" и имеют линейную последовательность, соответствующую последовательностям гистоновой структуры типа "стебель-петля":

формула (Ic) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля многоклеточных и простейших организмов)

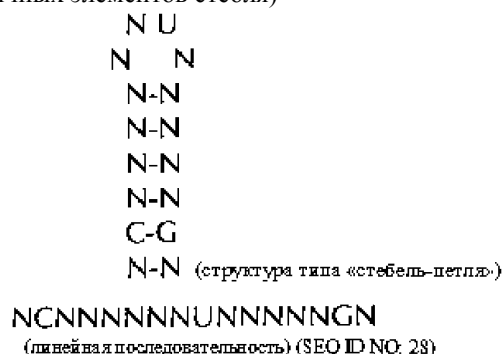


(линейная последовательность) (SEQ ID NO: 26)

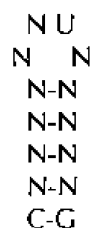
формула (IIc) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля многоклеточных и простейших организмов)



формула (Id) (без пограничных элементов стебля)



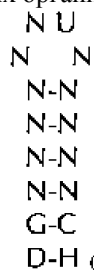
формула (IIId) (с пограничными элементами стебля)



$N^*N^*NNNNN-NNNNN^*N^*N^*$ (структура типа «стебель-петля»)

$N^*N^*NNNNNCNNNNNNUNNNNNNGNNNNN^*N^*N^*$
(линейная последовательность) (SEQ ID NO 29).

формула (Ie) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля простейших организмов)

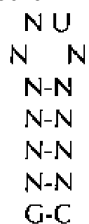


(структура типа «стебель-петля»)

DGNNNNNNUNNNNNCH

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 30)

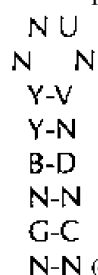
формула (Ie) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля простейших организмов)



$N^*N^*NNND-HNNNN^*N^*N^*$ (структура типа «стебель-петля»)

$N^*N^*NNNDGNNNNNNUNNNNNCHNNNN^*N^*N^*$
(линейная последовательность) (SEQ ID NO 31)

формула (If) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля многоклеточных организмов)



(структура типа «стебель-петля»)

NGNBYYNNUNVNDNCN

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 32)

формула (If) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля многоклеточных организмов)

N U
N N
Y-V
Y-N
B-D
N-N
G-C

N*N*NNNN-NNNN*N*N* (структура типа «стебель-петля»)

N*N*NNNNGNBYYNNUNVNDNCNNNN*N*N*

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 33)

формула (Ig) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля позвоночных животных)

N U
D H
Y-A
Y-B
Y-R
H-D
G-C
N-N (структура типа «стебель-петля»)

NGHYYDNUHABRDCN

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 34)

формула (IIg) (консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля позвоночных животных)

N U
D H
Y-A
Y-B
Y-R
H-D
G-C

N*N*HNNN-NNNN*N*N* (структура типа «стебель-петля»)

N*N*HNNNGHYYDNUHABRDCNNNN*N*N*

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 35)

формула (Ih) (человеческая (Homo sapiens) консенсусная последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" без пограничных элементов стебля)

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C
D-C (структура типа «стебель-петля»)

DGHYCUDYUHASRRCC

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 36)

формула (IIh) (человеческая (Homo sapiens) консенсусная последовательность структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля)

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C

N*N*AAND-CVHB*N*N* (структура типа «стебель-петля»)

N*N*AANDGHYCUDYUHASRRCCVHB*N*N*

(линейная последовательность) (SEQ ID NO 37).

где в каждой из формул (Ic)-(Ih) или (IIc)- (IIh)

N, C, G, A, T и U имеют указанные выше значения;

каждый U можно заменять на T;

каждый (высоко) консервативный G или C в элементах 1 и 2 стебля можно заменять на комплементарное ему нуклеотидное основание C или G при условии, что указанный комплементарный нуклеотид в соответствующем стебле параллельно заменяют на комплементарный ему нуклеотид; и/или G, A, T, U, C, R, Y, M, K, S, W, H, B, V, D и N представляют собой нуклеотидные основания, указанные ниже в таблице

Сокращение	Нуклеотидные основания	Комментарий
G	G	гуанин
A	A	аденин
T	T	тимин
U	U	урацил
C	C	цитозин
R	G или A	пурин
Y	T/U или C	пиримидин
M	A или C	амино
K	G или T/U	кето
S	G или C	сильное (3Н-связи)
W	A или T/U	слабое (2Н-связи)
H	A или C или T/U	не G
B	G или T/U или C	не A
V	G или C или A	не T/U
D	G или A или T/U	не C
N	G или C или T/U или A	любое основание
*	присутствует или нет	основание может присутствовать или не присутствовать

В этом контексте наиболее предпочтительной последовательностью гистоновой структуры типа "стебель-петля", которая соответствует по меньшей мере одной из формул (I), или (Ia)-(Ih), или (II), или (IIa)-(IIh), предлагаемых в настоящем изобретении, является последовательность, выбранная из встречающейся в естественных условиях последовательности гистоновой структуры типа "стебель-петля", более предпочтительно из последовательностей гистоновой структуры типа "стебель-петля" из простейших или многоклеточных организмов и еще более предпочтительно из последовательностей гистоновой структуры типа "стебель-петля" из позвоночных животных и наиболее предпочтительно из последовательностей гистоновой структуры типа "стебель-петля" из млекопитающих, наиболее предпочтительно из человеческих последовательностей гистоновой структуры типа "стебель-петля".

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", которая соответствует по меньшей мере одной из конкретных формул (I), или (Ia)-(Ih), или (II), или (IIa)-(IIh), предлагаемых в настоящем изобретении, представляет собой последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", которая содержит в каждом нуклеотидном положении наиболее часто встречающийся нуклеотид, или либо наиболее часто встречающийся, либо второй по частоте встречаемости в естественных условиях нуклеотид в последовательностях гистоновой структуры типа "стебель-петля" у многоклеточных и простейших организмов, простейших организмов, многоклеточных организмов, позвоночных животных и людей. В этом контексте наиболее предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85% или наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% всех нуклеотидов соответствуют нуклеотидам, наиболее часто встречающимся в естественных условиях в последовательностях гистоновой структуры типа "стебель-петля".

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", которая соответствует по меньшей мере одной из конкретных формул (I) или (Ia)-(Ih), указанных выше, выбирают из представленных ниже последовательностей гистоновой структуры типа "стебель-петля" (без пограничных элементов "стебля")

VGYYYYNNHTHRVRRCB (SEQ ID NO: 38, соответствует формуле (Ic)),

SGYYTTTYTMARRRCS (SEQ ID NO: 39, соответствует формуле (Ic)),

SGYYCTTTTMAGRRCB (SEQ ID NO: 40, соответствует формуле (Ic)),

DGNNNBNNTHVNNNCH (SEQ ID NO: 41, соответствует формуле (Ie)),
 RGNNNYHBTHRDNNCY (SEQ ID NO: 42, соответствует формуле (Ie)),
 RGNDBYHYTHRDHNCY (SEQ ID NO: 43, соответствует формуле (Ie)),

VGYYTYHTHRVRRCB (SEQ ID NO: 44, соответствует формуле formula (If)),
 SGYYCTTYTMAGRRC (SEQ ID NO: 45, соответствует формуле (If)),
 SGYYCTTTTMAGRRC (SEQ ID NO: 46, соответствует формуле (If)),

GGYYCTTYTHAGRRC (SEQ ID NO: 47, соответствует формуле (Ig)),
 GGCYCTTYTMAGRCC (SEQ ID NO: 48, соответствует формуле (Ig)),
 GGCTCTTTTMAGRCC (SEQ ID NO: 49, соответствует формуле (Ig)),

DGHYCTDYTHASRRC (SEQ ID NO: 50, соответствует формуле (Ih)),
 GGCYCTTTTHAGRCC (SEQ ID NO: 51, соответствует формуле (Ih)),
 GGCYCTTTTMAGRCC (SEQ ID NO: 52, соответствует формуле (Ih)).

Кроме того, в этом контексте наиболее предпочтительными являются следующие последовательности гистоновой структуры типа "стебель-петля" (с пограничными элементами стебля), соответствующие одной из конкретных формул (II) или (IIa)-(IIh):

H*N*HHVVGYYYYHHTHRVRRCBVHH*N*N* (SEQ ID NO: 53, соответствует формуле (IIc)),

M*N*MHMSGYYTYTMARRRCSMCH*N*N* (SEQ ID NO: 54, соответствует формуле (IIc)),

M*M*MMMSGYYCTTTTMAGRRCACH*M*N* (SEQ ID NO: 55, соответствует формуле (IIc)),

N*N*NNNDGNNNBNNTHVNNNCHNHN*N*N* (SEQ ID NO: 56, соответствует формуле (IIe)),

N*N*HHNRGNNNYHBTHRDNNCYDHH*N*N* (SEQ ID NO: 57, соответствует формуле (IIe)),

N*N*HHVRGNDBYHYTHRDHNCYRHH*N*N* (SEQ ID NO: 58, соответствует формуле (IIe)),

H*N*MHMVGYYTYHTHRVRRCBVMH*N*N* (SEQ ID NO: 59, соответствует формуле (If)),

M*M*MMMSGYYCTTYTMAGRRCMCH*N*N* (SEQ ID NO: 60, соответствует формуле (If)),

M*M*MMMSGYYCTTTMAGRRCACH*M*N* (SEQ ID NO: 61, соответствует формуле (If)),

H*N*MAMGGYYCTTYTHAGRRCVHN*N*M* (SEQ ID NO: 62, соответствует формуле (Ig)),

H*N*AAMGGCYCTTYTMAGRCCVCH*N*M* (SEQ ID NO: 63, соответствует формуле (Ig)),

M*M*AAMGGCTCTTTMAGRCCMCY*M*M* (SEQ ID NO: 64, соответствует формуле (Ig)),

N*N*AAHDGHYCTDYTHASRRCCVHB*N*N* (SEQ ID NO: 65, соответствует формуле (Ih)),

H*N*AAMGGCYCTTTTHAGRCCVMY*N*M* (SEQ ID NO: 66, соответствует формуле (Ih)),

H*M*AAAGGCYCTTTMAGRCCRMV*N*M* (SEQ ID NO: 67, соответствует формуле (Ih)).

Согласно дополнительному предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", последовательность которой идентична по меньшей мере примерно на 80%, предпочтительно по меньшей мере примерно на 85%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 90% или даже более предпочтительно по меньшей мере примерно на 95% последовательности, содержащей не более 100% консервативных нуклеотидов в последовательностях гистоновой структуры типа "стебель-петля", соответствующих по меньшей мере одной из конкретных формул (I), или (Ia)-(Ih), или (II), или (IIa)-(IIh), или встречающейся в естественных условиях последовательности гистоновой структуры типа "стебель-петля".

Наиболее предпочтительной последовательностью гистоновой структуры типа "стебель-петля" является последовательность, представленная в SEQ ID NO: 71 CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA, или более предпочтительно соответствующая последовательность РНК, имеющая нуклеотидную последовательность, которая соответствует SEQ ID NO: 71 CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA (SEQ ID NO: 72).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля" не содержит последовательность петли 5'-UUUC-3'. Более конкретно гистоновая структура типа "стебель-петля" не содержит последовательность элемента stem1 5'-GGCUCU-3' и/или последовательность элемента stem2 5'-AGAGCC-3' соответственно. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения последовательность структуры типа "стебель-петля" не содержит последовательность петли 5'-CCUGCCC-3' или последовательность петли 5'-UGAAU-3'. Более конкретно структура типа "стебель-петля" не содержит последовательность stem1 5'-CCUGAGC-3' или не содержит последовательность stem1 5'-ACCUUUCUCCA-3' и/или последовательность stem2 5'-GCUCAGG-3' или 5'-UGGAGAAAGGU-3' соответственно. Кроме того, последовательности структуры типа "стебель-петля" предпочтительно не имеют происхождения из 3'-нетранслируемой области рецептора инсулина млекопитающих. Предпочтительно также по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, может не содержать сигнал процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля", в частности сигнал процессинга, имеющий происхождение из мышинового гена гистона H2A614 (H2kA614).

Предпочтительно по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, не содержит один или два, или по меньшей мере один или все, кроме одного, или все компоненты, выбранные из группы, включающей: последовательность, которая кодирует рибозим (предпочтительно обладающий способностью к автономному сплайсингу рибозим), вирусную нуклеотидную последовательность, сигнал процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля", в частности сигнал процес-

синга гистоновой структуры типа "стебель-петля", происходящий из мышинового гена гистона H2A614, ген Neo, инактивированную промоторную последовательность и инактивированную энхансерную последовательность. Еще более предпочтительно по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, не содержит рибозим, предпочтительно обладающий способностью к автономному сплайсингу рибозим, и один или несколько компонентов, выбранных из группы, включающей: ген Neo, инактивированную промоторную последовательность и инактивированную энхансерную последовательность, сигнал процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля", в частности сигнал процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля", происходящий из мышинового гена гистона H2A614.

Таким образом, мРНК в предпочтительном варианте не содержит ни рибозим, предпочтительно обладающий способностью к автономному сплайсингу рибозим, ни ген Neo, или в альтернативном варианте не содержит ни рибозим, предпочтительно обладающий способностью к автономному сплайсингу рибозим, ни какой-либо ген, обуславливающий устойчивость (например, обычно применяемый для селекции). В другом предпочтительном варианте по меньшей мере одна мРНК, предлагаемая в изобретении, может не содержать рибозим, предпочтительно обладающий способностью к автономному сплайсингу рибозим, ни сигнал процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля", в частности сигнал процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля", происходящий из мышинового гена гистона H2A614.

Альтернативно этому, по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в изобретении, необязательно содержит сигнал полиаденилирования, указанный в настоящем описании, представляющий собой сигнал, который обеспечивает полиаденилирование (транскрибируемой) мРНК посредством специфических белковых факторов (такой, например, как специфический фактор расщепления и полиаденилирования (CPSF), стимулирующий расщепление фактор (CstF), факторы расщепления I и II (CF I и CF II), поли(А)-полимераза (PAP)). В этом контексте консенсусный сигнал полиаденилирования предпочтительно содержит консенсусную последовательность NN(U/T)ANA. В наиболее предпочтительном объекте изобретения сигнал полиаденилирования содержит следующие последовательности: AA(U/T)AAA или A(U/T)(U/T)AAA (в которых уридин, как правило, присутствует в РНК, а тимидин, как правило, присутствует в ДНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнал полиаденилирования, применяемый по меньшей мере в одной мРНК, предлагаемой в изобретении, не соответствует мРНК U3, U5, сигналу процессинга полиаденилирования из человеческого гена G-CSF или последовательностям сигналов полиаденилирования из SV40. В частности, указанные выше сигналы полиаденилирования не объединяют с каким-либо геном, обуславливающим устойчивость к антибиотикам (или любым другим репортерным, маркерным или селектирующим геном), в частности не объединяют с обуславливающим устойчивость геном нео (неомицинфосфотрансфераза). Кроме того, по меньшей мере в одной мРНК, предлагаемой в изобретении, не объединяют любой из указанных выше сигналов полиаденилирования предпочтительно с гистоновой структурой типа "стебель-петля" или с сигналом процессинга гистоновой структуры типа "стебель-петля" из мышинового гена гистона H2A614.

Согласно другому варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может быть модифицирована и тем самым стабилизирована путем модификации содержания G/C в мРНК, предпочтительно в кодирующей области по меньшей мере одной мРНК.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения содержание G/C в кодирующей области по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, модифицируют, прежде всего, повышают по сравнению с содержанием G/C в кодирующей области соответствующей ей мРНК дикого типа, т.е. немодифицированной мРНК. Аминокислотную последовательность, кодируемую по меньшей мере одной мРНК, предпочтительно не модифицируют по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой конкретной мРНК дикого типа. Указанная модификация по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, основана на том факте, что последовательность любой области мРНК, подлежащей трансляции, является важной для эффективной трансляции указанной мРНК. Таким образом, важными являются состав и последовательность различных нуклеотидов. В частности, последовательности, имеющие повышенное содержание G (гуанозин)/C (цитозин), являются более стабильными, чем последовательности, имеющие повышенное содержание A (аденозин)/U (урацил). Согласно изобретению кодоны мРНК изменяют по сравнению с соответствующей ей мРНК дикого типа таким образом, чтобы они содержали большее количество G/C-нуклеотидов, с сохранением транслируемой аминокислотной последовательности. Учитывая тот факт, что несколько кодонов кодируют одну и ту же аминокислоту (так называемая вырожденность генетического кода), можно определять наиболее предпочтительные с точки зрения стабильности кодоны (так называемые альтернативные наиболее часто встречающиеся кодоны). В зависимости от аминокислоты, кодируемой по меньшей мере одной мРНК, существуют различные возможности модификации последовательности мРНК по сравнению с ее последовательностью дикого типа. В случае аминокислот, которые кодируются кодонами, содержащими исключительно нуклеотиды G или C, никакая модификация кодона не является необходимой. Так, кодоны Pro (CCC или CCG), Arg (CGC или CGG), Ala (GCC или GCG) и Gly (GGC или GGG) не нуждаются в модификации, поскольку в них не присутствует A или U. В противоположность этому кодоны, которые содержат нуклеотиды A и/или U, можно

модифицировать путем замены на другие кодоны, которые кодируют эти же аминокислоты, но не содержат А и/или U. Примерами таких замен являются кодоны CCU или CCA, кодирующие Pro, заменяют на CCC или CCG, кодоны CGU, или CGA, или AGA, или AGG, кодирующие Arg, заменяют на CGC или CGG, кодоны GCU или GCA, кодирующие Ala, заменяют на GCC или GCG, кодоны GGU или GGA, кодирующие Gly, заменяют на GGC или GGG. В других случаях, когда нуклеотиды А или U нельзя элиминировать из кодонов, можно снижать содержание А и U с использованием кодонов, которые содержат нуклеотиды А и/или U в более низком количестве. Примерами указанных кодонов являются: кодон UUU, кодирующий Phe, заменяют на UUC, кодоны UUA, UUG, CUU или CUA, кодирующие Leu, заменяют на CUC или CUG, кодоны UCU, или UCA, или AGU, кодирующие Ser, заменяют на UCC, UCG или AGC, кодон UAU, кодирующий Tyr, заменяют на UAC, кодон UGU, кодирующий Cys, заменяют на UGC, кодон CAU, кодирующий His, заменяют на CAC, кодон CAA, кодирующий Gln, заменяют на CAG, кодоны AUU или AUA, кодирующие Ile, заменяют на AUC, кодоны ACU или ACA, кодирующие Thr, заменяют на ACC или ACG, кодон AAU, кодирующий Asn, заменяют на AAC, кодон AAA, кодирующий Lys, заменяют на AAG, кодоны GUU или GUA, кодирующие Val, заменяют на GUC или GUG, кодон GAU, кодирующий Asp, заменяют на GAC, кодон GAA, кодирующий Glu, заменяют на GAG, кодон UAA (стоп-кодон) заменяют на UAG или UGA. С другой стороны, в случае кодонов Met (AUG) и Trp (UGG), отсутствует возможность модификации последовательности. Перечисленные выше замены можно использовать либо индивидуально, либо в любых возможных комбинациях для повышения содержания G/C по меньшей мере в одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, по сравнению с конкретной мРНК дикого типа (т.е. исходной последовательности). Так, например, все кодоны Thr, встречающиеся в последовательности дикого типа, можно модифицировать на ACC (или ACG). Однако предпочтительно, например, использовать комбинации указанных выше возможных замен:

замена всех кодонов, кодирующих Thr в исходной последовательности (мРНК дикого типа), на ACC (или ACG) и

замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Ser, на UCC (или UCG или AGC);

замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Ile, на AUC, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Lys, на AAG, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Tyr, на UAC;
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Val, на GUC (или GUG), и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Glu, на GAG, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Ala, на GCC (или GCG), и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Arg, на CGC (или CGG);
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Val, на GUC (или GUG), и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Glu, на GAG, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Ala, на GCC (или GCG), и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Gly, на GGC (или GGG), и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Asn, на AAC;
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Val, на GUC (или GUG),
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Phe, на UUC, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Cys, на UGC, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Leu, на CUG (или CUC), и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Gln, на CAG, и
 замена всех кодонов, кодирующих в исходной последовательности Pro, на CCC (или CCG) и т.д.

Предпочтительно содержание G/C в кодирующей области по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, повышают по меньшей мере на 7%, более предпочтительно по меньшей мере на 15%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 20% по сравнению с содержанием G/C в кодирующей области мРНК дикого типа, которая кодирует антиген, антигенный белок или антигенный пептид, указанный в настоящем описании, или его фрагмент или вариант. В конкретном варианте осуществления изобретения заменяют по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90, 95% или даже 100% пригодных для замены кодонов в области, кодирующей антиген, антигенный белок или антигенный пептид, указанный в настоящем описании, или его фрагмент или вариант или всю последовательность мРНК дикого типа, повышая тем самым содержание G/C в указанной последовательности. В этом контексте наиболее предпочтительно повышать содержание G/C по меньшей мере в одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, до максимума (т.е. до 100% пригодных для замещения кодонов), прежде всего в области, кодирующей белок, по сравнению с последовательностью дикого типа.

Согласно изобретению дополнительная предпочтительная модификация по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, основана на открытии того факта, что эффективность трансляции определяется также различной частотой встречаемости тРНК в клетках. Таким образом, если по меньшей мере в одной мРНК, которая входит в композицию, предлагаемую в настоя-

щем изобретении, присутствуют в повышенном количестве так называемые "редкие кодоны", то уровень трансляции соответствующей модифицированной по меньшей мере одной мРНК является значимо более низким, чем в том случае, когда присутствуют кодоны, кодирующие относительно "часто встречающуюся" тРНК. Согласно изобретению в модифицированной по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, область, которая кодирует по меньшей мере один из указанных антигенов, модифицируют по сравнению с соответствующей областью мРНК дикого типа так, что по меньшей мере один кодон последовательности дикого типа, который кодирует тРНК, которая является относительно редкой в клетке, заменяют на кодон, который кодирует тРНК, которая относительно часто встречается в клетке и "несет" такую же аминокислоту, что и относительно редко встречающаяся тРНК. Посредством такой модификации последовательности по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, модифицируют таким образом, чтобы встраивать кодоны, для которых доступны часто встречающиеся тРНК. Другими словами, согласно изобретению с помощью такой модификации все кодоны последовательности дикого типа, которые кодируют тРНК, являющуюся относительно редкой в клетке, в каждом случае можно заменять на кодоны, которые кодируют тРНК, относительно часто встречающуюся в клетке, и которая в каждом случае "несет" такую же аминокислоту, что и относительно редкая тРНК. тРНК, встречающиеся относительно часто в клетке, и наоборот, встречающиеся относительно редко, известны специалистам в данной области, см., например, Akashi, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11(6), 2001, сс. 660-666. Наиболее предпочтительными являются кодоны, которые применяют для наиболее часто встречающейся тРНК конкретной аминокислоты, например кодон Gly, который использует тРНК, наиболее часто встречающуюся в (человеческой) клетке. Согласно изобретению наиболее предпочтительным является объединение повышения предпочтительно до максимума содержания G/C в последовательности модифицированной по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, с помощью "часто встречающихся" кодонов без модификации аминокислотой последовательности белка, кодируемого кодирующей областью мРНК. Этот предпочтительный вариант осуществления изобретения позволяет наиболее эффективно транслировать и стабилизировать (модифицированную) по меньшей мере одну мРНК в композиции предлагаемой в настоящем изобретении. Определение модифицированной по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, описанной выше (повышенное содержание G/C; замена тРНК), можно осуществлять с использованием компьютерной программы, описанной в WO 02/098443, содержание которой включено в полном объеме в настоящее изобретение. С использованием указанной компьютерной программы нуклеотидную последовательность любой требуемой мРНК можно модифицировать с помощью генетического кода или его вырожденной природы так, чтобы получать максимальное содержание G/C, в сочетании с применением кодонов, которые кодируют тРНК, встречающуюся по возможности наиболее часто в клетке, аминокислотная последовательность, кодируемая модифицированной по меньшей мере одной мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с немодифицированной последовательностью. В альтернативном варианте можно также модифицировать только содержание G/C или только наиболее часто встречающиеся кодоны по сравнению с исходной последовательностью. Исходный код в Visual Basic 6.0 (используемая операционная среда разработки: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 с Servicepack 3) также описан в WO 02/098443. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения содержание A/U в окружении сайта связывания рибосом по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, повышают по сравнению с содержанием A/U в окружении сайта связывания рибосом соответствующей ей мРНК дикого типа. Указанная модификация (повышенное содержание A/U вокруг сайта связывания рибосом) повышает эффективность связывания рибосом по меньшей мере с одной мРНК. Эффективность связывания рибосом с сайтом связывания рибосом (последовательность Козака GCCGCCACCAUGG (SEQ ID NO: 68), AUG образует стартовый кодон) в свою очередь влияет на эффективность трансляции по меньшей мере одной мРНК. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения по меньшей мере одну мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно модифицировать в отношении потенциально дестабилизирующих элементов последовательности. В частности, кодирующую область и/или 5'- и/или 3'-нетранслируемую область указанной по меньшей мере одной мРНК можно модифицировать по сравнению с конкретной мРНК дикого типа так, чтобы она не содержала дестабилизирующие элементы последовательности, при этом кодируемую аминокислотную последовательность модифицированной по меньшей мере одной мРНК предпочтительно не изменяют по сравнению с соответствующей последовательностью мРНК дикого типа. Известно, что, например, в последовательностях РНК эукариотических организмов присутствуют дестабилизирующие элементы последовательности (ДЭП), с которыми связываются сигнальные белки и регулируют ферментативное расщепление РНК *in vivo*. Следовательно, для дополнительной стабилизации по меньшей мере одной модифицированной мРНК можно осуществлять одну или несколько указанных модификаций, необязательно в области, которая кодирует антиген, антигенный белок или антигенный пептид, указанный в настоящем описании, по сравнению с соответствующей областью мРНК дикого типа таким образом, чтобы полностью или в значительной степени удалять дестабилизирующие элементы последовательности. Согласно изобретению с использованием указанных модификаций по меньшей мере из одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоя-

щем изобретению, можно также удалять ДЭП, присутствующие в нетранслируемых областях (3'UTR и/или 5'UTR). Указанные дестабилизирующие последовательности представляют собой, например, богатые AU последовательности (AURES), которые присутствуют в областях 3'UTR многочисленных нестабильных РНК (Carut и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986, сс. 1670-1674). Поэтому по меньшей мере одну мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, предпочтительно модифицируют по сравнению с мРНК дикого типа так, чтобы по меньшей мере одна мРНК не содержала указанных дестабилизирующих последовательностей. Указанное также относится к тем мотивам последовательностей, которые распознаются возможными эндонуклеазами, например, к последовательности GAACAAG, которая присутствует в сегменте 3'UTR гена, который кодирует рецептор трансферина (Binder и др., EMBO J., 13, 1994, сс. 1969-1980). Указанные мотивы последовательности также предпочтительно удаляют по меньшей мере из одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении.

Согласно изобретению предпочтительно также, чтобы по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, включала по меньшей мере одну модифицированную IRES, как указано выше, и/или включала по меньшей мере одну стабилизирующую 5'- и/или 3'-последовательность в модифицированной форме, например, для повышения эффективности связывания с рибосомами или для обеспечения экспрессии различных кодируемых антигенов, локализованных по меньшей мере в одной (би- или даже полицистронной) РНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении.

Согласно изобретению по меньшей мере одна мРНК в композиции предпочтительно включает, кроме того, по меньшей мере одну стабилизирующую 5'- и/или 3'-последовательность. Указанные стабилизирующие последовательности в нетранслируемых 5'- и/или 3'-областях удлиняют время полужизни по меньшей мере одной мРНК в цитозоле. Указанные стабилизирующие последовательности характеризуются 100% гомологией последовательности с встречающимися в естественных условиях последовательностями, т.е. встречаются в вирусах, бактериях и эукариотических организмах, а также указанные последовательности можно использовать в виде частично или полностью синтетических последовательностей. Примером стабилизирующих последовательностей, которые можно использовать в настоящем изобретении для стабилизации мРНК, являются нетранслируемые последовательности (UTR) гена β -глобина, например Homo sapiens или Xenopus laevis. Другой пример стабилизирующей последовательности характеризуется общей формулой (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC (SEQ ID NO: 69), которая присутствует в 3'UTR чрезвычайно стабильной мРНК, которая кодирует α -глобин, α -коллаген-(I), 15-липоксигеназу или тирозингидроксилазу (см. Holcik и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1997, сс. 2410-2414). Указанные стабилизирующие последовательности, естественно, можно использовать по отдельности или в комбинации друг с другом, а также в комбинации с другими стабилизирующими последовательностями, которые известны специалисту в данной области. Таким образом, по меньшей мере одна мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, предпочтительно присутствует в виде мРНК, стабилизированной нетранслируемыми областями (UTR) глобина, прежде всего, в виде мРНК, стабилизированной UTR α -глобина. Предпочтительно по меньшей мере одна мРНК в композиции содержит стабилизирующую последовательность в 3'UTR, происходящую из центральной, связывающей α -комплекс области 3'UTR гена α -глобина, такого как ген человеческого α -глобина, предпочтительно имеющий SEQ ID NO: 70: центральная связывающая α -комплекс область 3'UTR гена α -глобина, которую в контексте настоящего описания обозначают также как "muag")

GCCCCAUGGGCCUCCCCAACGGGCCCUCCUCCCCUCCUUGCACCG(SEQ ID NO: 70).

Тем не менее, можно осуществлять замены, добавления или элиминации оснований по меньшей мере в одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, предпочтительно с использованием матрицы ДНК для получения по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, с помощью хорошо известного метода сайтнаправленного мутагенеза или с использованием стратегии лигирования олигонуклеотидов (см., например, Maniatis и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). В указанном процессе для получения по меньшей мере одной мРНК можно транскрибировать *in vitro* соответствующую молекулу ДНК. Указанная матрица ДНК предпочтительно включает пригодный промотор, например промотор T7 или SP6, для транскрипции *in vitro*, за которым располагается требуемая нуклеотидная последовательность по меньшей мере одной мРНК, которую требуется получать, и сигнал терминации для транскрипции *in vitro*. Молекулу ДНК, которая образует матрицу по меньшей мере одной представляющей интерес РНК, получают ферментативной пролиферацией с последующим выделением в качестве части плазмиды, которую можно реплицировать в бактериях. Плазмиды, которые можно упомянуть в качестве пригодных согласно настоящему изобретению, включают, например, плазмиды pT7T (код доступа GenBank U26404, Lai и др., Development, 121, 1995, сс. 2349-2360), плазмиды серий pGEM®, например pGEM®-1 (код доступа GenBank X65300, фирма Promega) и pSP64 (код доступа GenBank X65327), см. также Mezei и Storts, Purification of PCR Products, под ред. Griffin и Griffin, PCR Technology, Current Innovation, изд-во CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

По меньшей мере одну мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, можно стабилизировать также путем ассоциации или образования комплексов или связывания по меньшей мере од-

ной мРНК с катионным соединением, прежде всего, с поликатионным соединением, например с поликатионным пептидом или белком. Прежде всего, эффективным является применение протамина, нуклеолина, спермина или спермидина в качестве связывающегося с нуклеиновой кислотой (мРНК) поликатионного белка. Кроме того, аналогичным образом можно использовать другие катионные пептиды или белки, такие как поли-L-лизин или гистоны. Указанная методика стабилизации мРНК описана в EP-A-1083232, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки. Другие предпочтительные катионные соединения, которые можно использовать для стабилизации мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, включают катионные полисахариды, например хитозан, полибрен, полиэтиленмин (ПЭИ) или поли-L-лизин (ПЛИ) и т.п. Ассоциация или образование комплексов по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, с катионными соединениями, например с катионными белками или катионными липидами, например с олигофактаминоом (в качестве комплексообразователя на основе липида), предпочтительно повышает перенос по меньшей мере одной мРНК, присутствующей в качестве фармацевтического действующего вещества, в клетки, подлежащие обработке, или в организм, нуждающийся в лечении. В данном контексте указанное также относится к стабилизирующему действию комплексообразования в отношении по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, что также поддерживает стабилизацию мРНК.

Согласно другому особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции в дополнительном или в альтернативном варианте может кодировать секреторный сигнальный пептид. Указанные сигнальные пептиды представляют собой (но не ограничиваясь только ими) последовательности, длина которых обычно составляет приблизительно 15-30 аминокислот, и которые предпочтительно расположены на N-конце кодируемого пептида. Сигнальные пептиды, указанные в настоящем описании, предпочтительно обеспечивают перенос антигена, антигенного белка или антигенного пептида, кодируемого по меньшей мере одной мРНК, которая входит в композицию, в определенный компартмент клетки, предпочтительно на клеточную поверхность, в эндоплазматический ретикулум (ЭР) или в эндосомальный-липосомальный компартмент. Примеры последовательностей секреторных сигнальных пептидов, указанных в настоящем описании, включают (но не ограничиваясь только ими), сигнальные последовательности классических или не классических молекул ГКГС (например, сигнальные последовательности молекул ГКГС I и ГКГС II, например HLA-A*0201 ГКГ класса I), сигнальные последовательности цитокинов или иммуноглобулинов, указанных в настоящем описании, сигнальные последовательности инвариантной цепи иммуноглобулинов или антител, указанных в настоящем описании, сигнальные последовательности Lamp1, тапазина, Egr57, калретикулина, калнексина и других мембранно-ассоциированных белков или белков, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) или с эндосомальным-лизосомальным компартментом. В настоящем изобретении наиболее предпочтительно можно использовать сигнальные последовательности молекулы HLA-A*0201 ГКГС класса I.

Любую из указанных выше модификаций можно применять в отношении по меньшей мере одной мРНК в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, и, кроме того, в отношении любой РНК, применяемой в настоящем изобретении, и можно, если это возможно или необходимо, объединять друг с другом в любой комбинации при условии, что указанные комбинации модификаций не оказывают отрицательного действия друг на друга в отношении по меньшей мере одной мРНК. Соответствующий выбор может сделать специалист в данной области.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, которая модифицирована согласно указанному в настоящем описании, содержащую по меньшей мере одну кодирующую последовательность, которая выбрана из последовательностей РНК, идентичных или идентичных по меньшей мере на 80% РНК-последовательности SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18 или 25. Еще более предпочтительно композиция содержит шесть мРНК, при этом кодирующая последовательность каждой мРНК идентична или по меньшей мере на 80% идентична одной из РНК-последовательностей SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18 или 25.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения каждый из шести антигенов в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, может кодироваться одной (моноцистронной) мРНК. Другими словами, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать шесть (моноцистронных) мРНК, при этом каждая из указанных шести (моноцистронных) мРНК может кодировать только один антиген, указанный выше.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, каждая из которых модифицирована согласно указанному в настоящем описании, при этом одна мРНК кодирует 5T4, одна мРНК кодирует сурвивин, одна мРНК кодирует NY-ESO-1, одна мРНК кодирует MAGE-C1, одна мРНК кодирует MAGE-C2 и одна мРНК кодирует MUC1 или их фрагменты или варианты соответственно.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, при этом одна мРНК кодирует 5T4 и содержит кодирующую последовательность, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 3, одна мРНК кодирует сурвивин и содержит

кодирующую последовательность, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 6, одна мРНК кодирует NY-ESO-1 и содержит кодирующую последовательность, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 9, одна мРНК кодирует MAGE-C1 и содержит кодирующую последовательность, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 12 или 25, одна мРНК кодирует MAGE-C2 и содержит кодирующую последовательность, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 15, и одна мРНК кодирует MUC1 и содержит кодирующую последовательность, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 18 (или фрагменты или варианты каждой из указанных последовательностей), и необязательно также содержит эксципиенты.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, которая идентична или по меньшей мере на 80% идентична РНК-последовательности SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 13 или 16. Еще более предпочтительно композиция содержит шесть мРНК, при этом каждая мРНК идентична или по меньшей мере на 80% идентична одной из РНК-последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 13 или 16.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, при этом одна мРНК кодирует 5T4 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 1, одна мРНК кодирует сурвивин и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 4, одна мРНК кодирует NY-ESO-1 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 7, одна мРНК кодирует MAGE-C1 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 10, одна мРНК кодирует MAGE-C2 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 13, и одна мРНК кодирует MUC1 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 16 (или фрагменты или варианты каждой из указанных последовательностей), и необязательно также содержит эксципиенты.

Согласно изобретению по меньшей мере одна мРНК в композициях, описанных выше, содержит гистоновую структуру типа "стебель-петля" в 3' UTR-области. Предпочтительно композиция содержит шесть мРНК, причем каждая из мРНК содержит гистоновую структуру типа "стебель-петля", указанную в настоящем описании.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит шесть мРНК, при этом одна мРНК кодирует 5T4 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 19, одна мРНК кодирует сурвивин и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 20, одна мРНК кодирует NY-ESO-1 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 21, одна мРНК кодирует MAGE-C1 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 22, одна мРНК кодирует MAGE-C2 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 23, и одна мРНК кодирует MUC1 и идентична или по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 24 (или фрагменты или варианты каждой из указанных последовательностей), и необязательно также содержит эксципиенты.

Согласно другому варианту осуществления изобретения композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать адъювант для усиления иммуностимулирующих свойств композиции. В данном контексте адъювант обозначает любое соединение, которое можно использовать для облегчения введения и доставки композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Кроме того, указанный адъювант может (но не ограничиваясь только ими) инициировать или усиливать иммунный ответ врожденной иммунной системы, т.е. неспецифический иммунный ответ. Другими словами, после введения композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, как правило, инициирует адаптивный иммунный ответ благодаря наличию по меньшей мере шести антигенов, кодируемых по меньшей мере одной мРНК, содержащейся в композиции, предлагаемой в настоящем изобретении. Кроме того, композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может индуцировать (поддерживающий) врожденный иммунный ответ благодаря добавлению адъюванта, указанного в настоящем описании, в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении.

Указанный адъювант можно выбрать из любого известного специалисту в данной области, пригодного в данном случае адъюванта, т.е. адъюванта, поддерживающего индукцию иммунного ответа у млекопитающего. Предпочтительно адъювант выбирают из группы, включающей (но не ограничиваясь только ими) TDM, MDP, мурамилдипептид, плюроники, раствор квасцов, гидроксид алюминия, ADJUMER (полифосфазен); алюмофосфатный гель; глюканы из водорослей; альгамулин; гель гидроксида алюминия (квасцы); гель гидроксида алюминия с высокой степенью адсорбции белка; гель гидроксида алюминия с низкой вязкостью; AF или SPT (эмульсия, включающая 5% сквалана, 0,2% Твин 80, 1,25% плюроника L121, забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4); AVRIDINE™ (пропандиамин); BAY R1005™ (гидроацетат (N-(2-дезоксид-2-L-лейциламино-β-D-глюкопиранозил)-N-октадецил-додеканоиламида); CALCITRIOL™ (1α,25-дигидроксивитамин D3); кальцийфосфатный гель; CAPTM (кальцийфосфатные наночастицы); холерный холотоксин; слитый белок холерный токсин-A1-белок-A-D-фрагмент, субъединицу В холерного токсина; CRL 1005 (блоксополимер P1205); цитокинсодержащие липосомы; DDA (бромид диметилдиоктадециламмония); DHEA (дегидроэпиандростерон); DMPC (дими-

ристоилфосфатидилхолин); DMPG (димиристоилфосфатидилглицерин); комплекс ДОС/квасцы (натриевая соль дезоксихолево́й кислоты); полный адъювант Фрейнда; неполный адъювант Фрейнда; γ -инулин; адъювант Гербу (смесь, включающая: I) N-ацетилглюкозаминил-(P1-4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамин (GMDP), II) хлорид диметилдидекадециламмония (DDA), III) комплекс цинковая соль L-пролина (ZnPro-8), GM-CSF); GMDP (N-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин); имиквимод (1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-4-амин); ImmTher™ (дипальмитат N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Ala-D-изоGlu-L-Ala-глицерина); DRV (иммунолипосомы, полученные путем дегидратации-регидратации везикул); интерферон- γ ; интерлейкин-1 β ; интерлейкин-2; интерлейкин-7; интерлейкин-12; ISCOMS™; ISCOPREP 7.0.3.™; липосомы; LOXORIBINE™ (7-аллил-8-оксогуанозин); оральный адъювант LT (лабильный энтеротоксин-протоксин из E.coli); микросферы и микрочастицы любого состава; MF59™ (водная эмульсия сквалена); MONTANIDE ISA 51™ (очищенный неполный адъювант Фрейнда); MONTANIDE ISA 720™ (метаболизируемый масляный адъювант); MPL™ (3-Q-дезацил-4'-монофосфорил липид A); липосомы MTP-PE и MTP-PE (одонатриевая соль (N-ацетил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-(гидроксифосфорилокси))этиламида); MURAMETIDE™ (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURAPALMITINE™ и D-MURAPALMITINE™ (Mac-Mur-L-Thr-D-изоGln-sn-глицериндипальмитоил); NAGO (нейраминидаза-галактозоксидаза); наносферы или наночастицы любого состава; NISV (везикулы из неионогенного поверхностно-активного вещества); PLEURAN™ (β -глюкан); PLGA, PGA и PLA (гомо- и сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, микро/наносферы); ПЛЮРОНИК L121™, ПММА (полиметилметакрилат); PODDS™ (протеиноидные микросферы); производные полиэтиленкарбамата; поли-гА/поли-гU (комплекс полиадениловая кислота/полиуридиловая кислота); полисорбат 80 (Твин 80); белковые кохлеаты (фирма Avanti Polar Lipids, Inc., Алабастер, шт. Алабама), STIMULON™ (OS-21); Quil-A (сапонин Quil-A); S-28463 (4-аминотекдиметил-2-этоксиметил-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-1-этанол); SAF-1™ ("композиция адъювантов фирмы Syntex"); протеолипосомы вируса Сендай и липидные матрицы, содержащие белки вируса Сендай; Спан-85 (сорбитантриолеат); Спекол (эмульсия, содержащая Маркол (Marcol) 52, Спан 85 и Твин 85); сквален или Robane® (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракозан и 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексан); стеарилтирозин (гидрохлорид октадецилтирозина), Theramid® (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Ala-D-изоGlu-L-Ala-дипальмитоксипропиламид); Theronyl-MDP (Termurtide™ или [thr 1]-MDP, N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин); Ту-частицы (частицы Ту-ВПЧ или вирусоподобные частицы); липосомы Уолтера-Рида (липосомы, содержащие липид А, адсорбированный на гидроксиде алюминия) и липопептиды, включая Pam3Cys, прежде всего, соли алюминия, такие как адью-фос (Adju-phos), алгидролгель, регидрогель; эмульсии, включая CFA, SAF, IFA, MF59, провакс, титермакс (TiterMax), монтанид, ваксфектин, сополимеры, включая Optivax (CRL1005), L121, поллоксамер 4010 и т.п., липосомы, включая липосомы-невидимки (Stealth), кохлеаты, включая BIORAL; адъюванты растительного происхождения, включая QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; адъюванты, пригодные для совместной стимуляции, включая томатин, биополимеры, включая PLG, PMM, инулин; адъюванты микробного происхождения, включая ромуртид, детокс (DETOX), MPL, CWS, маннозу, нуклеотидные последовательности CpG, CpG7909, лиганды TLR 1-10 человека, лиганды TLR 1-13 мыши, ISS-1018, IC31, имидазохинолины, амплиген, Ribi529, IMOXine, IRIV, ВПЧ, холерный токсин, термолабильный токсин, Pam3Cys, флагеллин, GPI (гликозилфосфатидилинозитол)-якорь), LNFPIII/Льюис X, противомикробные пептиды, UC-1V150, слитый белок RSV, cdiGMP, а также адъюванты, пригодные в качестве антагонистов, включая нейропептид CGRP.

Пригодные адъюванты можно выбирать также из катионных или поликатионных соединений, при этом адъювант предпочтительно получают путем образования комплексов по меньшей мере одной мРНК, которая входит в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, с катионным или поликатионным соединением. Ассоциация или образование комплексов по меньшей мере одной мРНК, которая входит в композицию, с катионными или поликатионными соединениями, указанными в настоящем описании, предпочтительно придает по меньшей мере одной мРНК в композиции свойства адъюванта и оказывает стабилизирующее действие на мРНК в композиции. Прежде всего, предпочтительные катионные или поликатионные соединения выбирают из катионных или поликатионных пептидов или белков, включая протамин, нуклеолин, спермин или спермидин, или других катионных пептидов или белков, таких как поли-L-лизин (ПЛЛ), полиаргинин, основные полипептиды, проникающие в клетки пептиды (ПКП), включая ВИЧ-связывающие пептиды, Tat, ВИЧ-1 Tat (ВИЧ), полученные из Tat пептиды, пенетратин, полученные из VP22 пептиды или аналогичные пептиды, VP22 HSV (вирус герпеса простого), MAP, KALA или домены белковой трансдукции (PTD), PrT620, богатые пролином пептиды, богатые аргинином пептиды, богатые лизином пептиды, МРО-пептид(ы), Per-1, L-олигомеры, пептид(ы) кальцитонина, пептиды, полученные из Antennapedia (прежде всего, из Drosophila antennapedia), pAntp, pIs1, FGF, лактоферрин, транспортан, буфорин-2, Vac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, полученные из СТ пептиды, SAP, протамин, спермин, спермидин или гистоны. Кроме того, предпочтительные катионные или поликатионные соединения включают катионные полисахариды, например хитозан, полибрен, катион-

ные полимеры, например полиэтиленмин (ПЭИ), катионные липиды, например DOTMA: хлорид [1-(2,3-сиолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония, DMRIE, ди-C14-амидин, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, СТАР, DOPC, DODAP, DOPE: диолеилфосфатидилэтанолмин, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: диоктадециламидоглицилспермин, DIMRI: бромид димиристооксипропилдиметилгидроксиэтиламмония, DOTAP: диолеилокси-3-(триметиламмоний)пропан, DC-6-14: хлорид О,О-дитетрадеканойл-N-(α -триметиламмонийацетил)диэтанолмина, CLIP1: хлорид рац[(2,3-диоктадецилоксипропил)(2-гидроксиэтил)]диметиламмония, CLIP6: рац[2(2,3-дигексадецилоксипропилоксиметилокси)этил]триметиламмоний, CLIP9: рац[2(2,3-дигексадецилоксипропилоксисукцинилокси)этил]триметиламмоний, олигофектамин, или катионные или поликатионные полимеры, например модифицированные полиаминокислоты, такие как полимеры β -аминокислот или обращенные полиамиды и т.п., модифицированные полиэтилены, такие как ПВП (поли(N-этил-4-винилпириднийбромид)) и т.п., модифицированные акрилаты, такие как пДМАЭМА (поли(диметиламиноэтилметилакрилат)) и т.п., модифицированные амидоамины, такие как пАМAM (поли(амидоамин)) и т.п., модифицированные сложные поли- β -аминоэфир (ПБАЭ), такие как модифицированные в диаминоконцевом фрагменте сополимеры 1,4-бутандиолдиакрилата и 5-амино-1-пентанола и т.п., дендримеры, такие как дендримеры полипропиламина или дендримеры на основе пАМAM и т.п., полиимин(ы), такие как полиэтиленмин (ПЭИ), полипропиленмин и т.п., полиаллиламин, полимеры на основе сахарного каркаса, такие как полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана, хитозан и т.п., силановые полимеры, такие как сополимеры PMOXA-PDMS и т.п., блок-полимеры, включающие комбинацию одного или более катионных блоков (например, выбранных из катионных полимеров, указанных выше) и одного или нескольких гидрофильных или гидрофобных блоков (таких, например, как полиэтиленгликоль) и т.п.

Кроме того, предпочтительные катионные или поликатионные белки или пептиды, которые можно использовать в качестве адъюванта посредством образования комплексов по меньшей мере с одной мРНК, входящей в композицию, можно выбирать из следующих белков или пептидов общей формулы (III): $(Arg)_l, (Lys)_m, (His)_n, (Orn)_o, (Xaa)_x$, где $l+m+n+o+x=8-15$, а l, m, n или o , каждый независимо друг от друга, может обозначать любое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, при условии, что общее содержание Arg, Lys, His и Orn составляет по меньшей мере 50% в пересчете на все аминокислоты олигопептида, а Xaa может обозначать любую аминокислоту, выбранную из нативных (встречающихся в естественных условиях) или ненативных аминокислот, за исключением Arg, Lys, His или Orn, и x может обозначать любое число, выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4, при условии, что общее содержание Xaa не превышает 50% в пересчете на все аминокислоты олигопептида. В этом контексте наиболее предпочтительными олигопептидами аргинина являются, например, Arg₇, Arg₈, Arg₉, Arg₇, H₃R₉, R₉H₃, H₃R₉H₃, YSSR₉SSY, (RKH)₄, Y(RKH)₂R и т.п.

Соотношение мРНК и катионного или поликатионного соединения в адъювантном компоненте можно рассчитывать на основе отношения азота/фосфата (N/P-отношение) всего содержащего мРНК комплекса, т.е. отношение положительно заряженных атомов (азот) катионного или поликатионного соединения и отрицательно заряженных атомов фосфата нуклеиновых кислот. Например, 1 мкг РНК, как правило, содержит примерно 3 нмоль остатков фосфата при условии, что для РНК характерно статистическое распределение оснований. Кроме того, 1 мкг пептида, как правило, содержит примерно x нмоль остатков азота в зависимости от молекулярной массы и количества основных аминокислот. Например, при расчете для (Arg)₉ (молекулярная масса 1424 г/моль, 9 атомов азота) 1 МКг(Arg)₉ содержит примерно 700 пмоль (Arg)₉ и, таким образом, $700 \times 9 = 6300$ пмоль основных аминокислот = 6,3 нмоль атомов азота. Для массового соотношения РНК/(Arg)₉, составляющего примерно 1:1, можно рассчитать, что отношение N/P составляет примерно 2. Например, при расчете для протамина (молекулярная масса примерно 4250 г/моль, 21 атом азота, когда применяют протамин лосося) с массовым соотношением примерно 2:1 и 2 мкг РНК, можно рассчитать наличие в РНК 6 нмоль фосфата; 1 мкг протамина содержит примерно 235 пмоль молекул протамина, таким образом, $235 \times 21 = 4935$ пмоль основных атомов азота = 4,9 нмоль атомов азота. Для массового соотношения РНК/протамин, составляющего примерно 2:1, можно рассчитать, что отношение N/P составляет примерно 0,81. Для массового соотношения РНК/протамин, составляющего примерно 8:1, можно рассчитать, что отношение N/P составляет примерно 0,2. В контексте настоящего изобретения отношение N/P предпочтительно находится в диапазоне примерно 0,1-10, предпочтительно в диапазоне примерно 0,3-4 и наиболее предпочтительно в диапазоне примерно 0,5-2 или 0,7-2 в зависимости от отношения РНК:пептид в комплексе и наиболее предпочтительно в диапазоне примерно 0,7-1,5.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию получают с использованием двух отдельных стадий для достижения как эффективного иммуностимулирующего действия, так и эффективной трансляции по меньшей мере одной мРНК, предлагаемой в изобретении. При этом получают так называемый "адъювантный компонент" путем образования комплекса - на первой стадии - по меньшей мере одной мРНК адъювантного компонента с катионным или поликатионным соединением в специфическом соотношении для формирования стабильного комплекса. В этом контексте важно, чтобы в адъювантном компоненте отсутствовало или сохранялось лишь в ничтожно малых количествах сво-

бодное катионное или поликатионное соединение после образования комплекса с мРНК. Таким образом, отношение мРНК и катионного или поликатионного соединения в адьювантном компоненте, как правило, выбирают в таком диапазоне, чтобы в композиции мРНК полностью была включена в комплекс и отсутствовало или сохранялось лишь в ничтожно малых количествах свободное катионное или поликатионное соединение. Предпочтительно отношение в адьювантном компоненте, т.е. отношение мРНК и катионного или поликатионного соединения, выбирают из диапазона, составляющего примерно 6:1 (мас./мас.) до примерно 0,25:1 (мас./мас.), более предпочтительно от примерно 5:1 до примерно 0,5:1 (мас./мас.), еще более предпочтительно от примерно 4:1 до примерно 1:1 (мас./мас.) или от примерно 3:1 до примерно 1:1 (мас./мас.) и наиболее предпочтительно от примерно 3:1 до примерно 2:1 (мас./мас.).

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения по меньшей мере одну мРНК, кодирующую антигены, предлагаемые в изобретении, добавляют на второй стадии к входящей в комплекс мРНК адьювантного компонента для получения (иммуностимулирующей) композиции, предлагаемой в изобретении. При этом по меньшей мере одну мРНК, предлагаемую в изобретении, добавляют в виде свободной мРНК, т.е. мРНК, которая не входит в комплекс с другими соединениями. Перед добавлением по меньшей мере одну свободную мРНК не включают в комплекс и предпочтительно после добавления адьювантного компонента она не должна подвергаться какой-либо поддающейся обнаружению или существенной реакции комплексообразования. Это является следствием сильного связывания катионного или поликатионного соединения с указанной выше по меньшей мере одной мРНК в адьювантном компоненте. Другими словами, когда по меньшей мере одну свободную мРНК, кодирующую по меньшей мере один из антигенов, предлагаемых в изобретении, добавляют к "адьювантному компоненту", то предпочтительно в нем отсутствует соединение, которое может образовывать комплекс по меньшей мере с одной свободной мРНК. Таким образом, становится возможной эффективная трансляция *in vivo* по меньшей мере одной свободной мРНК в композиции, предлагаемой в изобретении. При этом по меньшей мере одна свободная мРНК может присутствовать в виде моно-, би- или полицистронной мРНК, т.е. РНК, которая несет кодирующие последовательности одного или нескольких белков. Указанные кодирующие последовательности в би- или даже полицистронной мРНК могут разделяться по меньшей мере одной IRES-последовательностью, например, представленной в настоящем описании.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна свободная мРНК, которая входит в предлагаемую в изобретении композицию, может быть такой же или отличаться по меньшей мере от одной мРНК адьювантного компонента предлагаемой в изобретении композиции, в зависимости от конкретных требований к терапии. Еще более предпочтительно по меньшей мере одна свободная мРНК, которая входит в предлагаемую в изобретении композицию, идентична по меньшей мере одной РНК адьювантного компонента в предлагаемой в изобретении композиции.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, где по меньшей мере одна мРНК кодирует указанные выше антигены и где указанная мРНК присутствует в композиции частично в виде свободной мРНК и частично в виде входящей в комплекс мРНК. Предпочтительно по меньшей мере одна мРНК, кодирующая один или несколько антигенов, указанных выше, входит в описанный выше комплекс, и такую же по меньшей мере одну мРНК затем добавляют в виде свободной РНК, при этом предпочтительно соединение, которое применяют для образования комплекса с мРНК, не присутствует в свободной форме в композиции в момент добавления компонента в виде свободной мРНК.

Отношение первого компонента (т.е. адьювантного компонента, содержащего или состоящего по меньшей мере из одной мРНК в комплексе с катионным или поликатионным соединением) к второму компоненту (т.е. по меньшей мере одной свободной мРНК) в предлагаемой в изобретении композиции можно выбрать в зависимости от специфических требований к конкретной терапии. Как правило, отношение мРНК в адьювантном компоненте по меньшей мере к одной свободной мРНК (мРНК в адьювантном компоненте: свободная мРНК) в предлагаемой в изобретении композиции выбирают таким образом, чтобы вызывать выраженную стимуляцию врожденной иммунной системы с помощью адьювантного компонента. Не зависимо от этого отношение выбирают таким образом, чтобы можно было получать значительное количество по меньшей мере одной свободной мРНК *in vivo*, обеспечивающее эффективную трансляцию и концентрацию экспрессируемого белка *in vivo*, например шести указанных выше антигенов и т.п. Предпочтительно отношение мРНК в адьювантном компоненте: свободная мРНК в предлагаемой в изобретении композиции выбирают из диапазона, составляющего от примерно 5:1 до примерно 1:10 (мас./мас.), более предпочтительно от примерно 4:1 до примерно 1:8 (мас./мас.), еще более предпочтительно из диапазона, составляющего от примерно 3:1 до примерно 1:5 (мас./мас.) или 1:3 (мас./мас.) и наиболее предпочтительно отношение мРНК в адьювантном компоненте: свободная мРНК в предлагаемой в изобретении композиции выбирают из отношения, составляющего примерно 1:1 (мас./мас.).

В дополнительном или альтернативном варианте отношение первого компонента (т.е. адьювантного компонента, содержащего или состоящего по меньшей мере из одной мРНК, входящей в комплекс с катионным или поликатионным соединением) и второго компонента (т.е. по меньшей мере одной свободной мРНК) можно рассчитывать на основе отношения азота/фосфата (N/P-отношение) всего комплекса мРНК. В контексте настоящего изобретения N/P-отношение предпочтительно находится в диапазоне,

составляющем примерно 0,1-10, предпочтительно в диапазоне, составляющем примерно 0,3-4, и наиболее предпочтительно в диапазоне, составляющем примерно 0,5-2 или 0,7-2 касательно отношения мРНК:пептид в комплексе, и наиболее предпочтительно в диапазоне, составляющем примерно 0,7-1,5.

В дополнительном или альтернативном варианте отношение первого компонента (т.е. адъювантного компонента, содержащего или состоящего по меньшей мере из одной мРНК, входящей в комплекс с катионным или поликатионным соединением) и второго компонента (т.е. по меньшей мере одной свободной мРНК) в предлагаемой в изобретении композиции можно выбирать также на основе молярного отношения обеих мРНК относительно друг друга, т.е. мРНК в адъювантном компоненте, образующей комплекс с катионным или поликатионным соединением, к по меньшей мере одной свободной мРНК второго компонента. Как правило, молярное отношение мРНК адъювантного компонента по меньшей мере к одной свободной мРНК второго компонента можно выбирать так, чтобы молярное отношение удовлетворяло указанным выше требованиям к массовым (мас./мас.) отношениям и/или отношениям N/P. Более предпочтительно молярное отношение мРНК адъювантного компонента к по меньшей мере одной свободной мРНК второго компонента можно выбирать, например, из молярных отношений, составляющих примерно 0,001:1, 0,01:1, 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1:0,9, 1:0,8, 1:0,7, 1:0,6, 1:0,5, 1:0,4, 1:0,3, 1:0,2, 1:0,1, 1:0,01, 1:0,001 и т.д., или из любого диапазона, образованного любыми двумя из вышеуказанных величин, например диапазона, выбранного из следующих диапазонов: примерно от 0,001:1 до 1:0,001, включая диапазоны примерно от 0,01:1 до 1:0,001, от 0,1:1 до 1:0,001, от 0,2:1 до 1:0,001, от 0,3:1 до 1:0,001, от 0,4:1 до 1:0,001, от 0,5:1 до 1:0,001, от 0,6:1 до 1:0,001, от 0,7:1 до 1:0,001, от 0,8:1 до 1:0,001, от 0,9:1 до 1:0,001, от 1:1 до 1:0,001, от 1:0,9 до 1:0,001, от 1:0,8 до 1:0,001, от 1:0,7 до 1:0,001, от 1:0,6 до 1:0,001, от 1:0,5 до 1:0,001, от 1:0,4 до 1:0,001, от 1:0,3 до 1:0,001, от 1:0,2 до 1:0,001, от 1:0,1 до 1:0,001, от 1:0,01 до 1:0,001, или диапазонов примерно от 0,01:1 до 1:0,01, от 0,1:1 до 1:0,01, от 0,2:1 до 1:0,01, от 0,3:1 до 1:0,01, от 0,4:1 до 1:0,01, от 0,5:1 до 1:0,01, от 0,6:1 до 1:0,01, от 0,7:1 до 1:0,01, от 0,8:1 до 1:0,01, от 0,9:1 до 1:0,01, от 1:1 до 1:0,01, от 1:0,9 до 1:0,01, от 1:0,8 до 1:0,01, от 1:0,7 до 1:0,01, от 1:0,6 до 1:0,01, от 1:0,5 до 1:0,01, от 1:0,4 до 1:0,01, от 1:0,3 до 1:0,01, от 1:0,2 до 1:0,01, от 1:0,1 до 1:0,01, от 1:0,01 до 1:0,01, включая диапазоны примерно от 0,001:1 до 1:0,01, от 0,001:1 до 1:0,1, от 0,001:1 до 1:0,2, от 0,001:1 до 1:0,3, от 0,001:1 до 1:0,4, от 0,001:1 до 1:0,5, от 0,001:1 до 1:0,6, от 0,001:1 до 1:0,7, от 0,001:1 до 1:0,8, от 0,001:1 до 1:0,9, от 0,001:1 до 1:1, от 0,001 до 0,9:1, от 0,001 до 0,8:1, от 0,001 до 0,7:1, от 0,001 до 0,6:1, от 0,001 до 0,5:1, от 0,001 до 0,4:1, от 0,001 до 0,3:1, от 0,001 до 0,2:1, от 0,001 до 0,1:1, или диапазоны примерно от 0,01:1 до 1:0,01, от 0,01:1 до 1:0,1, от 0,01:1 до 1:0,2, от 0,01:1 до 1:0,3, от 0,01:1 до 1:0,4, от 0,01:1 до 1:0,5, от 0,01:1 до 1:0,6, от 0,01:1 до 1:0,7, от 0,01:1 до 1:0,8, от 0,01:1 до 1:0,9, от 0,01:1 до 1:1, 0,001 до 0,9:1, от 0,001 до 0,8:1, от 0,001 до 0,7:1, от 0,001 до 0,6:1, от 0,001 до 0,5:1, от 0,001 до 0,4:1, от 0,001 до 0,3:1, от 0,001 до 0,2:1, от 0,001 до 0,1:1 и т.д.

Еще более предпочтительно молярное отношение мРНК адъювантного компонента по меньшей мере к одной свободной мРНК второго компонента можно выбирать из отношения примерно от 0,01:1 до 1:0,01. Наиболее предпочтительно молярное отношение мРНК адъювантного компонента по меньшей мере к одной свободной мРНК второго компонента можно выбирать, например, из молярного отношения, составляющего примерно 1:1. Можно применять любое из указанных выше определений касательно массового (мас./мас.) отношения и/или отношения N/P.

Приемлемые адъюванты можно выбирать также из нуклеиновых кислот, имеющих формулу (IV): $G_lX_mG_n$, в которой: G обозначает гуанозин, урацил или аналог гуанозина или урацила; X обозначает гуанозин, урацил, аденозин, тимидин, цитозин или аналог вышеуказанных нуклеотидов; l обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда l = 1, то G представляет собой гуанозин или его аналог, когда l > 1, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой гуанозин или его аналог; m обозначает целое число и обозначает по меньшей мере 3; при этом, когда m = 3, то X представляет собой урацил или его аналог, когда m > 3, то присутствуют по меньшей мере 3 последовательно расположенных урацила или аналогов урацила; n обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда n = 1, то G представляет собой гуанозин или его аналог, когда n > 1, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой гуанозин или его аналог.

Другие приемлемые адъюванты можно выбирать также из нуклеиновых кислот, имеющих формулу (V) $C_lX_mC_n$, в которой: C обозначает цитозин, урацил или аналог цитозина или урацила; X обозначает гуанозин, урацил, аденозин, тимидин, цитозин или аналог вышеуказанных нуклеотидов; l обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда l = 1, то C представляет собой цитозин или его аналог, когда l > 1, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой цитозин или его аналог; m обозначает целое число и обозначает по меньшей мере 3; когда m = 3, X представляет собой урацил или его аналог, когда m > 3, то присутствуют по меньшей мере 3 последовательно расположенных урацила или аналогов урацила; n обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда n = 1, то C представляет собой цитозин или его аналог, когда n > 1, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой цитозин или его аналог.

Еще одним объектом настоящего изобретения может служить вакцина, основой которой является по меньшей мере одна мРНК, предпочтительно по меньшей мере одна из шести различных видов мРНК,

кодирующих по меньшей мере указанные выше антигены 5T4, сурвивин, NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2 и MUC-1. Таким образом, основой предлагаемой в изобретении вакцины являются те же самые компоненты, что и в композиции, описанной выше. В такой же степени это можно отнести к представленным выше понятиям, относящимся к предлагаемой в изобретении композиции. Однако предлагаемая в изобретении вакцина может находиться в физически другой форме и ее можно вводить с использованием других стадий введения. Предлагаемая в изобретении вакцина может соответствовать предлагаемой в изобретении композиции, если представляющие собой мРНК компоненты находятся в виде одной индивидуальной композиции. Однако предлагаемая в изобретении вакцина может находиться, например, в виде физически отдельных форм. Например, виды мРНК можно включать в две различные композиции, каждая из которых может содержать по меньшей мере один из видов мРНК (например, три различных вида мРНК), кодирующих три различных антигена, которые можно объединять или можно не объединять. Кроме того, предлагаемая в изобретении вакцина может представлять собой комбинацию трех различных композиций, при этом каждая композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует два из указанных выше шести антигенов. Или вакцина может представлять собой комбинацию по меньшей мере одной мРНК, предпочтительно шести мРНК, каждая из которых кодирует один из указанных выше шести антигенов. Вакцину можно объединять с получением одной индивидуальной композиции перед ее применением или можно использовать таким путем, при котором требуется осуществлять более одной обработки для введения различных видов мРНК, которые кодируют шесть указанных видов антигенов. Если вакцина содержит по меньшей мере одну молекулу мРНК, как правило, по меньшей мере две молекулы мРНК, которые кодируют указанные выше шесть антигенов, то ее можно, например, применять с использованием одного индивидуального введения (объединяющего все виды мРНК), с использованием двух различных введений (например, при каждой обработке осуществляют введение молекул мРНК, которые кодируют три из указанных выше шести антигенов), трех, четырех, пяти или шести введений (в случае, когда все виды мРНК кодируют один из указанных выше шести антигенов, и они являются физически разделенными). Таким образом, под вакциной, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевают любую комбинацию моно-, би- или полицистронных мРНК, кодирующих указанные выше шесть антигенов (и необязательно дополнительные антигены), в виде отдельных субстанций (содержащих один из видов мРНК) или в виде объединенной субстанции (содержащей более одного из видов мРНК). Таким образом, в конкретном предпочтительном варианте вакцины, предлагаемой в изобретении, каждый из антигенов, предлагаемых в изобретении, кодируется индивидуальной (моносистронной) мРНК, которую вводят отдельно от других.

Также как в случае композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, компоненты вакцины могут находиться в жидкой или сухой (лиофилизированной) форме. Они могут содержать дополнительные компоненты, прежде всего дополнительные компоненты, способствующие ее фармацевтическому применению. Предлагаемая в изобретении вакцина или предлагаемая в изобретении композиция может содержать дополнительно, например, фармацевтически приемлемый носитель и/или дополнительные вспомогательные субстанции и добавки и/или адъюванты.

Предлагаемая в изобретении вакцина или композиция, как правило, содержит в "безопасном и эффективном количестве" по меньшей мере одну мРНК указанной выше композиции, которая кодирует указанные выше антигены. В контексте настоящего описания под "безопасным и эффективным количеством" предпочтительно подразумевается количество по меньшей мере одной мРНК композиции или вакцины, указанной выше, которое является достаточным для оказания значительного положительного действия на состояния, подлежащие лечению, при раке легких, предпочтительно немелкоклеточном раке легких (NSCLC), более предпочтительно на состояния при трех основных подтипах NSCLC, включая (но не ограничиваясь только ими) плоскоклеточную карциному легких, аденокарциному и крупноклеточную карциному легких. Однако в то же время "безопасное и эффективное количество" является достаточно небольшим, чтобы избежать серьезных побочных действий, другими словами, обеспечивать разумное соотношение между преимуществом и риском. Определение этих пределов, как правило, находится в компетенции осуществляющего лечение врача. Касательно предлагаемой в изобретении вакцины или композиции понятие "безопасное и эффективное количество" предпочтительно означает количество мРНК (и, как следствие, кодируемых антигенов), которое можно применять для стимуляции приобретенного иммунитета и при этом не должны развиваться избыточные или повреждающие иммунные ответные реакции, но предпочтительно указанные ответные реакции не должны быть ниже поддающегося измерению уровня. Кроме того, такое "безопасное и эффективное количество" по меньшей мере одной мРНК, входящей в состав композиции или вакцины, указанной выше, можно выбрать в зависимости от типа мРНК, например, в зависимости от использования моносистронной, би- или даже полицистронной мРНК, так как би- или даже полицистронная мРНК вызывает более эффективную экспрессию кодируемого(ых) антигена(ов) по сравнению с таким же количеством моносистронной мРНК. Более того, понятие "безопасное и эффективное количество" по меньшей мере одной мРНК в составе композиции или вакцины, описанной выше, может изменяться в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, а также от возраста и физического состояния пациента, нуждающегося в лечении, от тяжести состояния, продолжительности лечения, конкретного фармацевтически приемлемого носителя и анало-

гичных факторов, которые находятся в компетенции лечащего врача. Вакцину или композицию, предлагаемую в изобретении, можно применять в медицине и в ветеринарии в виде фармацевтической композиции и в виде вакцины.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна мРНК в композиции, вакцине или состоящем из компонентов наборе, предлагаемом в изобретении, находится в лиофилизированной форме. Предпочтительно по меньшей мере одну лиофилизированную мРНК перед введением восстанавливают в приемлемом буфере, предпочтительно на основе водного носителя, например в лактированном растворе Рингера, который является предпочтительным, растворе Рингера, забуфференном фосфатом растворе. В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция, вакцина или набор компонентов, предлагаемая/предлагаемый в изобретении, содержит шесть мРНК, которые присутствуют по отдельности в лиофилизированной форме (необязательно в сочетании по меньшей мере с одной дополнительной добавкой) и которые предпочтительно перед применением восстанавливают по отдельности в приемлемом буфере (таком как лактированный раствор Рингера), что позволяет осуществлять индивидуальное введение каждой из шести (моноцистронных) мРНК.

Вакцина или композиция, предлагаемая в изобретении, как правило, может содержать фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего описания понятие "фармацевтически приемлемый носитель" предпочтительно обозначает жидкие или нежидкие основы для предлагаемой в изобретении вакцины. Если вакцина, предлагаемая в изобретении, представлена в жидкой форме, носителем обычно является вода, как правило, апиrogenная вода; изотонические солевые или забуфференные (водные) растворы, например фосфатные, цитратные буферные растворы и т.д. Предпочтительно для инъекции предлагаемой в изобретении вакцины, прежде всего, используют воду или предпочтительно буферный раствор, более предпочтительно водный буфер, содержащий соль натрия, предпочтительно по меньшей мере 50 мМ соль натрия, соль кальция, предпочтительно по меньшей мере 0,01 мМ соль кальция, и необязательно соль калия, предпочтительно по меньшей мере 3 мМ соль калия. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения в качестве солей натрия, кальция и необязательно калия используют галогениды, например хлориды, иодиды или бромиды, гидроксиды, карбонаты, гидрокарбонаты или сульфаты указанных металлов и т.д. Примеры солей (но не ограничиваясь только ими) включают, например, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, примеры необязательных солей калия включают, например, KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, и примеры солей кальция включают, например, CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Кроме того, буфер может содержать органические соли указанных выше катионов. Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретения буфер, пригодный для указанных выше инъекций, может содержать соли, выбранные из хлорида натрия (NaCl), хлорида кальция (CaCl₂) и необязательно хлорида калия (KCl), при этом могут присутствовать также другие анионы, отличные от хлоридов. CaCl₂ можно заменять на другую соль, например KCl. Как правило, соли в составе буфера для инъекций присутствуют в следующей концентрации: по меньшей мере 50 мМ хлорид натрия (NaCl), по меньшей мере 3 мМ хлорид калия (KCl) и по меньшей мере 0,01 мМ хлорид кальция (CaCl₂). Буфер для инъекций может представлять собой гипертонический, изотонический или гипотонический раствор по отношению к конкретной применяемой для сравнения среде, т.е. буфер может иметь повышенное, аналогичное или пониженное количество соли по отношению к конкретной применяемой для сравнения среде, при этом предпочтительно использовать такие концентрации указанных выше солей, которые не приводят к повреждению клеток за счет осмоса или других концентрационных эффектов. В качестве конкретной применяемой для сравнения среды можно рассматривать, например, жидкости, используемые в методах "in vivo", такие как кровь, лимфа, цитозоль и другие физиологические жидкости, или, например, жидкости, которые можно использовать в методах "in vitro", такие как стандартные буферы или жидкости. Указанные стандартные буферы или жидкости известны специалисту в данной области. Наиболее предпочтительной жидкой основой является лактированный раствор Рингера.

Однако можно использовать также один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей или разбавителей или капсулирующих соединений, пригодных для введения индивидууму. Понятие "совместимые" в контексте настоящего описания означает, что компоненты предлагаемой в изобретении вакцины можно смешивать по меньшей мере с одной мРНК из композиции, кодирующей по меньшей мере шесть антигенов, описанных выше, и при этом не происходит каких-либо взаимодействий между указанными компонентами, значительно снижающих фармацевтическую эффективность вакцины, предлагаемой в изобретении, в стандартных условиях применения. Фармацевтически приемлемые носители, наполнители или разбавители, естественно, должны характеризоваться достаточно высокой степенью чистоты и достаточно низкой токсичностью, т.е. являться приемлемыми для введения индивидууму, который нуждается в лечении. Некоторые примеры соединений, которые можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или компонентов, включают сахара, такие, например, как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие, например, как кукурузный крахмал или картофельный крахмал; декстрозу; целлюлозу и ее производные, такие, например, как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы; порошкообразную трагакантовую камедь; солов; желатин; твердые жиры; твердые обеспечивающие скольжение вещества, такие, например, как стеа-

риновая кислота, стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие, например, как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло ши (каритэ); полиолы, такие, например, как полипропиленгликоль, глицерин, сорбит, манит и полиэтиленгликоль; альгиновую кислоту.

В целом, выбор фармацевтически приемлемого носителя определяется путем введения вакцины, предлагаемой в изобретении. Вакцину, предлагаемую в изобретении, можно вводить, например, системно или местно. Пути системного введения, как правило, включают, например, чрескожный, оральный, парентеральный путь введения, включая подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, внутрикожные и внутрибрюшинные инъекции и/или интраназальные пути введения. Пути местного применения, как правило, включают, например, местное нанесение, но также внутрикожные, чрескожные, подкожные или внутримышечные инъекции или инъекции, вводимые непосредственно в область поражения, внутричерепные, внутрилегочные, внутрисердечные и подъязычные инъекции. Более предпочтительно вакцины можно вводить внутрикожно, подкожно или внутримышечно, предпочтительно путем инъекции, которая может представлять собой безыгольную и/или игольную инъекцию. Таким образом, композиции/вакцины предпочтительно приготавливают в виде жидкой или твердой формы. Пригодное количество вводимой вакцины, предлагаемой в изобретении, можно определить в стандартных экспериментах на созданных на животных моделях. Указанные модели включают (но не ограничиваясь только ими) модели, созданные на кроликах, овцах, мышах, крысах, собаках и приматах кроме человека. Предпочтительные стандартные лекарственные формы для инъекций включают стерильные водные растворы, физиологический раствор или их смеси. Значение pH указанных растворов следует регулировать до приблизительно 7,4. Пригодные носители для инъекций включают гидрогели, устройства для контролируемого или замедленного высвобождения, полимолочную кислоту и коллагеновые матрицы. Пригодные фармацевтически приемлемые носители для местного применения включают носители, пригодные для применения в составе лосьонов, кремов, гелей и т.п. Если вакцину, предлагаемую в изобретении, вводят оральным путем, то предпочтительными стандартными лекарственными формами являются таблетки, капсулы и т.п. Из существующего уровня техники известны фармацевтически приемлемые носители для получения стандартных лекарственных форм, которые можно применять для орального введения. Выбор указанных носителей зависит от вторичных факторов, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, и такие носители может без усилий выбирать специалист в данной области, и они не являются решающими для целей настоящего изобретения.

Предлагаемая в изобретении вакцина или композиция может содержать также одно или несколько вспомогательных веществ, предназначенных для повышения иммуногенности. При этом предпочтительно достигается синергетическое действие по меньшей мере одной указанной выше мРНК, входящей в композицию или вакцину, и вспомогательного вещества, которое необязательно также включено в состав (или не включено в состав) указанной выше вакцины или композиции, предлагаемой в изобретении. В зависимости от типа используемых вспомогательных веществ можно рассматривать различные механизмы действия. Например, соединения, ускоряющие созревание дендритных клеток (ДК), например липополисахариды, TNF- α или лиганд CD40, образуют первый класс пригодных вспомогательных веществ. В целом, в качестве вспомогательного вещества можно использовать любой агент, который оказывает влияние на иммунную систему, по механизму "сигнала опасности" (LPS, GP96, и т.п.), или можно использовать цитокины, такие как GM-CSF, которые позволяют целенаправленно усиливать иммунный ответ, вызываемый иммуностимулирующим адъювантом, предлагаемым в изобретении, или целенаправленно влиять на него. Наиболее предпочтительными вспомогательными веществами являются цитокины, такие как монокины, лимфокины, интерлейкины или хемокины, которые кроме индукции приобретенного иммунитета, обусловленного по меньшей мере шестью антигенами, активируют врожденный иммунитет, такие как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, INF- α , INF- β , INF- γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT- β или TNF- α , факторы роста, такие как hGH. Предпочтительно указанные повышающие иммуногенность агенты или соединения находятся в отдельной форме (не входят в состав вакцины или композиции, предлагаемой в изобретении) и их применяют индивидуально.

Другими добавками, которые можно включать в состав вакцины или композиции, предлагаемой в изобретении, являются эмульгаторы, такие, например, как твин; смачивающие вещества, такие, например, как лаурилсульфат натрия; красители; улучшающие вкусовые вещества; фармацевтические носители; наполнители для приготовления таблеток; стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты.

Предлагаемая в изобретении вакцина или композиция может содержать также любое дополнительное соединение, у которого известна способность оказывать иммуностимулирующее действие в результате его аффинности связывания (в качестве лиганда) с человеческими Толл-подобными рецепторами TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 или в результате его аффинности связывания (в качестве лиганда) с мышиными Толл-подобными рецепторами TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 или TLR13.

В этом контексте другим классом соединений, которые можно добавлять к предлагаемой в изобретении вакцине или композиции, могут являться CpG-нуклеиновые кислоты, в частности CpG-РНК или CpG-ДНК. CpG-РНК или CpG-ДНК могут представлять собой одноцепочечную CpG-ДНК (ssCpG-ДНК), двухцепочечную CpG-ДНК (dsДНК), одноцепочечную CpG-РНК (ssCpG-РНК) или двухцепочечную CpG-РНК (dsCpG-РНК). CpG-нуклеиновая кислота предпочтительно находится в форме CpG-РНК, более предпочтительно в форме одноцепочечной CpG-РНК (ssCpG-РНК). CpG-нуклеиновая кислота предпочтительно содержит по меньшей мере одну или несколько (митогенную(ых)) цитозин/гуанидинуклеотидную(ых) последовательность(ей) (CpG-мотив(ы)). Согласно первому предпочтительному варианту по меньшей мере один CpG-мотив, содержащийся в указанных последовательностях, иными словами С (цитозин) и G (гуанин) в составе CpG-мотива, является неметилированным. Все другие остатки цитозина или гуанина, необязательно содержащиеся в указанных последовательностях, являются метилированными или неметилированными. Однако согласно другому предпочтительному варианту С (цитозин) и G (гуанин) в составе CpG-мотива могут присутствовать также и в метилированной форме.

Предпочтительно указанные выше соединения включают в состав препаративной формы и вводят отдельно от указанной выше композиции или вакцины (предлагаемой в изобретении), которая содержит по меньшей мере одну мРНК, кодирующую по меньшей мере шесть указанных выше антигенов.

Согласно другому предпочтительному объекту настоящего изобретения предлагаемую в изобретении композицию или вакцину можно применять согласно изобретению (для приготовления лекарственного средства) для лечения рака легких или заболеваний или нарушений, связанных с ним, предпочтительно состояний, которые связаны с немелкоклеточным раком легких (NSCLC), подлежащим лечению, более предпочтительно состояний, связанных с тремя основными подтипами NSCLC, включая (но не ограничиваясь только ими) плоскоклеточную карциному легких, аденокарциному и крупноклеточную карциному легких.

Согласно следующему предпочтительному объекту настоящего изобретения предлагаемую в изобретении вакцину или предлагаемую в изобретении композицию, содержащую по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует антигены, указанные в настоящем описании, можно применять для лечения рака легких или заболеваний или нарушений, связанных с ним, предпочтительно состояний, которые связаны с немелкоклеточным раком легких (NSCLC), подлежащим лечению, более предпочтительно состояний, связанных с тремя основными подтипами NSCLC, включая (но не ограничиваясь только ими) плоскоклеточную карциному легких, аденокарциному и крупноклеточную карциному легких.

В этом контексте настоящее изобретение относится также к способам лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и заболеваний или нарушений, связанных с ним, предпочтительно состояний, связанных с немелкоклеточным раком легких (NSCLC), подлежащим лечению, более предпочтительно состояний, связанных с тремя основными подтипами NSCLC, включая (но не ограничиваясь только ими) плоскоклеточную карциному легких, аденокарциному и крупноклеточную карциному легких, заключающимся в том, что вводят индивидууму, который нуждается в этом, в фармацевтически эффективном количестве предлагаемую в изобретении вакцину или в фармацевтически эффективном количестве предлагаемую в изобретении композицию. Указанный способ, как правило, заключается в том, что необязательно на первой стадии приготавливают композицию, предлагаемую в изобретении, или вакцину, предлагаемую в изобретении, и на второй стадии пациенту, нуждающемуся в таком лечении, вводят (в фармацевтически эффективном количестве) указанную композицию, предлагаемую в изобретении, или указанную вакцину, предлагаемую в изобретении. Пациента, который нуждается в таком лечении, как правило, выбирают из любых млекопитающих. В контексте настоящего изобретения млекопитающего предпочтительно выбирают из группы, включающей (но не ограничиваясь только ими), например, коз, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек, ослов, обезьян, человекоподобных обезьян, грызунов, таких как мыши, хомяки, кролики, и прежде всего человека, при этом млекопитающее, как правило, страдает от рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и заболеваний или нарушений, связанных с ним, предпочтительно состояний, связанных с немелкоклеточным раком легких (NSCLC), подлежащим лечению, более предпочтительно состояний, связанных с тремя основными подтипами NSCLC, включая (но не ограничиваясь только ими) плоскоклеточную карциному легких, аденокарциному и крупноклеточную карциному легких.

В настоящем изобретении предлагается также применение композиции, предлагаемой в изобретении, или по меньшей мере одной мРНК, кодирующей антигены, указанные в настоящем описании (для приготовления предлагаемой в изобретении вакцины), предпочтительно для индукции иммунного ответа у млекопитающего, предпочтительно для лечения рака легких, более предпочтительно для лечения состояния, связанного с NSCLC, указанного в настоящем описании.

Предпочтительно индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией 0, I (IA и/или IB), II (IIA и/или IIB), III (IIIA и/или IIIB) или стадией IV немелкоклеточного рака легких.

В конкретном варианте осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких.

Кроме того, индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, может представлять собой пациента с немелкоклеточным раком легких, которого лечат с помощью химиотерапии (например, химиотерапии первой линии или второй линии), лучевой терапии, химиорадиации (сочетание химиотерапии и лучевой терапии), ингибиторов тирозинкиназ (например, ингибиторов тирозинкиназ EGFR), терапии на основе антител и/или ингибиторов пути PD1 (белок программированной клеточной смерти), или пациенту, у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания после применения одного или нескольких указанных выше вариантов лечения.

В этом контексте ингибитор пути PD-1 предпочтительно в настоящем описании представляет собой соединение, которое нарушает путь передачи сигнала PD-1, предпочтительно передачи сигнала, опосредуемого рецептором PD-1. Таким образом, ингибитор пути PD-1 может представлять собой любой ингибитор, направленный против любого представителя пути PD-1, который может оказывать антагонистическое действие на путь передачи сигнала PD-1. В этом контексте ингибитор может представлять собой антагонистическое антитело, мишенью которого является любой представитель пути PD-1, предпочтительно направленное против рецептора PD-1, PD-L1 (лиганд PD) или PD-L2. Указанное антагонистическое антитело может кодироваться также нуклеиновой кислотой. Кроме того, ингибитор пути PD-1 может представлять собой фрагмент рецептора PD-1 или лиганды PD1, блокирующие активность PD1-рецептора. B7-1 или его фрагменты могут действовать также в качестве ингибирующих PD1 лигандов. Кроме того, ингибитор пути PD-1 может представлять собой siРНК (малая интерферирующая РНК) или антисмысловую РНК, направленную против представителя пути PD-1, предпочтительно PD-1, PD-L1 или PD-L2. Кроме того, ингибитор пути PD-1 может представлять собой белок, содержащий аминокислотную последовательность (или нуклеиновую кислоту, кодирующую ее), которая обладает способностью связываться с PD-1, но препятствует передаче сигнала PD-1, например, путем ингибирования взаимодействия PD-1 и B7-H1 или B7-DL. Кроме того, ингибитор PD-1-пути может представлять собой низкомолекулярный ингибитор, обладающий способностью ингибировать путь передачи сигнала PD-1, например, PD-1-связывающий пептид или малую органическую молекулу.

Кроме того, в этом контексте ингибитор тирозинкиназы в настоящем описании предпочтительно представляет собой соединение, которое обладает способностью нарушать передачу сигнала одной или нескольких тирозинкиназ, предпочтительно одной или нескольких тирозинкиназ факторов роста. Предпочтительно применяемый в данном контексте ингибитор тирозинкиназы представляет собой ингибитор тирозинкиназного рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В предпочтительном варианте осуществления изобретения ингибитор тирозинкиназы, применяемый согласно настоящему описанию, представляет собой предназначенный для орального применения ингибитор тирозинкиназы EGFR. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения ингибитор тирозинкиназы выбирают из группы, включающей эрлотиниб, gefитиниб или афатиниб. В другом варианте осуществления изобретения ингибитор тирозинкиназы, применяемый в данном контексте, представляет собой ингибитор ALK (киназа анапластической лимфомы), предпочтительно кризотиниб или церитиниб.

В контексте настоящего описания антитело, которое применяют в терапии на основе антител, предпочтительно направлено против фактора роста или рецептора фактора роста, который предпочтительно функционально связан с тирозинкиназой. В этом контексте предпочтительно антитело направлено против сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) или против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В предпочтительном варианте осуществления изобретения в терапии на основе антитела используют бевацизумаб. В другом варианте осуществления изобретения в терапии на основе антитела используют цетуксимаб.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента до или после хирургического вмешательства (например, лобэктомии), где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии I или II.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, получающего лучевую терапию, или пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после лучевой терапии, где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии I или II.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, получающего химиотерапию, предпочтительно химиотерапию на основе препаратов платины или комбинированную химиотерапию, включающую препараты платины (например, цисплатин, карбоплатин, цисплатин в сочетании с винорелбином, цисплатин в сочетании с этопозидом, цисплатин в сочетании с гемцитабином, цисплатин в сочетании с таксанами, цисплатин или карбоплатин в сочетании с преметрекседом, или карбоплатин в сочетании с паклитакселом), или пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии, где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии III или IV.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, получающего химиотерапию, предпочтительно химиотерапию на основе препаратов платины или комбинированную химиотерапию, включающую препараты платины (например, цисплатин, карбоплатин, цисплатин в сочетании с винорелбином, цисплатин в сочетании с этопозидом, цисплатин в сочетании с гемцитабином, цисплатин в сочетании с таксанами, цисплатин или карбоплатин в сочетании с преметрекседом, или карбоплатин в сочетании с паклитакселом), в сочетании с лучевой терапией (хеморадиация), или пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после хеморадиации, где пациент предпочтительно страдает NSCLC на стадии III (предпочтительно местно распространенным) или на стадии IV.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, получающего только одну химиотерапию, предпочтительно гемцитабином, таксанами, преметрекседом, паклитакселом, винорелбином или этопозидом, предпочтительно в качестве лечения второй линии или третьей линии, или пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после указанного лечения второй линии или третьей линии.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) после химиотерапии первой линии и необязательно второй линии (например, химиотерапии на основе препаратов платины или комбинированной терапии, включающей препараты платины (комбинация химиотерапии на основе препаратов платины по меньшей мере с одним дополнительным химиотерапевтическим средством)) или хеморадиации первой линии и необязательно второй линии, где у пациента достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии первой линии и необязательно второй линии.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с неплоскоклеточной гистологией с мутациями, активирующими рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), или без указанных мутаций.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с плоскоклеточной гистологией с мутациями, активирующими рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), или без указанных мутаций.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с неплоскоклеточной гистологией, предпочтительно без мутаций, активирующих рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), у которого предпочтительно достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии первой линии с применением химиотерапии на основе препаратов платины или комбинации, включающей препараты платины (например, платину и пеметрексед).

Согласно другому варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с плоскоклеточной гистологией, у которого предпочтительно достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии первой линии с применением химиотерапии на основе препаратов платины или комбинации, включающей препараты платины (например, платину и пеметрексед).

Еще более предпочтительно индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, который страдает метастатическим раком легких, предпочтительно метастатическим немелкоклеточным раком легких.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III местнораспространенного NSCLC, предпочтительно получающего сопутствующее лечение хеморадиацией (например, описанное выше), или у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания (отсутствие прогрессирования) после хеморадиации (указанной в настоящем описании).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или IV NSCLC, вне зависимости от гистологического или молекулярного подтипа, и предпочтительно получающего сопутствующее лечение ингибитором пути PD-1, и у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания (отсутствие прогрессирования) после лечения ингибитором пути PD-1.

Кроме того, согласно конкретному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, получающего антитело или комбинацию химиотерапии и антитела, предпочтительно бевацизумаб или комбинацию бевацизумаба с химиотерапией, предпочтительно химиотерапией на основе платины, или пациента, у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания после указанного лечения.

Согласно другому особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, получающего ингибитор тирозинкиназы, предпочтительно ингибитор тирозинкиназы EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб или афатиниб) и предпочтительно в виде лечения второй линии после химиотерапии первой линии, или пациента, у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания после терапии с использованием ингибитора тирозинкиназы EGFR.

Согласно другому особенно предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, который несет активирующую EGFR мутацию и который получает ингибитор тирозинкиназы, предпочтительно ингибитор тирозинкиназы EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб или афатиниб), или пациента, у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания после терапии с использованием ингибитора тирозинкиназы EGFR.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента со стадией III или IV NSCLC и предпочтительно с немелкоклеточной гистологией, предпочтительно несущий активирующую EGFR мутацию, и который предпочтительно получает сопутствующее лечение ингибитором тирозинкиназы EGFR, или пациента, у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания после терапии с использованием ингибитора тирозинкиназы EGFR (например, эрлотиниба, gefитиниба или афатиниба или других ингибиторов тирозинкиназы EGFR).

Согласно другому варианту осуществления изобретения индивидуум, которого обрабатывают предлагаемой в изобретении композицией или вакциной, представляет собой пациента, который получает ингибитор тирозинкиназы кризотиниб или церитиниб или другие ингибиторы ALK.

Аналогично этому изобретение относится также к применению предлагаемой в изобретении вакцины per se или по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует антигены, указанные в настоящем описании, для индукции адаптивного иммунного ответа у млекопитающего, предпочтительно для лечения рака легких, более предпочтительно для лечения состояния, связанного с немелкоклеточным раком легких (NSCLC), указанного в настоящем описании.

Профилактику или лечение рака легких у пациента, нуждающегося в таком лечении, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний и нарушений, можно осуществлять путем введения предлагаемой в изобретении композиции и/или предлагаемой в изобретении вакцины одновременно или поочередно, например, в виде набора компонентов, где каждый компонент содержит по меньшей мере один из предпочтительно различных антигенов. Предпочтительно каждый антиген вводят по отдельности, т.е. каждый антиген вводят в отличную от других часть или область организма индивидуума, подлежащего лечению, предпочтительно одновременно или в пределах одинаковых коротких временных рамок соответственно. В предпочтительном варианте осуществления изобретения введение индивидуальных мРНК распределяют по четырем конечностям индивидуума (т.е. левые/правые верхние и нижние конечности). Предпочтительно введение (всех из по меньшей мере одной мРНК) осуществляют в пределах 1 ч, более предпочтительно 30 мин, еще более предпочтительно 15, 10, 5, 4, 3 или 2 мин или даже 1 мин.

Для введения предпочтительно можно использовать любой из указанных выше путей введения, который можно применять для лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений, путем индукции или усиления адаптивного иммунного ответа на основе антигенов, кодируемых по меньшей мере одной мРНК, входящей в предлагаемую в изобретении композицию. Введение предлагаемой в изобретении композиции и/или вакцины можно осуществлять до, одновременно и/или последовательно с введением другой предлагаемой в изобретении композиции и/или вакцины, указанной в настоящем описании, которая может дополнительно содержать другую комбинацию мРНК, кодирующих различные антигены, где каждый антиген, кодируемый по меньшей мере одной мРНК, входящей в предлагаемую в изобретении композицию, предпочтительно можно применять для терапии рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений. В этом контексте терапия согласно настоящему описанию может включать также модуляцию заболевания, ассоциированного с раком легких, предпочтительно немелкоклеточным раком легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений.

Одним из следующих объектов настоящего изобретения является также применение предлагаемой в изобретении композиции или по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует антигены, указанные в настоящем описании (для приготовления (предлагаемой в изобретении) вакцины), для модуляции, предпочтительно для индукции или усиления иммунного ответа у млекопитающего, указанного выше, более

предпочтительно для лечения и/или поддержания лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений. В этом контексте поддержание лечения рака легких может представлять собой любую комбинацию общепринятых методов лечения рака легких, таких как хирургия, лучевая терапия, химиотерапия (например, химиотерапия первой линии или второй линии), хеморадиация, лечение с использованием ингибиторов тирозинкиназ, лечение с использованием ингибиторов пути PD-1, терапия на основе антител или определенная их комбинация, и терапия с применением предлагаемой в изобретении композиции, указанной в настоящем описании. Поддержание лечения рака легких может также подпадать под любой другой вариант осуществления изобретения, указанный в настоящем описании. Таким образом, любое применение предлагаемой в изобретении композиции или вакцины для совместной терапии с использованием любого из вышеуказанных терапевтических подходов, прежде всего в сочетании с хирургией, лучевой терапией, химиотерапией, хеморадиацией и/или с лечением ингибиторами киназ или антителами, подпадает под объем настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких, которое включает также химиотерапию (например, химиотерапию первой линии или второй линии), лучевую терапию, хеморадиацию (сочетание химиотерапии и лучевой терапии), применение ингибиторов тирозинкиназ (например, ингибиторов тирозинкиназы EGFR), терапию на основе антител и/или применение ингибиторов пути PD1, или для лечения пациента, у которого достигнут частичный ответ или достигнута стабилизация заболевания после получения одного или нескольких вариантов лечения, указанных выше.

В этом контексте ингибитор пути PD-1 предпочтительно в настоящем описании представляет собой соединение, которое может нарушать путь передачи сигнала PD-1, предпочтительно передачи сигнала, опосредуемого рецептором PD-1. Таким образом, ингибитор пути PD-1 может представлять собой любой ингибитор, направленный против любого представителя пути PD-1, который может оказывать антагонистическое действие на путь передачи сигнала PD-1. В этом контексте ингибитор может представлять собой антагонистическое антитело, мишенью которого является любой представитель пути PD-1, предпочтительно направленное против рецептора PD-1, PD-L1 или PD-L2. Указанное антагонистическое антитело может кодироваться также нуклеиновой кислотой. Кроме того, ингибитор пути PD-1 может представлять собой фрагмент рецептора PD-1 или лиганды PD1, блокирующие активность PD1-рецептора. B7-1 или его фрагменты могут действовать также в качестве ингибирующих PD1 лигандов. Кроме того, ингибитор пути PD-1 может представлять собой siРНК (малая интерферирующая РНК) или антисмысловую РНК, направленную против представителя пути PD-1, предпочтительно PD-1, PD-L1 или PD-L2. Кроме того, ингибитор пути PD-1 может представлять собой белок, содержащий (или нуклеиновую кислоту, кодирующий) аминокислотную последовательность, которая обладает способностью связываться с PD-1, но препятствует передаче сигнала PD-1, например, путем ингибирования взаимодействия PD-1 и B7-H1 или B7-DL. Кроме того, ингибитор PD-1-пути может представлять собой низкомолекулярный ингибитор, обладающий способностью ингибировать путь передачи сигнала PD-1, например PD-1-связывающий пептид или малую органическую молекулу.

В контексте настоящего описания антитело, которое применяют в терапии на основе антител, предпочтительно направлено против фактора роста или рецептора фактора роста, который предпочтительно функционально связан с тирозинкиназой. В этом контексте предпочтительно антитело направлено против сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) или против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В предпочтительном варианте осуществления изобретения в терапии на основе антитела используют бевацизумаб. В другом варианте осуществления изобретения в терапии на основе антитела используют цетуксимаб.

Предпочтительно композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких, которое включает также лучевую терапию, если по меньшей мере один пораженный опухолью участок доступен для облучения. Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения пораженный опухолью участок, доступный для облучения, выбирают из группы, включающей метастазы в кость, лимфатические узлы, прежде всего надключичные, подмышечные или в шейной области, кожные или подкожные метастазы и повреждения грудной области (опухоль легкого центральной локализации, лимфатические узлы в воротах легких или в средостении). Предпочтительно излучение применяют в виде 4-дневных серий по 5 Гр каждая в течение 1 недели, предпочтительно в дни 9-12.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких, которое включает также применение ингибитора киназы. При этом ингибитор киназы предпочтительно представляет собой ингибитор тирозинкиназы, еще более предпочтительно ингибитор тирозинкиназы фактора роста, наиболее предпочтительно применяемого оральный путем ингибитора тирозинкиназы EGFR, такого, например, как гефитиниб, эрлотиниб или афатиниб. Кроме того, в этом контексте предпочтительно в настоящем описании под ингибитором тирозинкиназы подразумевается соединение, обладающее способностью нарушать передачу сигнала одной или нескольких тирозинкиназ, предпочтительно одной или нескольких тирозинкиназ факторов роста. В другом варианте осуществления изобретения ингибитор тирозинкиназы в контек-

сте настоящего описания представляет собой ингибитор ALK, предпочтительно кризотиниб или церитиниб.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких, которое включает также применение химиотерапевтического средства, такого как соединение на основе платины (например, карбоплатина, цисплатина), пеметрекседа, гемцитабина, таксана, винорелбина, этопозиды, доцетаксела или паклитаксела. Еще более предпочтительно композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения пациента, который получает химиотерапию, предпочтительно комбинированную химиотерапию, включающую препараты платины, предпочтительно указанную выше, которую предпочтительно объединяют с лучевой терапией (хеморадиация).

Предпочтительно композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют в комбинированной терапии рака легких, если пациент имеет стадию 0, I (IA и/или IB), II (IIA и/или IIB), III (IIIA и/или IIIB) или стадию IV немелкоклеточного рака легких.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента до или после хирургического вмешательства (например, лобэктомии), где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии I или II.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, получающего лучевую терапию, или у пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после лучевой терапии, где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии I или II.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, получающего химиотерапию, предпочтительно химиотерапию на основе препаратов платины или комбинированную химиотерапию, включающую препараты платины (например, цисплатин, карбоплатин, цисплатин в сочетании с винорелбином, цисплатин в сочетании с этопозидом, цисплатин в сочетании с гемцитабином, цисплатин в сочетании с таксанами, цисплатин или карбоплатин в сочетании с пеметрекседом или карбоплатин в сочетании с паклитакселом), или у пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или стабильное состояние болезни (SD) после химиотерапии, где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии III или IV.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, получающего химиотерапию, предпочтительно химиотерапию на основе препаратов платины или комбинированную химиотерапию, включающую препараты платины (например, цисплатин, карбоплатин, цисплатин в сочетании с винорелбином, цисплатин в сочетании с этопозидом, цисплатин в сочетании с гемцитабином, цисплатин в сочетании с таксанами, цисплатин или карбоплатин в сочетании с пеметрекседом или карбоплатин в сочетании с паклитакселом), в сочетании с лучевой терапией (хеморадиация), или пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после хеморадиации, где пациент предпочтительно страдает NSCLC стадии III (предпочтительно местнораспространенный) или IV.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, получающего только одну химиотерапию, предпочтительно гемцитабином, таксанами, пеметрекседом, паклитакселом, винорелбином или этопозидом, предпочтительно в качестве лечения второй линии или третьей линии, или пациента, у которого достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после указанного лечения второй линии или третьей линии.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) после химиотерапии первой линии и необязательно второй линии (например, химиотерапии на основе препаратов платины или комбинированной терапии, включающей препараты платины (комбинация химиотерапии на основе препаратов платины по меньшей мере с одним дополнительным химиотерапевтическим средством)) или хеморадиации первой линии и необязательно второй линии, где у пациента предпочтительно достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии первой линии и необязательно второй линии.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с неплоскоклеточной гистологией с мутациями, активирующими рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) или без указанных мутаций.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с плоскоклеточной гистологией с мутациями, активирующими рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), или без указанных мутаций.

Согласно наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вак-

цину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с неплоскоклеточной гистологией, предпочтительно без мутаций, активирующих рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), у которого предпочтительно достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии первой линии с применением химиотерапии на основе платины или комбинированной химиотерапии, включающей платину (например, платину и пеметрексед).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и с плоскоклеточной гистологией, у которого предпочтительно достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после химиотерапии первой линии с применением химиотерапии на основе платины или комбинированной химиотерапии, включающей платину (например, платину и пеметрексед).

Еще более предпочтительно композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, который страдает метастатическим раком легких, предпочтительно метастатическим немелкоклеточным раком легких.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III местнораспространенного NSCLC, где пациент предпочтительно получает сопутствующее лечение хеморадиацией (например, описанное выше), или у пациента достигнут ответ или достигнута стабилизация заболевания (отсутствие прогрессирования) после хеморадиации (указанной в настоящем описании).

Согласно другому варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или IV NSCLC, вне зависимости от гистологического или молекулярного подтипа, и предпочтительно получающего сопутствующее лечение ингибитором пути PD-1, и у которого достигнут ответ или достигнута стабилизация заболевания (отсутствие прогрессирования) после лечения ингибитором пути PD-1.

Кроме того, согласно конкретному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, получающего антитело или комбинацию химиотерапии и антитела, предпочтительно бевацизумаб или комбинацию бевацизумаба с химиотерапией, предпочтительно химиотерапией на основе платины, или пациента, у которого достигнут ответ или достигнута стабилизация заболевания после указанного лечения.

Согласно другому наиболее предпочтительному варианту осуществления композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, получающего ингибитор тирозинкиназы, предпочтительно ингибитор тирозинкиназы EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб или афатиниб) и предпочтительно в виде лечения второй линии после химиотерапии первой линии, или пациента, у которого достигнут ответ или стабильное состояние болезни после терапии с использованием ингибитора тирозинкиназы EGFR.

Согласно другому наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, который несет активирующую EGFR мутацию и который получает ингибитор тирозинкиназы, предпочтительно ингибитор тирозинкиназы EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб или афатиниб), или пациента, у которого достигнут ответ или достигнута стабилизация заболевания после терапии с использованием ингибитора тирозинкиназы EGFR.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента со стадией III или IV NSCLC и предпочтительно с немелкоклеточной гистологией, предпочтительно несущего активирующую EGFR мутацию, и который предпочтительно получает сопутствующее лечение ингибитором тирозинкиназы EGFR, или пациента, у которого достигнут ответ или достигнута стабилизация заболевания после терапии с использованием ингибитора тирозинкиназы EGFR (например, эрлотиниба, gefитиниба или афатиниба или других ингибиторов тирозинкиназы EGFR).

Согласно другому варианту осуществления изобретения композицию или вакцину, предлагаемую в изобретении, применяют для лечения рака легких у пациента, который получает ингибитор тирозинкиназы кризотиниб или церитиниб или другие ингибиторы ALK.

Протокол иммунизации для иммунизации индивидуума против комбинации по меньшей мере шести антигенов, указанных в настоящем описании, как правило, включает серии разовых доз или системы доз предлагаемой в изобретении композиции или предлагаемой в изобретении вакцины. В контексте настоящего описания понятие разовая доза относится к начальной/первой дозе, второй дозе или любым следующим дозам соответственно, которые предпочтительно вводят для того, чтобы "активировать" иммунную реакцию. В этом контексте каждая разовая система дозирования включает введение всех по меньшей мере из шести антигенов, предлагаемых в изобретении, при этом интервал между введением двух разовых доз может варьироваться от по меньшей мере одного дня, предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, до по меньшей мере одной недели, предпочтительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель. Интервалы между разовыми дозами могут быть постоянным или могут изменяться в процессе протокола иммунизации,

например, интервалы могут быть короче в начале и удлиняться к концу осуществления протокола. В зависимости от общего количества разовых доз и интервалов между разовыми дозами протокол иммунизации можно осуществлять в течение периода времени, который предпочтительно составляет по меньшей мере одну неделю, более предпочтительно несколько недель (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель), еще более предпочтительно несколько месяцев (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца). Каждая разовая система дозирования включает введение всех по меньшей мере из шести антигенов, указанных в настоящем описании, поэтому может включать по меньшей мере одну, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 инъекций. В случае, когда применяют композицию, предлагаемую в изобретении, разовая доза, как правило, предусматривает одну инъекцию. В случае, когда вакцина содержит различные препаративные формы мРНК, которые кодируют соответствующие антигены, предлагаемые в изобретении, минимальное количество инъекций, осуществляемых при разовой системе введения, соответствует количеству отдельных компонентов в вакцине. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение разовой дозы может включать более одной инъекции каждого компонента вакцины (например, конкретной препаративной формы мРНК, содержащей мРНК, которая, например, кодирует один из шести антигенов, предлагаемых в изобретении). Например, части общего объема индивидуального компонента вакцины можно инъектировать в различные области организма, что предусматривает осуществлении более одной инъекции. В более конкретном примере разовая доза вакцины, содержащей шесть различных препаративных форм мРНК, каждую из которых вводят в две различные области организма, предусматривает 12 инъекций. Как правило, разовая доза включает все инъекции, необходимые для введения всех компонентов вакцины, при этом для введения индивидуального компонента можно осуществлять более одной инъекции, как изложено выше. В случае, когда введение разовой дозы вакцины, предлагаемой в изобретении, предусматривает осуществление более одной инъекции, инъекции осуществляют практически одновременно или совместно, т.е., как правило, поочередно во временной рамке, которая требуется специалисту для осуществления стадий разовой инъекции, друг за другом. Таким образом, введение разовой системы доз предпочтительно требует периода времени, составляющего несколько минут, например 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 или 60 мин.

Введение предлагаемой в изобретении композиции или по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует указанные в настоящем описании антигены, или предлагаемой в изобретении вакцины можно осуществлять поочередно. Поочередная обработка может представлять собой, например, введение предлагаемой в изобретении композиции или по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует указанные в настоящем описании антигены, или предлагаемой в изобретении вакцины до, одновременно и/или последовательно с общепринятой терапией рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений, например, путем введения предлагаемого в изобретении лекарственного средства или предлагаемой в изобретении композиции или вакцины до, одновременно и/или последовательно с терапией или обработкой, терапевтически приемлемой для лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений. Указанную поочередную обработку можно осуществлять, используя, например, набор, предпочтительно набор компонентов, описанный ниже.

В дополнительном или альтернативном варианте поочередная обработка может включать также введение предлагаемой в изобретении композиции или вакцины, предпочтительно по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует антигены, указанные выше, в форме, когда по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует указанные выше антигены, предпочтительно образующую часть предлагаемой в изобретении композиции или вакцины, вводят параллельно, до или последовательно с другой по меньшей мере одной мРНК, которая кодирует антигены, указанные выше, предпочтительно образующей часть этой же предлагаемой в изобретении композиции или вакцины. Предпочтительно введение (всех по меньшей мере из одной мРНК) осуществляют в течение 1 ч, более предпочтительно в пределах 30 мин, еще более предпочтительно 15, 10, 5, 4, 3 или 2 мин или даже 1 мин. Такую поочередную обработку можно осуществлять, например, с использованием набора, предпочтительно набора компонентов, описанного ниже.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композицию или вакцину вводят повторно, при этом каждое введение предпочтительно предусматривает индивидуальное введение по меньшей мере одной мРНК, предлагаемой в изобретении. В каждый момент введения по меньшей мере одну мРНК можно вводить более одного раза (например, 2 или 3 раза). В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения шесть мРНК (каждая из которых кодирует один из указанных выше антигенов) вводят в каждый момент времени, при этом каждую мРНК вводят дважды путем инъекции, осуществляя тем самым 12 инъекций, распределенных по четырем конечностям.

Последним вариантом осуществления настоящего изобретения являются также наборы, прежде всего наборы компонентов, которые содержат активную (иммуностимулирующую) композицию и/или предлагаемую в изобретении вакцину необязательно в жидком наполнителе для солиubilизации, и обязательно технические инструкции с информацией о введении и дозировке предлагаемой в изобретении композиции и/или предлагаемой в изобретении вакцины. Технические инструкции могут включать информацию о введении и дозировке предлагаемой в изобретении композиции и/или предлагаемой в

изобретении вакцины. Указанные наборы, предпочтительно наборы компонентов можно применять, например, для любых указанных выше вариантов обработок и применения, предпочтительно для применения по меньшей мере одной предлагаемой в изобретении композиции (для приготовления предлагаемого в изобретении лекарственного средства, предпочтительно вакцины) для лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений. Наборы можно использовать также для применения по меньшей мере одной предлагаемой в изобретении композиции (для приготовления предлагаемого в изобретении лекарственного средства, предпочтительно вакцины) для лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений, в котором предлагаемая в изобретении композиция и/или вакцина, поскольку она кодирует по меньшей мере шесть антигенов, может обладать способностью индуцировать или усиливать иммунный ответ у млекопитающего, указанного выше. Указанные наборы можно использовать также для применения по меньшей мере одной предлагаемой в изобретении композиции (для приготовления предлагаемого в изобретении лекарственного средства, предпочтительно вакцины) для модуляции, предпочтительно для вызывания, например для индукции или усиления иммунного ответа у млекопитающего, указанного выше, и предпочтительно для поддерживающего лечения рака легких, предпочтительно немелкоклеточного рака легких, и связанных с ним заболеваний или нарушений. Наборы компонентов, как специальная форма наборов, могут содержать одну или несколько одинаковых или различных активных (иммуностимулирующих) композиций, предлагаемых в изобретении, и/или одну или несколько одинаковых или различных вакцин, предлагаемых в изобретении, в различных компонентах, входящих в состав набора. Наборы компонентов могут содержать также (например, одну) активную (иммуностимулирующую) композицию, предлагаемую в изобретении (например, одну) вакцину, предлагаемую в изобретении, и/или по меньшей мере одну РНК, кодирующую по меньшей мере один антиген, описанный выше, в различных компонентах набора, например каждый компонент набора включает по меньшей мере одну РНК, кодирующую предпочтительно отличный от других антиген. Кроме того, можно использовать комбинацию обоих типов наборов. Наборы компонентов можно использовать, например, при проведении поочередного лечения, например, используя различные составы и/или возрастающие концентрации композиции, предлагаемой в изобретении, вакцины, предлагаемой в изобретении, и/или по меньшей мере одной РНК, кодирующей по меньшей мере один антиген, указанный выше, в процессе одного и того же курса лечения *in vivo*. При необходимости (по техническим причинам) наборы компонентов можно использовать для введения индивидуальной препаративной формы или для введения по меньшей мере одного из антигенов, входящих в состав композиции, предлагаемой в изобретении (т.е. в составе различных компонентов), но при условии, что при этом все еще достигается совместное присутствие различных агентов *in vivo*. Можно использовать, прежде всего, наборы компонентов в качестве специальной формы наборов, в которых каждый компонент содержит по меньшей мере один, предпочтительно отличный от других антиген, указанный выше, при этом все компоненты набора образуют композицию, предлагаемую в изобретении, или вакцину, предлагаемую в изобретении, указанную в настоящем описании. Указанные специфические наборы компонентов предпочтительно можно использовать, например, если различные антигены приготавливают по отдельности в виде различных компонентов набора, но затем их вводят одновременно или поочередно млекопитающему, нуждающемуся в этом. В последнем случае все различные компоненты указанного набора, как правило, вводят в течение короткого промежутка времени, чтобы все антигены присутствовали в организме млекопитающего приблизительно в одно и то же время после введения последнего компонента набора. В предпочтительном варианте осуществления изобретения набор содержит по меньшей мере два компонента, которые содержат шесть мРНК, предлагаемых в изобретении. Предпочтительно все шесть мРНК присутствуют в различных компонентах набора, при этом мРНК предпочтительно являются лиофилизированными. Более предпочтительно набор содержит дополнительно в качестве компонента наполнитель для солиubilизации по меньшей мере одной мРНК, наполнитель предпочтительно представляет собой лагтерированный раствор Рингера. Любой из наборов, описанных выше, можно использовать для лечения, как описано выше.

Преимущества настоящего изобретения.

В настоящем изобретении предложена композиция для лечения рака легких, где композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, которая кодирует по меньшей мере шесть антигенов, обладающих способностью вызывать (адаптивный) иммунный ответ у млекопитающего, в которой антигены выбраны из группы, включающей 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), сурвивин (белок, содержащий бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов 5; BIRC5), NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, STAG1B), MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1), MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2) и MUC1 (муцин 1)). Указанную композицию можно использовать для эффективного лечения рака легких или в качестве поддерживающей терапии в процессе стандартных курсов лечения. Она также позволяет исключать проблемы неконтролируемого производства введенных последовательностей ДНК при применении РНК в таком подходе к путям лечения. мРНК, применяемые в композиции, предлагаемой в изобретении, характеризуются дополнительными существенными преимуществами по сравнению с экспрессирующими системами на основе ДНК, например, в отношении иммунного ответа, иммунизации или вакцинации. Указанные преимущества включают среди

прочего, тот факт, что РНК, интродуцированная в клетку, не интегрируется в ее геном. Это позволяет исключать риск мутации указанного гена, которая может приводить к полной или частичной его инактивации или приводить к ошибочной информации. Кроме того, это позволяет снижать другие риски, связанные с применением ДНК в качестве агента, индуцирующего иммунный ответ (например, в качестве вакцины), такие как индукция патогенных антител к ДНК у пациента, которому вводят чужеродную ДНК, что может приводить к (возможно, фатальному) иммунному ответу. В противоположность этому образование каких-либо антител к РНК к настоящему времени не установлено.

Описание чертежей

Представленные ниже чертежи предназначены для дополнительной иллюстрации изобретения. Они не направлены на ограничение сущности и объема изобретения.

На чертежах показано

на фиг. 1 - последовательность мРНК 5T4 (GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 1), кодирующая 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG). мРНК содержит следующие элементы: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующая 5T4, представленная в SEQ ID NO: 3, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост);

на фиг. 2 - последовательность мРНК 5T4 (GC)-muag-A64-C30-гистон SL (гистоночная структура типа "стебель-петля") (SEQ ID NO: 19), кодирующая 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG). мРНК содержит следующие элементы: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующая 5T4, представленная в SEQ ID NO: 3, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост); и последовательность гистоночной структуры типа "стебель-петля", представленная в SEQ ID NO: 72;

на фиг. 3 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), представленная в SEQ ID NO: 2, т.е. кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), без кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием GC;

на фиг. 4 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), представленная в SEQ ID NO: 3;

на фиг. 5 - последовательность мРНК сурвивина (GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 4), кодирующая сурвивин (белок 5, содержащий бакуловирусный IAP повторов; BIRC5). мРНК содержит следующие элементы: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим сурвивин, представленная в SEQ ID NO: 6, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост);

на фиг. 6 - последовательность мРНК сурвивина (GC)-muag-A64-C30-гистон SL (SEQ ID NO: 20), кодирующая сурвивин (белок 5, содержащий бакуловирусный IAP повторов; BIRC5). мРНК содержит следующие элементы: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим сурвивин, представленная в SEQ ID NO: 6, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост); и последовательность гистоночной структуры типа "стебель-петля", представленная в SEQ ID NO: 72;

на фиг. 7 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует сурвивин, представленная в SEQ ID NO: 5, т.е. кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует сурвивин, без кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием GC;

на фиг. 8 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая сурвивин, представленная в SEQ ID NO: 6;

на фиг. 9 - последовательность мРНК NY-ESO-1 (GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 7), кодирующая NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, STAG1B). мРНК содержит следующие элементы: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим NY-ESO-1, представленная в SEQ ID NO: 9, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост);

на фиг. 10 - последовательность мРНК NY-ESO-1 (GC)-muag-A64-C30-гистон SL (SEQ ID NO: 21), кодирующая NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, STAG1B). мРНК содержит следующие элементы: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим

NY-ESO-1, представленная в SEQ ID NO: 9, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост); последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", представленная в SEQ ID NO: 72;

на фиг. 11 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, CTAG1B), представленная в SEQ ID NO: 8, т.е. кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует NY-ESO-1, без кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием GC;

на фиг. 12 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, CTAG1B), представленная в SEQ ID NO: 9;

на фиг. 13 - последовательность мРНК MAGE-C1 (ак 613-1142) (GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 10), которая кодирует MAGE-C1, содержащий аминокислотную последовательность, которая содержит ак 613-1142 белка MAGE-C1 дикого типа. мРНК содержит следующие элементы последовательности: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим MAGE-C1 (ак 613-1142), представленная в SEQ ID NO: 25, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост);

на фиг. 14 - последовательность мРНК MAGE-C1 (ак 613-1142) (GC)-muag-A64-C30-гистон SL (SEQ ID NO: 22), которая кодирует MAGE-C1 (ак 613-1142). мРНК содержит следующие элементы последовательности: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим MAGE-C1 (ак 613-1142) представленная в SEQ ID NO: 25, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост); и последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", представленная в SEQ ID NO: 72;

на фиг. 15 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует полноразмерный белок MAGE-C1, представленная в SEQ ID NO: 11, т.е. кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует MAGE-C1 без кодирующей последовательности с оптимизированным содержанием GC;

на фиг. 16 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая полноразмерный белок MAGE-C1, представленная в SEQ ID NO: 12;

на фиг. 17 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая MAGE-C1 (ак 613-1142), представленная в SEQ ID NO: 25;

на фиг. 18 - последовательность мРНК MAGE-C2 (GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 13), которая кодирует MAGE-C2. мРНК содержит следующие элементы последовательности: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим MAGE-C2, представленная в SEQ ID NO: 15, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост);

на фиг. 19 - последовательность мРНК MAGE-C2 (GC)-muag-A64-C30-гистон SL (SEQ ID NO: 21), которая кодирует MAGE-C2. мРНК содержит следующие элементы последовательности: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим MAGE-C2, представленная в SEQ ID NO: 9, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост); последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", представленная в SEQ ID NO: 72;

на фиг. 20 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует MAGE-C2, представленная в SEQ ID NO: 14, т.е. кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует MAGE-C2, но не представляет собой кодирующую последовательность с оптимизированным содержанием GC;

на фиг. 21 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая MAGE-C2, представленная в SEQ ID NO: 15;

на фиг. 22 - последовательность мРНК MUC1 5×VNTR (GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 16), кодирующая MUC1 (муцин 1), которая содержит 5 tandemных повторов. мРНК содержит следующие элементы последовательности: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим MUC1 5×VNTR (GC)-muag-A64-C30, представленная в SEQ ID NO: 18, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост);

на фиг. 23 - последовательность мРНК MUC1 5×VNTR (GC)-muag-A64-C30-гистон SL (SEQ ID NO: 24), кодирующая MUC1 (муцин 1), которая содержит 5 tandemных повторов. мРНК содержит следующие

элементы последовательности: 5'-кэп, кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC для стабилизации и лучшего соответствия наиболее часто встречающимся кодоном, кодирующим MUC1 5×VNTR (GC)-muag-A64-C30, представленная в SEQ ID NO: 18, стабилизирующая последовательность "muag" в 3'UTR, кодирующая SEQ ID NO: 70, ~64 остатка аденозина на 3'-конце (поли-А-хвост), ~30 остатков цитозина на 3'-конце (поли-С-хвост); и последовательность гистоновой структуры типа "стебель-петля", представленная в SEQ ID NO: 72;

на фиг. 24 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует MUC1 5×VNTR, представленная в SEQ ID NO: 17, т.е. кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует MUC1, но не представляет собой кодирующую последовательность с оптимизированным содержанием GC;

на фиг. 25 - кодирующая последовательность с оптимизированным содержанием GC, кодирующая MUC1 5×VNTR, представленная в SEQ ID NO: 18;

на фиг. 26 - результаты определения MUC1-специфического клеточного иммунного ответа, полученные с помощью метода ELISpot (элиспот). Мышей линии C57BL/6 вакцинировали с использованием 32 мкг MUC1-RNActive® (SEQ ID NO: 16) в дни 1, 5, 8, 12 и 15. Осуществляли ex vivo ELISpot-анализ секретируемого IFN-γ в спленоцитах вакцинированных и контрольных мышей в день 6 после последней вакцинации. Клетки стимулировали на планшете с использованием либо полученного из MUC1 пептида (прогнозируемый эпитоп ГКГС-класса I), либо контрольного пептида. На графике представлены индивидуальные экспериментальные точки для отдельных мышей;

на фиг. 27 - данные о воздействии комбинации иммунотерапии на основе мРНК и лучевой терапии при ее применении для лечения низкоиммуногенной и радиорезистентной карциномы легких Льюиса (LLC);

на фиг. 28 - белковая последовательность 5T4 NP_001159864.1, представленная в SEQ ID NO: 75;

на фиг. 29 - белковая последовательность сурвивина (BIRC5) 015392, представленная в SEQ ID NO: 76;

на фиг. 30 - белковая последовательность сурвивина (BIRC5) NP_001159.2, представленная в SEQ ID NO: 77;

на фиг. 31 - белковая последовательность NY-ESO-1 NP_001318.1, представленная в SEQ ID NO: 78;

на фиг. 32 - белковая последовательность MAGE-C1 NP_005453.2, представленная в SEQ ID NO: 79;

на фиг. 33 - белковая последовательность MAGE-C2 NP_057333.1, представленная в SEQ ID NO: 80;

на фиг. 34 - белковая последовательность MUC1, белок J05582.1, представленная в SEQ ID NO: 81;

на фиг. 35 - белковая последовательность белка MUC1 5×VNTR, представленная в SEQ ID NO: 82;

на фиг. 36 - кодирующая последовательность дикого типа, которая кодирует MUC1, представленная в SEQ ID NO: 83, т.е. полноразмерная кодирующая последовательность (CDS), которая кодирует MUC1, но не представляет собой кодирующую последовательность с оптимизированным содержанием GC.

Примеры

Приведенные ниже примеры служат для дополнительной иллюстрации изобретения. Они не направлены на ограничение сущности и объема изобретения.

1. Получение вакцины на основе мРНК MUC1 и индукция антигенспецифических цитотоксических Т-клеток.

1.1. Получение вакцины на основе мРНК MUC1.

мРНК-вакцина состояла из мРНК с оптимизированным содержанием GC, которая кодирует MUC1 (SEQ ID NO: 16). мРНК включали в комплекс с протамином путем добавления протамин к мРНК в соотношении (1:2) (мас./мас.) (адъювантный компонент). После инкубации в течение 10 мин добавляли в таком же количестве свободную мРНК, которую применяли в качестве кодирующей антиген мРНК.

Полученную композицию растворяли в 80 об.% лактированном растворе Рингера.

1.2. Вакцинация.

Мышей линии C57BL/6 вакцинировали путем внутрикожного введения 32 мкг одной из мРНК-вакцин, описанных выше в подпункте 1.1. Контрольных мышей обрабатывали путем внутрикожной инъекции буфера (лактат Рингера). Вакцинация включала пять иммунизаций, которые осуществляли по 2 иммунизации в неделю. Иммунный ответ анализировали через 5 или 6 дней после завершения цикла вакцинации.

1.3. Метод ELISpot - детекция ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).

Для детекции ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) можно визуализировать данные о секретируемом IFN-γ в ответ на специфический стимул на уровне единичной клетки, используя метод ELISpot.

Спленоциты мышей, вакцинированных мРНК-вакциной, описанной выше в подпункте 1.1, и контрольных мышей выделяли через 5 или 6 дней после последней вакцинации и затем переносили в 96-луночные ELISpot-планшеты, сенсibilизированные захватывающим антителом к IFN-γ. Затем клетки

стимулировали в течение 24 ч при 37°C, применяя следующие пептиды:

Происходящий из MUC1 пептид (SEQ ID NO:73)	Происходящий из коннексина пептид (контроль) (SEQ ID NO: 74)
SAPDNRPAL	FEQNTAQF

После периода инкубации клетки вымывали из планшета и выявляли IFN- γ , секретируемый клетками, с использованием биотинилированного вторичного антитела к мышиному IFN- γ , а затем комплекса стрептавидин-АКР (щелочная фосфатаза). Для визуализации пятен применяли субстрат BCIP/NBT и осуществляли количественную оценку с помощью автоматического ELISpot-ридера (анализатор типа Immunospot, ЦТЛ-анализаторы LLC).

Внутрикожная вакцинация с использованием кодирующей MUC1 мРНК приводила к активации антигенспецифических CD8⁺-Т-клеток, что продемонстрировано на основе секреции IFN- γ с помощью ELISpot-анализа.

2. Комбинация вакцинации с использованием мРНК и облучения мышей, несущих низкоиммуногенные (LLC) опухоли.

В этом опыте оценивали эффективность комбинации вакцинации и облучения на мышях линии C57BL/6, несущих низкоиммуногенные (LLC) опухоли.

В день 0 осуществляли контрольное заражение мышей линии C57BL/6 ($n = 10$ на группу) путем подкожного введения сингенных 3LL-клеток (LLC-клетки, экспрессирующие опухолевые антигены EGFR и коннексин) в правую заднюю конечность. Лечение начинали, когда объем опухоли достигал 50 мм³. Мышей либо вакцинировали мРНК, кодирующими EGFR и коннексин (дважды в неделю), либо опухоли облучали 36 Гр, в виде 3 равных доз в 3 последовательных дня, либо мышей подвергали комбинированной терапии (при этом первую вакцинацию осуществляли за 6 ч до второго облучения), что продемонстрировано на фиг. 28. Необработанные мыши служили в качестве контроля. Мониторинг роста опухолей осуществляли, измеряя размер опухолей в трех направлениях с помощью кронциркуля.

Из-за отсутствия экспрессии молекул ГКГС класса I применение только одной иммунотерапии оказалось неэффективным в отношении ингибирования роста опухолей, а лучевая терапия приводила также лишь к кратковременному контролю опухолей. С другой стороны, объединение мРНК-вакцин с лучевой терапией приводило к сильному синергетическому противоопухолевому действию.

3. Клиническое испытание: полученная на основе мРНК противораковая вакцина и местное облучение в качестве средства лечения NSCLC.

Исследуемое лекарственное средство.

В качестве вакцины применяли композицию, содержащую мРНК, которая кодирует 5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG), представленную в SEQ ID NO: 19, мРНК, которая кодирует сурвивин (белок, содержащий бакуловиральный IAP повторов 5; BIRC5), представленную в SEQ ID NO: 20, мРНК, которая кодирует NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1, STAG1B), представленную в SEQ ID NO: 21, мРНК, которая кодирует MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1), представленную в SEQ ID NO: 22, мРНК, которая кодирует MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2), представленную в SEQ ID NO: 23, и мРНК, которая кодирует MUC1 (муцин 1), представленную в SEQ ID NO: 24, включенную в комплекс с протамином согласно описанному в примере 1.1. Каждую из кодирующих антиген мРНК приготавливали в виде стерильного лиофилизата. После восстановления в лактате Рингера получали раствор для внутрикожной инъекции. Лекарственный продукт, применяемый в клиническом испытании, обозначали как CV9202. Он представлял собой вакцину, содержащую шесть компонентов лекарственного продукта, каждый из которых содержит отличную от других кодирующую антиген мРНК.

Изучаемая популяция.

Группа 1: пациенты со стадией IV немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и неплоскоклеточной гистологией, без мутаций, активирующих рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), у которых достигнут частичный ответ (PR) или достигнута стабилизация заболевания (SD) после по меньшей мере 4 циклов химиотерапии первой линии на основе препаратов платины и пеметрекседа, и которым показана поддерживающая терапия пеметрекседом.

Группа 2: пациенты со стадией IV NSCLC и плоскоклеточной гистологией, у которых достигнут PR или достигнута SD после по меньшей мере 4 циклов химиотерапии первой линии на основе препаратов платины и соединения, не включающего платину (комбинированная терапия с включением препаратов платины).

Группа 3: пациенты со стадией IV NSCLC и неплоскоклеточной гистологией, имеющие активирующую EGFR мутацию, у которых достигнут PR после 6-месячного лечения с использованием ингибитора тирозинкиназы (TKI) EGFR.

Исследуемая популяция: критерии включения.

1. Пациенты: возраст >18 лет, с гистологически или цитологически подтвержденной стадией IV NSCLC и с подтвержденным мутантным статусом EGFR в случае неплоскоклеточной гистологии клеток: группа 1: неплоскоклеточный NSCLC без активирующей мутации EGFR,

- группа 2: плоскоклеточный NSCLC,
группа 3: неплоскоклеточный NSCLC с активирующей мутацией EGFR.
2. PR или SD согласно RECIST, версия 1.1 после терапии первой линии, которая включала для группы 1: PR или SD после лечения цисплатином или карбоплатином и пеметрекседом (по меньшей мере 4 цикла),
группы 2: PR или SD после лечения цисплатином или карбоплатином и соединения, не включающего платину (по меньшей мере 4 цикла),
группы 3: PR после лечения гефитинибом, эрлотинибом или афатинибом в течение периода времени вплоть до 6 месяцев.
3. Для пациентов в группе 1 поддерживающая терапия пеметрекседом может быть показана по решению исследователя.
4. Присутствие по меньшей мере одного онкологического повреждения, доступного для излучения с использованием 4×5 Гр, и по меньшей мере одного дополнительного поддающегося измерению онкологического повреждения согласно RECIST, версия 1.1.
- Онкологические повреждения, доступные для облучения, представляют собой метастазы в кость, лимфатические узлы в надключичных, подмышечных или шейных областях, кожные или подкожные метастазы.
- Только для пациентов в группах 1 и 2 повреждения грудной области (опухоль легкого центральной локализации, лимфатические узлы в воротах легких или в средостении).
5. Общее состояние больного: согласно критериям западной кооперированной онкологической научно-исследовательской группы (ECOG): от 0 до 1.
6. Отвечающая требованиям функция органов:
функция костного мозга: гематологические показатели в момент начала вакцинации: гемоглобин ≥ 95 г/л, количество тромбоцитов ≥ 75000 /мкл, лейкоцитов ≥ 2000 /мкл, абсолютное количество нейтрофилов ≥ 1000 /мкл, количество лимфоцитов $\geq 0,8 \times 10^9$ /л.
- Функция печени: АЛТ и АСТ $\leq 2,5$ ВГН (верхняя граница нормы) у пациентов без метастазов в печень и ≤ 5 ВГН у пациентов с метастазами в печень.
- Функция почек: сывороточный креатинин ≤ 2 мг/дл и клиренс креатинина ≥ 45 мл/мин согласно формуле MDRD.
7. Применение высокоэффективной контрацепции у пациентов с детородным потенциалом при включении в опыт и в течение 1 месяца после последней иммунизации.
8. Письменное информированное согласие до осуществления какой-либо связанной с опытом процедуры.
- Продолжительность лечения: каждому пациенту вакцину следует вводить вплоть до прогрессирования заболевания и следует вводить до возникновения потребности в последующем системном лечении второй линии или возникновения неприемлемой токсичности, в зависимости от того, что проявится первым.
- Время проведения скрининга: скрининг пациентов следует начинать через 2 недели после дня 1 последнего цикла химиотерапии первой линии (группы 1 и 2) или в пределах 6 месяцев после начала лечения TKI EGFR (эрлотиниб или гефитиниб) (группа 3).
- Метод введения.
- Каждую кодирующую антиген мРНК вводили индивидуально в один и тот же день в виде двух внутрикожных инъекций по 200 мкл каждая, осуществляя в целом 12 инъекций.
- Первые три вакцинации следует осуществлять с недельным интервалом (дни 1, 8, 15), а затем с интервалами в 2 или 3 недели вплоть до дня 57, с 3-недельными интервалами вплоть до месяца 6 и затем с 6-недельным интервалом согласно протоколу опыта. Вакцинации следует осуществлять вплоть до проявления неприемлемой токсичности или развития опухолей, требующего начала применения системной терапии второй линии.
- В группах 1 и 3 CV9202 следует вводить сначала в дни 1, 8, 15, 36 и 57. При лечении пеметрекседом (группа 1) вакцинацию следует осуществлять за 4-7 дней до следующей предусмотренной схемой приема дозы пеметрекседа. Указанную схему приема выбирают для того, чтобы избегать вакцинации при самом низком уровне нейтрофилов и взаимодействия с противовоспалительными стероидами.
- В группе 2 CV9202 следует вводить сначала в дни 1, 8, 15, 29, 43 и 57. Указанную усиленную схему приема выбирают поскольку пациенты, как ожидается, имеют более короткий промежуток времени до прогрессирования заболевания, поскольку они не получают сопутствующее противораковое лечение.
- Во всех группах пациентов можно продолжать вакцинировать после дня 57 в случае, если не удовлетворяются критерии прекращения лечения. После дня 57 вакцинации следует осуществлять каждые 3 недели вплоть до 6 месяцев со дня первой вакцинации. После 6-месячного периода вакцинации следует осуществлять каждые 6 недель вплоть до удовлетворения критериям прерывания лечения.

Критерии прерывания лечения.

1. Проявление токсичности, требующей длительного прерывания лечения.
2. Развитие заболевания, требующее начала проведения последующего системного лечения.

Введение.

Вакцины: в каждый момент индивидуальной вакцинации каждый из 6 компонентов лекарственного средства следует вводить по отдельности в один и тот же день. Для каждого компонента следует осуществлять две внутрикожные (i.d.) инъекции по 200 мкл каждая, осуществляя в целом 12 инъекций.

Облучение: лучевую терапию следует осуществлять в виде 4-дневной схемы по 5 Гр каждый раз в течение одной недели, предпочтительно со дня 9 по день 12.

Выбор онкологических повреждений для облучения.

Повреждения, выбранные для облучения, должны иметь наиболее длинный диаметр, составляющий по меньшей мере 2 см, и радиационный онколог в месте проведения испытания должен подтвердить, что соответствующее повреждение доступно для облучения согласно настоящему протоколу перед включением пациента в опыт.

Следующие повреждения являются потенциально доступными и их следует выбирать в соответствии со следующим иерархическим порядком:

первая преференция: метастазы в кость,

вторая преференция: лимфатические узлы в надключичных, подмышечных или шейных областях,

третья преференция: кожные или подкожные метастазы,

четвертая преференция: (только для пациентов в группах 1 и 2): повреждения грудной области (опухоль легкого центральной локализации, лимфатические узлы в воротах легких или в средостении).

У пациентов в группе 3 никакие повреждения грудной области не могут быть выбраны для облучения, поскольку эти пациенты имеют более высокий риск лучевого пневмонита из-за сопутствующего лечения TKI EGFR.

Облучение более одного повреждения в соответствии с такой же схемой 4×5 Гр (например, несколько метастазов в кость) допускается, если клинически установлено, что поддающееся измерению повреждение сохранится для оценки ингибирующего ответа. Облучение более чем одного повреждения следует осуществлять в одном и том же временном окне.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация для лечения рака легких, содержащая шесть мРНК, в которой каждая мРНК кодирует другой антиген, выбранный из группы, состоящей из

5T4 (трофобластический гликопротеин, TPBG);

сурвивина (белок 5, содержащий бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных (IAP) повторов; BIRC5);

NY-ESO-1 (Нью-Йоркская плоскоклеточная карцинома пищевода 1; STAG1B);

MAGE-C1 (меланомный антиген семейства C1);

MAGE-C2 (меланомный антиген семейства C2) и

MUC1 (муцин 1),

и каждая из шести мРНК идентична или по меньшей мере на 95% идентична другой последовательности РНК, выбранной из последовательностей РНК, представленных в SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 или 24.

2. Комбинация по п.1, в которой по меньшей мере одна мРНК присутствует в виде комплекса с одним или несколькими поликатионами.

3. Комбинация по п.2, в которой отношение азота/фосфата по меньшей мере одной мРНК и одного или нескольких поликатионов находится в диапазоне примерно от 0,1 до 10.

4. Комбинация по одному из пп.1-3, содержащая по меньшей мере одну РНК, которая присутствует в комплексе с одним или несколькими поликатионами, и по меньшей мере одну свободную РНК.

5. Комбинация по п.4, в которой присутствующая в комплексе РНК идентична свободной РНК.

6. Комбинация по п.4 или 5, в которой молярное отношение присутствующей в комплексе РНК и свободной РНК выбрано из молярного отношения, составляющего примерно от 0,001:1 до примерно 1:0,001.

7. Комбинация по одному из пп.1-6, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант.

8. Комбинация по одному из пп.1-7, в которой по меньшей мере один адъювант выбран из группы, включающей

катионные или поликатионные соединения, содержащие катионные или поликатионные пептиды или белки, включая протамин, нуклеолин, спермин или спермидин, поли-L-лизин (ПЛЛ), полиаргинин, основные полипептиды, проникающие в клетки пептиды (ПКП), включая ВИЧ-связывающие пептиды, Tat, ВИЧ-1 Tat (ВИЧ), полученные из Tat пептиды, пенетратин, полученные из VP22 пептиды или аналогичные пептиды, VP22 HSV (вирус герпеса простого), MAP, KALA или домены белковой трансдукции

(PTD), PpT620, богатые пролином пептиды, богатые аргинином пептиды, богатые лизинем пептиды, MPG-пептид(ы), Pep-1, L-олигомеры, пептид(ы) кальцитонина, пептиды, полученные из *Antennapedia* (прежде всего из *Drosophila antennapedia*), pAntp, pIsl, FGF, лактоферрин, транспортан, буфорин-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, полученные из CT пептиды, SAP, протамин, спермин, спермидин или гистоны, катионные полисахариды, включая хитозан, полибрен, катионные полимеры, включая полиэтиленмин (ПЭИ), катионные липиды, включая DOTMA: хлорид [1-(2,3-сиолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония, DMRIE, ди-C14-амидин, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, СТАР, DOPC, DODAP, DOPE: диолеилфосфатидилэтаноламин, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS: диоктадециламидо-лицилспермин, DIMRI: бромид димиристооксипропилдиметилгидроксиэтиламмония, DOTAP: диолеилокси-3-(триметиламмоний)пропан, DC-6-14: хлорид O,O-дитетрадеканойл-N-(α -триметиламмоний-ацетил)диэтаноламина, CLIP1: хлорид рац[(2,3-диоктадецилоксипропил)(2-гидроксиэтил)]диметиламмония, CLIP6: рац[2-(2,3-дигексадецилоксипропилоксиметилокси)этил]триметиламмоний, CLIP9: рац[2-(2,3-дигексадецилоксипропилоксисукцинилокси)этил]триметиламмоний, олигофектамин, или катионные или поликатионные полимеры, включая модифицированные полиаминокислоты, такие как полимеры β -аминокислот или обращенные полиамиды, модифицированные полиэтилены, включая ПВП (поли(N-этил-4-винилпиридинийбромид)), модифицированные акрилаты, включая пДМАЭМА (поли(диметиламиноэтилметилакрилат)), модифицированные амидоамины, включая пАМАМ (поли(амидо-амин)), модифицированные сложные поли- β -аминоэфир (ПБАЭ), включая модифицированные в диаминоконцевом фрагменте сополимеры 1,4-бутандиолдиакрилата и 5-амино-1-пентанола, дендримеры, включая дендримеры полипропиламина или дендримеры на основе пАМАМ, полиимин(ы), включая ПЭИ: поли(этиленмин), поли(пропиленмин), полиаллиламин, полимеры на основе сахарного каркаса, включая полимеры на основе циклодекстрина, полимеры на основе декстрана, хитозан и т.п., силановые полимеры, такие как сополимеры PMOXA-PDMS и т.п., блок-полимеры, включающие комбинацию одного или нескольких катионных блоков, выбранных из катионного полимера, указанного выше, и одного или нескольких гидрофильных или гидрофобных блоков (таких, например, как полиэтиленгликоль); или

катионные или поликатионные белки или пептиды, выбранные из следующих белков или пептидов, которые имеют общую формулу (I) $(\text{Arg})_l(\text{Lys})_m(\text{His})_n(\text{Orn})_o(\text{Xaa})_x$, где $l+m+n+o+x=8-15$, а l, m, n или o , каждый независимо друг от друга, обозначает любое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, при условии, что общее содержание Arg, Lys, His и Orn составляет по меньшей мере 50% в пересчете на все аминокислоты олигопептида, а Xaa может обозначать любую аминокислоту, выбранную из нативных (встречающихся в естественных условиях) или ненативных аминокислот, за исключением Arg, Lys, His или Orn, и x может обозначать любое число, выбранное из 0, 1, 2, 3 или 4, при условии, что общее содержание Xaa не превышает 50% в пересчете на все аминокислоты олигопептида; или

нуклеиновые кислоты, имеющие формулу (II) $G_lX_mG_n$, в которой G обозначает гуанозин, урацил или аналог гуанозина или урацила; X обозначает гуанозин, урацил, аденозин, тимидин, цитозин или аналог вышеуказанных нуклеотидов; l обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда $l = 1$, то G представляет собой гуанозин или его аналог, когда $l > 1$, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой гуанозин или его аналог; m обозначает целое число и обозначает по меньшей мере 3; при этом, когда $m = 3$, то X представляет собой урацил или его аналог, когда $m > 3$, то присутствуют по меньшей мере 3 последовательно расположенных урацила или аналогов урацила; n обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда $n = 1$, то G представляет собой гуанозин или его аналог, когда $n > 1$, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой гуанозин или его аналог; или

нуклеиновые кислоты, имеющие формулу (III) $C_lX_mC_n$, в которой C обозначает цитозин, урацил или аналог цитозина или урацила; X обозначает гуанозин, урацил, аденозин, тимидин, цитозин или аналог вышеуказанных нуклеотидов; l обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда $l = 1$, то C представляет собой цитозин или его аналог, когда $l > 1$, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой цитозин или его аналог; m обозначает целое число и обозначает по меньшей мере 3; когда $m = 3$, X представляет собой урацил или его аналог, когда $m > 3$, то присутствуют по меньшей мере 3 последовательно расположенных урацила или аналогов урацила; n обозначает целое число от 1 до 40, при этом, когда $n = 1$, то C представляет собой цитозин или его аналог, когда $n > 1$, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой цитозин или его аналог.

9. Комбинация по п.1, где рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

10. Комбинация по п.9, дополнительно включающая ингибитор тирозинкиназы.

11. Комбинация по п.10, где ингибитор тирозинкиназы выбран из эрлотиниба, gefитиниба или афатиниба.

12. Комбинация по п.9, дополнительно включающая ингибитор PD1 пути.

13. Комбинация по п.9, дополнительно включающая химиотерапевтическое средство на основе препаратов платины.

14. Вакцина для лечения рака легких, содержащая комбинацию по одному из пп.1-13.

15. Вакцина по п.14, где вакцина дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

16. Вакцина по любому из пп.14, 15, содержащая по меньшей мере одну из мРНК комбинации по п.1.
17. Применение комбинации по п.1 для лечения рака легких.
18. Способ лечения рака легких, предусматривающий введение комбинации по п.1, причем мРНК вводят по отдельности.
19. Способ по п.18, в котором мРНК вводят путем внутрикожной инъекции.
20. Способ по п.18, дополнительно включающий введение ингибитора PD1 пути.
21. Способ по п.18, дополнительно включающий введение химиотерапевтического средства.
22. Способ по п.21, где химиотерапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из веществ на основе платины, пеметрекседа, гемцитабина, таксана, винорелбина, этопозиды, доцетаксела или паклитаксела.
23. Способ по любому из пп.18-21, дополнительно включающий лучевую терапию.
24. Способ по п.18, дополнительно включающий введение ингибитора тирозинкиназы.
25. Способ по п.24, где ингибитор тирозинкиназы выбран из эрлотиниба, gefitinibi или афатиниба.
26. Способ по любому из пп.18-25, где композиция или вакцина используется для лечения пациента с III или IV стадией немелкоклеточного рака легких.
27. Способ по п.26, где немелкоклеточный рак легких характеризуется неплоскоклеточной гистологией.
28. Набор для лечения рака легких, состоящий по меньшей мере из одного компонента, содержащего комбинацию по одному из пп.1-13 или вакцину по одному из пп.14-16, жидкий наполнитель для солюбилизации и технические инструкции с информацией о применении и дозировке композиции или вакцины.
29. Набор по п.28, где набор содержит по меньшей мере два компонента, каждый из которых содержит шесть мРНК.
30. Набор по одному из пп.28, 29, где набор содержит шесть компонентов, каждый из которых содержит одну из шести мРНК.
31. Набор по п.29, в котором все шесть мРНК присутствуют в лиофилизированной форме в различных компонентах.
32. Набор по п.31, где набор дополнительно содержит лагированный раствор Рингера.

5T4 (GC)-muag-A64-C30

GGGAGAAAGCGUACCAUGCCCGGGGUGGACAGCCGGGCCCGGGCCCGGGGACGGCCG
 CUGCGGCUCGCGGCCUGGCCUGGUGUCUCCUGGGUGG3UUCUCCAGCUCUCCAGCCCCACC
 UCCAGCGCCUCCAGCUUCUCCAGCUCUCCGCCCCUUCUUGGCCAGCGCGGUGUCCGCCAG
 CCCCCGUCUCCCGACCAGUGUCCCCGCCUGUGCGAGUGAGCGAGGCCGCGCGGACCUGUG
 AAGUGCGUCAACCGCAACCUAGACGGAGGUGCCACCGACCUCCCGGCCUACGUGCGGAAC
 CUGUUCUGUACCGGCAACAGCUCGCGCUCCUGCCGCGGCGCCUUCGCGCGCCGGCCG
 CCCCUGGCCAGCUCGCGGCCUGAACCUGUCCGGGAGCGCCUUCGACGAGGUGCGGGCC
 GCGCGUUCGAGCACCUGCCGUCUCCUGCGCCAGCUCGACCUAGGCCACAACCCCCUGGCC
 GACCUCUCCCCUUCGCCUUCAGCGGGAGCAACGCCUCCGUGAGCGCCCCUCCCCGUG
 GUCGAGCUGAUCCUCAACCAUAGUGUCCCCCGAGGACGAGCGGCAGAACCGCAGCUUC
 GAGGGCAUGGUGGUCGCGGCCUUGUGGCCGGGCGGGCCUCCAGGGCCUGCGCCGGCUG
 GAGCUCGCCUCCAACCACUUCUGUACCUGCCCGCGACGUGCUCGCGCAGCUGCCGAGC
 UUGCGGCACCUCGACCUGUCCAACAACAGCCUGGUGUCCUACCUACGUCAGCUUCCGC
 AACCUAGCGCACCUGGAGUCCUCCACCUGGAGGACAACGCCCUAGAAGGUGCUGCAACAAC
 GGCACCUCGCGGAGCUGAGGGGCGGCCACAUCGGGGUGUUCUUCGACAACAACCCC
 UGGGUCUGCGACUCCACAUGGCCGCAUGGUGUACCUGGUCUAAGGAGACCAGGUGGUC
 CAGGGCAAGGACCGCCUGACGUGCGCGUACCCCGAGAAGAUGCGGAACCGGGUGCUCCUG
 GAGCUGAACAGCGCCGACCUCGACUUGCGACCCGAUCCUGCCCCCUCCUGCAGACCAGC
 UACGUGUUCUUGGGAUUGUCCUGGCCUUGAUUGGCGCCAUUUCUCCUGGUGCUGUAC
 CUAACCGCAAGGGCAUCAAGAUGGAUGCACAACAUCGGGACGCCUGCCGCGACCAC
 AUGGAGGGGUUACCACUACCGGUACGAGAUCAACGCGGACCCCCGCCUGACCAACCUUGCC
 AGCAACUCCGACGUCUGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACG
 GGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCAGAUUAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAUUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCUCUAGACA AUUGAAUU

Фиг. 1

5T4 (GC)-muag-A64-C30-гистонSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGCCCGGCGGGUGCAGCCGGGGCCCGGCCGCCGGGACGGCCGC
 CUGCGGCUCGCGGCCUGGCCUUGUGCUCCUGGGUGGGUCUCCAGCUCCAGCCCCACC
 UCCAGCGCCUCCAGCUUCUCCAGCUCCGCCCCUUCUGGCCAGCGCGGUGUCCGCCACG
 CCCCUGUCCCCGACCAGUCCCCGCCUUGUGCGAGUGCAGCGAGGCCGCGCGACCGUG
 AAGUGCGUACAACGCAACCUAGCGGAGGUGCCACCGACCUCCCGGCCUACGUGCGGAAC
 CUGUUCUGACCGGCAACAGCUCGCCGUCCUGCCCGCGCGCCUUCGCGCGCCGGCCG
 CCCCUGGCCGAGCUCGCCGCCUGAACCUUGCCGGAGCCGCCUCCGACGAGGUGCGGGCC
 GGGCGUUCGAGCACCUGCCGUCCUUGCGCCAGCUCGACCJGAGCCACAACCCCUUGGCC
 GACCUCUCCCCUUGCCUUCAGCGGGAGCAACGCCUCCJGAGCGCCCCUCCCCGUG
 GUCGAGCUGAUCCUCAACCACAUCGUGCCCCCGAGGACGAGCGGAGAACCGAGCUUC
 GAGGGCAUGGUGGUGCGGCCUUGUGGCCGGCGGGCCUCCAGGGCCUGCGCCGGCUG
 GAGCUCGCCUCCAACCACUUCUGUACCUGCCCGGACGUGCUCGCGCAGCUGCCGAGC
 CUGCGGCACCUCGACCUUGUCCAACAACAGCCUGGUGUCCUACCUACGUCAGCUUCCGC
 AACCUGACGCAACUGGAGUCCUCCACCUGGAGGACAACGCCUUGAAGGUGCUGACAAC
 GGCACCCUCGCCGAGCUGCAGGGGUGCCCCACAUCGGGUGUUCUCCGACAACAACCCC
 UGGGUGUGCGACUGCCACAUGGCCGACAUGGUGACCUGGCUGAAGGAGACCGAGGUGGUC
 CAGGGCAAGGACCGCCUGACGUGCGCUACCCCGAGAAGAUCCGGAACCGGGUGCUCCUG
 GAGCUGAACAGCGCCGACCUCCGACUGCGACCCGAUCCUGCCCCUCCUGCAGACCAGC
 UACGUGUUCUCCGGGAUCGUCCUGGCCUGAUCGGCGCAUCUUCUCCUGGUGCUGUAC
 CUCAACCGCAAGGGCAUCAAGAUGGAGUACAACAUCGGGACGCCUGCCGCGACCAAC
 AUGGAGGGGUACCAUACCGGUACGAGAUCAACCGGACCCCGCCUGACCAACCUUGUC
 AGCAACUCCGACGUCGACCACUAGUUUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACG
 GGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCAGAGAUUAAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCCAAGGCUUUUUCAGAGCCACCAGAAU

Фиг. 2

5T4 CDS дикого типа

AUGCCUGGGGGUGCUCCCGGGGCCCCGCCCGGGGACGGGCGUCUGCGGUGGGCGGA
 CUAGCGCUGGUACUCCUGGGCUGGGUCUCCUGUUCUCCACCUCUCCGCAUCCUCC
 UUCUCCUCCUGCGCGCGUUCUUGGUUCCGCCGUGUCCGCCAGCCCCGUGCCGGAC
 CAGUGCCCCGCGCUGUGCGAGUGCUCCAGGCAGCGCGCACAGUCAAGUGCGUUAACCGC
 AAUCUGACCGAGGUGCCCAACCGACCUGCCGCCUACGUGCGCAACCUUCCUUAACGGC
 AACCAGCUGGGCGUGCUCCUGCCGGCGCCUUCGCCCGCGGGCGCGCUGGGCGAGCUG
 GCCGCGCUCAACCUAGCGCGAGCCGCCUGGACGAGGUGCGCGGGCGGCCUUCGAGCAU
 CUGCCAGCCUGCGCCAGCUCGACCUAGCCACAACCCACUGGCCGACCUAGUCCUUC
 GCUUUCUGGGGAGCAUUGCCAGCGUCUCGGCCCCAGUCCCUUGUGGAACUGAUCCUG
 AACCACAUCGUGCCCCUGAAGAUAGCGGAGAACCGGAGCUUCGAGGGCAUGGUGGUG
 GCGGCCUGCUGGGGGGCCGUGCAGCAGGGGUCGCCCGCUGGAGCUGGCCAGCAAC
 CACUUCUUAACUGCCGCGGGAUGUGCUGGCCAACUGCCAGCCUAGGCACCUGGAC
 UUAAGUAAUUAUUCGUGGUGAGCCUAGCUACGUGUCCUCCGCAACCUAGACAUUA
 GAAAGCCUCCACUGGAGGACAAUGCCCUCAAGGUCCUACAAUGGCACCCUGGUGAG
 UUGCAAGGUCUACCCACAUUAGGGUUUCCUGGACAACAUCCUGGGUCUGCGACUGC
 CACAUGGCAGACAUGGUGACCUGGCUAAGGAAACAGAGGUAUGCAGGGCAAGACCGG
 CUCACCUGUGCAUACCGAAAAAUGAGGAUCCGGUCCUUGGAACUACAACUGCU
 GACCUGGACUGGACCCGAUUCUCCCCAUCCUGCAAACCUUAUGUCUCCUGGGU
 AUUGUUUAGCCUGAUAGGCGCUUUUCCUCCUGGUUUUGAUUUGAACCGCAAGGGG
 AUAAAAAGUGGAUGCAUACAUCAGAGAUGCCUGCAGGGAUCACAUGGAAGGGUAUCAU
 UACAGAUUGAAUCAAUGCGGACCCAGAUUAACGAACCUAGUUCUAAUCGGAUGUC
 UGA

Фиг. 3

5T4 CDS с оптимизированным содержанием GC

AUGCCGGGCGGUGCAGCCGGGGCCCGCCGCGGGGACGGCCGCGCGCUGCGGCUCGCGCGC
 CUGGCCUGGUGCUCUGGGUGGGUCUCCAGCUCAGCCACCUCAGCGCCUCCAGC
 UUCUCCAGCUCGCGCCCCUUCUGGCCAGCGCGGUGUCCGCCAGCCCCCGCUCCCCGAC
 CAGUGCCCCGCCUGUGCGAGUGCAGCGAGGCCGCGCGGACCGUGAAGUGCGUCAACCGC
 AACCGACCGAGGUGCCACCGACCUCCCGGCCUACGUGCGGAACCGUUCUGACCGGC
 AACCGACCGCCCGCUGCCCGCCCGCCCGCCUUCGCGCGCCCGCCCGCCCGCUGGCCGAGCUC
 GCCGCGCUGAACCGUGCCGGAGCCGCCUCGACGAGGUGCGGGCCGCGCGUUCGAGCAC
 CUGCCCGUCCUGCGCCAGCUCGACCUAGCCACAACCCCGUGGCCGACCUCCCCCCUUC
 GCCUUCAGCGGGAGCAACGCCUCCGUGAGCGCCCCUCCCGCUGGUGGAGCUGAUCCUC
 AACCAUUCGUGCCCCCGAGGACGAGCGGCAGAACCGCAGCUUCGAGGGCAUGGUGGUC
 GCGGCCUGCUGGCCGGGCGGGCCUCAGGGCGUCGCGCGCUGGAGCUGCCUCCAAC
 CACUUCUGUACCGCCCGCGACGUGCUCGCGCAGCUGCCGAGCCUGCGGACCUCGAC
 CUGUCCAAACAGCCUGGUGUCCUCACCUACGUCAGCUUCGCAACCGUACGCACCCUG
 GAGUCCUCCACCUGGAGGACAACGCCCGAAGGUGCUGACAACGGCACCCUCGCCGAG
 CUGCAGGGGCGUCCCAUCCGGGUGUCCUCGACAACAACCCCGGGGUCGCGACUGC
 CACAUGGCCGACAUGGUGACCUGGCUGAAGGAGACCGAGGUGGUCAGGGCAAGGACCGC
 CUGACGUGCGCGUACCCGAGAAGUGCGGAACCGGUGCUCUGGAGCUGAACAGCGCC
 GACCUCGACUGCGACCCGAUCCUGCCCCCUCUCCUGCAGACCAGCUACGUGUCCUGGG
 AUCGUCUGGCCUGAUUGGCGCCAUUUCUCCUGGUGCUGUACCUAACCGCAAGGGC
 AUCAAGAAGUGGAUGCACAAAUCCGGGACGCCUGCCGCGACCACAUGGAGGGGUACCA
 UACCGGUACGAGAUCAACGCGGACCCCGCCUGACCAACCUGUCCAGCAACUCCGACGUC
 UGA

Фиг. 4

Сурвивин (GC)-muag-A64-C30

GGGAGAAAGCUUACCAUGGGCGCCCCACCCUGCCGCGGCCUGGCAGCCGUUCCUCAAG
 GACCACCGCAUCUCGACCUUCAAGAACUGGCCGUUCCUGGAGGGCUGCGCGUGCACCCCG
 GAGCGGAUGGCCGAGGCCGGCUUCAUCCACUGCCCCACCGAGAACGAGCCGGACCUGGCC
 CAGUGCUUUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGGGCUGGGAGCCGGACGACGACCCGAUCGAG
 GAGCACAAGAAGCACAGCAGCGGCGUGCGCCUCCUGAGCGUGAAGAAGCAGUUCGAGGAG
 CUGACGCUCCGGGAGUUCUGAAGCUGGACCGGGAGCGGGCCAAGAACAAGAUCCGGAAG
 GAGACCAACAACAAGAAGAAGGAGUUCGAGGAGACCGCCAAGAAGGUGCGGCGGGCCAUC
 GAGCAGCUGGCCGCCAUGGACUGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUC
 CCAACGGGCCCUCCUCCCUCCUUGCACCAGAGAUUAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAUAUCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCCCCCCUAGACAAUUGGAUU

Фиг. 5

Сурвивин (GC)-muag-A64-C30-гистонSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGGGCGCCCCACCCUGCCGCGGCCUGGCAGCCGUUCCUCAAG
 GACCACCGCAUCUCGACCUUCAAGAACUGGCCGUUCCUGGAGGGCUGCGCGUGCACCCCG
 GAGCGGAUGGCCGAGGCCGGCUUCAUCCACUGCCCCACCGAGAACGAGCCGGACCUGGCC
 CAGUGCUUUCUGCUUCAAGGAGCUGGAGGGCUGGGAGCCGGACGACGACCCGAUCGAG
 GAGCACAAGAAGCACAGCAGCGGCGUGCGCCUCCUGAGCGUGAAGAAGCAGUUCGAGGAG
 CUGACGCUCCGGGAGUUCUGAAGCUGGACCGGGAGCGGCGCAAGAACAAGAUCCGGAAG
 GAGACCAACAACAAGAAGAAGGAGUUCGAGGAGACCGCCAAGAAGGUGCGGCGGGCCAUC
 GAGCAGCUGGCCGCCAUGGACUGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUC
 CCAACGGGCCCUCCUCCCUCCUUGCACCAGAGAUUAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUUGCAUCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Фиг. 6

Сурвивин CDS дикого типа

AUGGGUGCCCCGACGUUGCCCCUGCCUGGCAGCCCUUUCUAAGGACCACCGCAUCUCUA
 CAUUCAGAACUGGCCCUUCUUGGAGGGCUGCGCCUGCACCCCGAGCGGAUGGCCGAGGC
 UGGCUUCAUCCACUGCCCCACUGAGAACGAGCCAGACUUGGCCCAGUGUUUCUUCUGCUUC
 AAGGAGCUGGAAGGCUGGGAGCCAGAUAGACGACCCCAUAGAGGAACAUAAAAAGCAUUCGU
 CCGGUUGCGCUUCCUUCUUCUCAAGAAGCAGUUUGAAGAAUUAACCCUUGGUGAAUUUUU
 GAAACUGGACAGAGAAAGAGCCAAGAACAAAAUUGCAAAGGAAACCAACAUAAGAAGAAA
 GAAUUUGAGGAAACUGCGAAGAAAGUGCGCCGUGCCAUCGAGCAGCUGGCUGCCAUGGAUU
 GA

Фиг. 7

Сурвивин CDS с оптимизированным содержанием GC

AUGGGCGCCCCACCCUGCCGCCGGCCUGGCAGCCGUUCCUAAGGACCACCGCAUCUCGA
 CCUUCAAGAACUGGCCGUUCUGGAGGGCUGCGCGUGCACCCCGAGCGGAUGGCCGAGGC
 CGGCUUCAUCCACUGCCCCACCGAGAACGAGCCGGACCUGGCCCAGUGUUCUUCUGCUUC
 AAGGAGCUGGAGGGCUGGGAGCCGGACGACGCCGAUCCGAGGAGCAAGAAGCAAGCA
 GCGGCUGCGCCUUCUGAGCGUGAAGAAGCAGUUCGAGGAGCUGACGCUCGGGGAGUUCU
 GAAGCUGGACCGGGAGCGGGCCAAGAACAGAUCCGCAAGGAGACCAACAACAAGAAGAAG
 GAGUUCGAGGAGACCGCCCAAGAAGUGCGGGCGGGCCAUCGAGCAGCUGGCUGCCAUGGACU
 GA

Фиг. 8

NY-ESO-1 (GC)-MUAG-A64-C30

GGGAGAAAGCUUACCAUGCAGGCCGAGGGCCGCGGCACCGCGGCUCGACCGGCGACGCC
 GACGGGCCCGGCGGCCCGGGCAUCCCGGACGGCCCGGGCGGGAAACGCGGGCGGCCCGGGC
 GAGGCCGCGCCACCGCGGGCGGGGCCCGCGGGCGCCGCGCGCCCGCGGGCGAGCGGC
 CCCGGCGGGGCGCCCCGCGGGGCCCGCACGGCGGCGCCGCGAGCGGCCUGAACGGGUGC
 UGCCGGUGCGGCGCCCGCGGCCCGGAGAGCCGGCUCUGGAGUUCUACCGGCCAUGCCG
 UUCGCGACCCCGAUGGAGGGCCGAGCUGGCCCGCGCGAGCCUGGCGCCAGCAGCCCGCCG
 CUGCCCCUGCCGGGCGUGUCUUGAAGGAGUUCACGGUGAGCGGCAACAUCUGACCAUC
 CGGCUGACCGCCCGGGACCAACCGGCAGCUGCAGCUGUCGAUCAGCAGCUGCCUCCAGCAG
 CUGAGCCUGCUGAUGUGGAUACCCAGUGCUUCCUGCCGGUGUCCUGGCCAGCCGCC
 AGCGGCCAGCGCCGGUGACCACUAGUUUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACG
 GGCCUCCUCCUCCUUGCACCAGAUUAAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAUUCCCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCCUAGACAAUUGGAUU

Фиг. 9

NY-ESO-1 (GC)-muag-A64-C30-гистонSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGCAGGCCGAGGGCCGCGGCACCGCGGCUCGACCGGCGACGCC
 GACGGGCCCGGCGGCCCGGGCAUCCCGGACGGCCCGGGCGGGAAACGCGGGCGGCCCGGGC
 GAGGCCGCGCCACCGCGGGCGGGGCCCGCGGGCGCCGCGCGCCCGGGCGAGCGGC
 CCCGGCGGGGCGCCCCGCGGGGCCCGCACGGCGGCGCCGCGAGCGGCCUGAACGGGUGC
 UGCCGGUGCGGCGCCCGCGGCCCGGAGAGCCGGCUCUGGAGUUCUACCGGCCAUGCCG
 UUCGCGACCCCGAUGGAGGCCGAGCUGGCCCGCGGAGCCUGGCCAGGACGCCCGCGCG
 CUGCCCGUGCCGGGCGUGUCUUGAAGGAGUUCACGGUGAGCGGCAACAUCUGACCAUC
 CGGCUGACCGCCCGGGACCAACCGGCAGCUGCAGCUGUCGAUCAGCAGCUGCCUCCAGCAG
 CUGAGCCUGCUGAUGUGGAUACCCAGUGCUUCCUGCCGJGUUCCUGGCCAGCCGCC
 AGCGGCCAGCGCCGGUGACCACUAGUUUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACG
 GGCCUCCUCCUCCUUGCACCAGAUUAAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCC
 CCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Фиг. 10

NY-ESO-1 CDS дикого типа

AUGCAGGCCGAAGGCCGGGGCACAGGGGUUCGACGGGCGAUGCUGAUGGCCAGGAGGC
 CCUGGCAUUCUGAUGGCCAGGGGCAUUGCUGGCGGCCAGGAGAGCGGGUGCCACG
 GCGGCGAGAGUCCCCGGGGCGCAGGGGCAGCAAGGGCCUCGGGGCCGGAGGAGCGCC
 CCGCGGGGUCGCAUGGCGGCGGGCUUCAGGGCUGAAUGAUGCUGCAGAUGCGGGGCC
 AGGGGGCCGAGAGCCGCGUGCUUGAGUUCUACCUCCGCAUGCCUUCGCGACACCCAUG
 GAAGCAGAGCUGGCCCGCAGGAGCCUGGCCAGGAUGCCCCACCGCUUCCGUGCCAGGG
 GUGCUUCUGAAGGAGUUCACUGUGUCCGGCAACAUAUCAGACUAUCCGACUGACUGCUGCA
 GACCACCGCCAAUCGAGCUUCUCCAUCAGCUCCUGUCUCCAGCAGCUUCCCUUGUUGAUG
 UGGAUACGCGAGUGCUUUCUGCCCGUGUUUUUGGCUAGCCUCCUCAGGGCAGAGGCGC
 UAA

Фиг. 11

NY-ESO-1 CDS с оптимизированным содержанием GC

AUGCAGGCCGAGGGCCGGGCACCGGGGUCGACCGGCGACCGCGAGGGCCGGCGGC
 CCGGGCAUCCCGGACGGCCCGGGCGGGAACGCGGGCGGCCGGGCGAGGCCGGCGCCACCG
 GCGGGCGGGGCCCGCGGGGCGCGCGCGCCCGGGCGAGCGGCCCGGGCGGGGCGCC
 CCGCGGGGCCCGCAGCGGCGGCGCGCGCAGCGGCCUGAACGGGUGCUGCCGGUGCGGCGCC
 CGCGGCCCGGAGAGCCCGCUCUCGAGUUCUACCUCCGCAUGCCUUCGCGACCCCGAUG
 GAGGCCGAGCUGGCCCGGCGGAGCCUGGCCAGGACGCCCCGCGCUGCCCGUGCCGGGCG
 GUGCUUCUGAAGGAGUUCACGUGAGCGGCAACAUCUGACCAUCCGGGUGAGCCGCGCG
 GACCACCGCGCAGUGCAGCUUCGUAUCAGCAGCUGCCUCCAGCAGCUGAGCCUGCUGAUG
 UGGAUACCGCAGUGCUUUCUGCCCGUGUUCUGGCCAGCGCGCCAGCGGCGAGCGCGG
 UGA

Фиг. 12

MAGE-C1 (ак 613-1142) (GC)-muag-A64-C30

GGGAGAAAGCUUACCAUGCAGUCCCCGUCGAGGGCGAGGAGUUCAGAGCUCCUGCAG
 AGCCCCGUGUCCAUCUGCAGCUCCAGCACCCCCUCCAGCCUCCCGCAGAGCUUCCCGAG
 UCCAGCCAGUCCCCCGGAGGGCCGGUCCAGAGCCCCUCCAGCUCCCGCAGAGCCCC
 CCGGAGGGGAUGCACUCCAGAGCCCCUGCAGUCCCCGAGAGCGCCCCGAGGGCGAG
 GACUCCCUACGCCCGUCGAGAUCCCCAGUCCCGUGGAGGGGAGGACAGCCUUCUCC
 AGCCUGCACUCCCCCAGUCCCCCGGAGUGGGAGGACAGCCUGAGCCCCUCCACUUC
 CCCCAGUUCCCGCCCCAGGGCGAGGACUCCAGUCCAGCCUGCAGUCCCCCGUGAGCAUC
 UGCUCCAGCUCCAGAGCCUGUCCUCCCGCAGAGCUUCCCGGAGUCCCCCAGAGCCCG
 CCGAGGGGGCCGGCGCAGUCCCCCUGCAGCGCCCCGUGAGCUCCUUCUUCAGCUACACC
 CUGGCCUCCUCCUGCAGAGCUCCACGAGAGCCCGCAGAGCCCGCCGAGGGCCCCGCC
 CAGUCCCCGUCGAGAGCCCCGUCUCCAGCUUCCCCUCCAGCACCUCCAGCUCCUCCAGC
 CAGUCCAGCCCCGUGUCCAGCUUCCCGUCCAGCACCUCCAGCUCCUCCAGCAAGAGCUCC
 CCGGAGAGCCCCUGCAGUCCCCGUGAUCAGCUUCCAGCUCCAGAGCCUUCUCCCG
 UUCAGCGAGGAGUCCAGCUCCCCGUGCAGCAGUACACCAGCUCCAGCGACACCCUGCUG
 GAGUCCGACAGCCUACCCGACUCCGAGAGCCUGAUCGAGAGCGAGCCCGUUCACCUAC
 ACGCUCGACGAGAAGGUGGACGAGCUGGCCCGGUUCCUGCUCCUGAAGUACAGGUGAAG
 CAGCCCCAUACCAAGGCCGAGAUGCUGACCAACGUAUCUCCCGCUACACCGGCUACUUC
 CCGGUGAUCUCCGGAAGGCGCGGAGUUAUCGAGAUCUUCUCCGGUAUCAGCCUGCGG
 GAGGUGGACCCCGACGACUCCUACGUCUUCGUGAACACGCUGGACCUACACGAGGAGGC
 UGCCUGUCCGACGAGCAGGGGAUGAGCCAGAACCGCCUGCUAUCUCCUGAUCUCCUCCAU
 AUCUUAUCAAGGGCACCUACGCCAGCGAGGAGGUCAUCUGGGACGUGCUUCCGGGAUC
 GCGUGCGGGCCGGCCGCGAGCACUUCGCCUUCGGGGAGCCCGGGAGCUGCUGACCAAG
 GUCUGGGUGCAGGAGCACUACCUAGUACCGCGAGGUGCCCAACAGCUCCCCGCCCGG
 UACGAGUUCUUGGGGCCCGCCGCCACAGCGAGGUCAUCAAGCGGAAGGUGUGGAG
 UUCUGGCGAUGCUAAGAACACGGUCCCCAUACCUUCCCGUCCAGCUACAAGGACGCC
 CUGAAGGACGUGGAGGAGCGGGGCCAGGCCAUCAUCGACACCAACGACGACUCCAGCGCC
 ACCGAGAGCGCGUCCAGCUCCGUGAUGAGCCCCAGCUUCCAGCGAGUAGCACUAGUU
 AUAAGACUGACUAGCCCCGUGGGCCUCCCAACGGGGCCUCCUCCUCCUUGCACCAGGA
 UUAUAUAA
 AAAAAAAAAUAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCUAGACAAUUGGAAUU

Фиг. 13

MAGE-C2 (GC)-muag-A64-C30

GGGAGAAAGCUUACCAUGCCCCCGGUGCCCGGCGUCCCCUCCGGAACGUGGACAACGAC
 AGCCCCACCUCGUGGAGCUGGAGGACUGGGUCGACGCCAGCACCCGACCGACGAGGAG
 GAGGAGGAGGCCAGCUCGCGAGCUCACGCUCUACCGUGGUUACGCCCCUCCAGCUUC
 UCCACCAGCUCAGCCUGAUCCUCGGGGGCCCCGAGGAGGAGGAGGUGCCUCCGGGGUC
 AUCCCGAACCUGACCGAGAGCAUCCCCUCCAGCCCCCGCAGGGCCCGCCCCAGGGGCC
 UCCAGAGCCCCUGUCCAGCUGCUGCAGCUCUCCAGCUGGUCAGCUUCCGAGGAG
 AGCUCAGCCAGAAGGGCGAGGACACCGGCACGUGCCAGGGGCUCCCGACUCCGAGAGC
 UCCUUCACCUACACCCUGGACGAGAAGGUGGCCGAGCUGGUGGAGUCCUCCUGCUAAG
 UACGAGGCCGAGGAGCCGUCACCGAGGCCGAGAUGCUCUAGAUCCGUGAUCAAGUACAAG
 GACUACUCCCCGUGAUCCUGAAGCGCGCCCGGGAGUUCUAGGAGCUGCUCUCCGGCCUG
 GCGCUGAUCGAGGUCGGGCCCGACCACUUCUGCGUGUUCGCCAACACGGUGGGCCUACC
 GACGAGGGGAGCGACGACGAGGGCAUGCCGGAGAACUCCUGCUGAUCAUCAUCCUCAGC
 GUCAUCUUAUCAAGGGCAACUGCGCCUCCGAGGAGGUGAUCUGGGAGGUGCUGAACGCC
 GUCGGGGUGUACGCGGGCCGCGAGCACUUCGUGUACGGGGAGCCCCGGGAGCUGCUCACC
 AAGGUCUGGGUGCAGGGCCACUACCUGGAGUACCGCGAGGUGCCGCACAGCUCCCCCCG
 UACUACGAGUCCUGUGGGGCCCCCGGGCCACAGCGAGUCCAUCAAGAAGAAGGUCCUC
 GAGUUCUGGCCAAGCUGAACAAACACCGUGCCAGCAGCUCCCCUCCUGGUACAAGGAC
 GCCCCAAGGACGUCGAGGAGCGCGUGCAGGCCACGAUCGACACCGCGAGCAGGCCACC
 GUGAUGGCCAGCGAGUCCUGAGCGUCAUGUCCAGCAACGUGUCCUUCAGCGAGUGACCA
 CUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGGCCUCCUCCUCCUUGCA
 CCGAGAUUAUAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAUUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCUAGACAAU
 CGAAUU

Фиг. 18

MAGE-C2 (GC)-muag-A64-C30-гистонSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGCCCCCGGUGCCCGGCGUCCCCUCCGGAACGUGGACAACGAC
 AGCCCCACCUCGUGGAGCUGGAGGACUGGGUCGACGCCAGCACCCGACCGACGAGGAG
 GAGGAGGAGGCCAGCUCGCGAGCUCACGCUCUACCGUGGUUACGCCCCUCCAGCUUC
 UCCACCAGCUCAGCCUGAUCCUCGGGGGCCCCGAGGAGGAGGAGGUGCCUCCGGGGUC
 AUCCCGAACCUGACCGAGAGCAUCCCCUCCAGCCCCCGCAGGGCCCGCCCCAGGGGCC
 UCCAGAGCCCCUGUCCAGCUGCUGCAGCUCUCCAGCUGGUCAGCUUCCGAGGAG
 AGCUCAGCCAGAAGGGCGAGGACACCGGCACGUGCCAGGGGCUCCCGACUCCGAGAGC
 UCCUUCACCUACACCCUGGACGAGAAGGUGGCCGAGCUGGUGGAGUCCUCCUGCUAAG
 UACGAGGCCGAGGAGCCGUCACCGAGGCCGAGAUGCUCUAGAUCCGUGAUCAAGUACAAG
 GACUACUCCCCGUGAUCCUGAAGCGCGCCCGGGAGUUCUAGGAGCUGCUCUCCGGCCUG
 GCGCUGAUCGAGGUCGGGCCCGACCACUUCUGCGUGUUCGCCAACACGGUGGGCCUACC
 GACGAGGGGAGCGACGACGAGGGCAUGCCGGAGAACUCCUGCUGAUCAUCAUCCUCAGC
 GUCAUCUUAUCAAGGGCAACUGCGCCUCCGAGGAGGUGAUCUGGGAGGUGCUGAACGCC
 GUCGGGGUGUACGCGGGCCGCGAGCACUUCGUGUACGGGGAGCCCCGGGAGCUGCUCACC
 AAGGUCUGGGUGCAGGGCCACUACCUGGAGUACCGCGAGGUGCCGCACAGCUCCCCCCG
 UACUACGAGUCCUGUGGGGCCCCCGGGCCACAGCGAGUCCAUCAAGAAGAAGGUCCUC
 GAGUUCUGGCCAAGCUGAACAAACACCGUGCCAGCAGCUCCCCUCCUGGUACAAGGAC
 GCCCCAAGGACGUCGAGGAGCGCGUGCAGGCCACGAUCGACACCGCGAGCAGGCCACC
 GUGAUGGCCAGCGAGUCCUGAGCGUCAUGUCCAGCAACGUGUCCUUCAGCGAGUGACCA
 CUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGGCCUCCUCCUCCUUGCA
 CCGAGAUUAUAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCU
 UUUACAGGCCACCAGAAUU

Фиг. 19

MAGE-C2 CDS дикого типа

AUGCCUCCCGUCCAGGCGUCCAUUCCGCAACGUUGACAACGACUCCCCGACCUCAGUU
 GAGUUAAGAAGACUGGGUAGAUGCACAGCAUCCACAGAUAGGAAGAGGAGGAAGCCUCC
 UCCGCCUCUCCACUUUGUACUUAGUUAUUUCCCCCUCUUCUUUCCACAUCUCUUCU
 CUGAUUUCUUGGUGGUCCUGAGGAGGAGGAGGUGCCUUCUGUGUGAUACCAAUUCUUACC
 GAGAGCAUCCAGUAGUCCUCCACAGGUGCCUCCACAGGUGCCUCCAGAGUCCUCUG
 AGCUCUCUGCUCUCUUCUUUCAUGGAGCUCAUUCAGUGAGGAGUCCAGCAGCCAGAAA
 GGGGAGGAUACAGGCACCUGUCAGGGCCUGCCAGACAGUGAGUCCUUCACAUUAACA
 CUAGAUGAAAAGGUGGCCGAGUUAGUGGAGUCCUGCUCUCAAUAACGAAGCAGAGGAG
 CCUGUAACAGAGGCAGAGAUGCUGAUGAUUGUCAUCAAGUACAAGAUAUUAUUCUGUG
 AUACUCAAGAGAGCCCGUGAGUUCUUGGAGCUCUUCUUUGGCCUUGCCUGAUAGAAGUG
 GGCCUGACCACUUCUGUGUGUUUGCAAACACAGUAGGCCUACCCGAUGAGGGUAGUGAU
 GAUGAGGGCAUGCCCAGAACAGCCUCCUGAUUAUUAUUCUGAGUGUGAUCUUAUAAAG
 GGCAACUGUGCCUCUGAGGAGGUCUUCUGGGAAGUGCUGAAUGCAGUAGGGGUUAUUGCU
 GGGAGGGAGCACUUCGUCUAUGGGGAGCCUAGGGAGCUCUACUAAAGUUUGGGUGCAG
 GGACAUUACCUGGAGUAUCGGGAGGUGCCCCACAGUUCUCCUCAUAUUAUGAAUCCUG
 UGGGUCCAAAGAGCCCAUUCAGAAAGCAUCAAGAAGAAAGUACUAGAGUUUUAGCCAAG
 CUGAACAAACUGUUCUAGUCCUUCUCCAUCCUGGUACAAGGAUGCUUUGAAAGAUUG
 GAAGAGAGAGUCCAGGCCACAUUGAUACCGCAGAUAGGCCACUGUCAUGGCCAGUGAA
 AGCCUCAGUGUCAUGUCCAGCAACGUCUCCUUUCUGAGUGA

Фиг. 20

MAGE-C2 CDS с оптимизированным содержанием GC

AUGCCCCCGUCCCGGCGUCCCUUCCGGAACGUGGACAACGACAGCCCCACCUCCGUG
 GAGCUUGGAGGACUGGGUCGACGCCCAGCACCACCGACGAGGAGGAGGAGGAGGCCAGC
 UCCGCCGAGCUCCACGCUUACCUGGUGUUCAGCCCCUCCAGCUUCUCCACCAGCUCAGC
 CUGAUCCUGGGGGGCCCGAGGAGGAGGAGGUGCCUCCGGGUGAUCCCGAACCUGACC
 GAGAGCAUCCCUCCAGCCCCCGCAGGGCCCGCCCGAGGGGCCUCCAGAGCCCCUG
 UCCAGCUGCUGCAGCUCUUCAGCUGGUCAGCUUCUCCGAGGAGAGCUCAGCCAGAAG
 GGCGAGGACACCGGCACGJGCCAGGGGCUCCCGGACUCCGAGAGCUCUUCACCUACACC
 CUGGACGAGAAAGGUGGCCGAGCUUGGUGGAGUUCUUCUGCUAAGUACGAGGCCGAGGAG
 CCCGUACCGAGGCCGAGAUGCUCUAGAUCCUGAUCAAGUACAAGGACUACUUCGCCUG
 AUCCUGAAGCGGCCCGGAGUUCUAGGAGCUCUCUUCGGCCUGGCGUGAUCGAGGUC
 GGGCCCGACCACUUCUGCGUGUUCGCCAACCGUGGGCCUACCGACGAGGGGAGCGAC
 GACGAGGGCAUCCCGGAGAUCUCCUGCUGAUCAUCCUCCAGCGUCAUCUUAUCAAG
 GGCAACUGCGCCUCCGAGGAGGUGAUCUGGAGGUGCUGAACGCGGUGGGGUGUACGCC
 GGCCCGGAGCACUUCGUUACGGGGAGCCCCGGGAGCUGCUACCAAGGUCUGGGUGCAG
 GGCCACUACCUGGAGUACCGCGAGGUGCCGCACAGCUCUCCCCCGUACUACGAGUUCUG
 UGGGGCCCCGGGCCACAGCGAGUCCAUCAAGAAGAAGGUCUUGAGUUCUUGGCCAAG
 CUGAACAAACACCGUGCCGAGCAGCUUCCCUCCUGGUACAAGGACGCCCUCAAGGACGUC
 GAGGAGCGCGUGCAGGCCACGAUCGACACCGCGACGACGCCACCGUGAUGGCCAGCGAG
 UCCCUAGCGUCAUGUCCAGCAACGUGUCCUUCAGCGAGUGA

Фиг. 21

MUC1 5×VNTR (GC)-muag-A64-C30

GGGAGAAAGCUUACCAUGACCCCCGGCACCCAGAGCCCGUUCUUCUGUCUCCUGUCGUCUC
 ACGGUGUGUACCGUGUACCGGGUCCGGCCACGCCAGCUCACCCCCGGGGGCGAGAAAG
 GAGACGAGCGCCACCCAGCGGUCCAGCGUGCCCUCCAGCACCGAGAAAGAACGCGGUUCC
 AUGACCAAGCUCCUGUGUAGCUCACAGCCCCGGGUCCGGCAGCUCACGACCCAGGGC
 CAGGACGUGACCCUCCGCCCGGCCACCGAGCCCGCCAGCGGGUCCCGCGACGUGGGG
 CAGGACGUCACCAAGCGUGCCCGUGACCCGCCCGCCCGUGGGAGCACACGCCGCCCGCC
 CACGACGUCACCUCCGCCCGGACAAACAGCCCGCGCCGGGAGCACCGCCCCCGCCG
 CACGGGGUGACCUCCGCCCGGACAGCGGCCCGCCCGGAGCACCGCGCCCCCGCC
 CACGGCGUGACCUCCGCCCGGACACCCGCCCGCCCGGAGCACCGCCCCCGCCG
 CACGGGUGACCUCCGCCCGGACAGCGGCCCGCGCCCGGAGCACCGCCCCCGCCG
 CACGGGUGACCUCCGCCCGGACAGCGGCCCGCGCCCGGAGCACCGCCCCCGCCG
 CACGGGUGACCUCCGCCCGGACAAACCGCCCGCCUGGGAGCACCGCCCCCGCCGUG
 CACAACGUGACCUCCGCCCGGCGUCCCGGAGCGGGUCCCGCAGACCCUCCGUCACAAC
 GGCACGUCGCCCGGGCCACCACACCCCGCCAGCAAGUCCACGCCUUCAGCAUCCCG
 UCCCACCACAGCGACACCCCCACCACCCUGGCGUCCACAGCACGAAGACCGAGCCUCC
 AGCACCCACCACUCCAGCGUGCCCGCGUACAGCUCCAACACAGCACGUCGCCGAG
 CUCAGCACCGGGUGUCCUUCUUCUCCUGAGCUCCACAUCUCCAACUGCAGUUAAC
 AGCUCUCCUGAGGACCCAGCACCGACUACUACAGGAGCUGCAGCGGGACAUUCCGAG
 AUGUUCUGCAGAUUACAAGCAGGGCGGCUUCUCCGGGUGAGCAACAUAAGUUCGCG
 CCCGGUCCUGUGGGUGCAGUACCUCCGCUUCCGGGAGGGGACGAUACAACGUCAC
 GACGUGGAGACCCAGUUAACAGUACAAGACCGAGGCCGCCAGCCGCUACAACUGACC
 AUCUCCGACGUGAGCGUCCGACGUGCCCUUCCCGUUCAGCGCGCAGUCCGGCGCCGG
 GUGCCCGGUGGGGCAUCGCCUGCUCUGUCCUGGUGUGCGUGCUGGCCUCCGCAUC
 GUGUACCGUAGCGCGUGGCCGUGGCCAGUCCGGCGCAAGAUAACGGGCGAGCUCGAC
 AUCUUCUCCCGCCCGGACAGUACCAACCGGAUGAGCGAGUACCCGACCUACACACCCAC
 GGCCGCUACGUUCCCCCAGCUCCACCGACCGGAGCCCUACGAGAAGGUGUCCGCCGG
 AACGGCGGAGUCCUGAGCUACCAACCCGGCGGUGGCCCGCCUCCGCCAACCUCCG
 UGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCUCC
 CUUGCACCAGAUUAAUAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAUUAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCUUAG

Фиг. 22

MUC1 5×VNTR (GC)-muag-A64-C30-гистонSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGACCCCCGGCACCCAGAGCCCGUUCUUCUGUCUCCUGUCGUCUC
 ACGGUGUGUACCGUGUACCGGGUCCGGCCACGCCAGCUCACCCCCGGGGGCGAGAAAG
 GAGACGAGCGCCACCCAGCGGUCCAGCGUGCCCUCCAGCACCGAGAAAGAACGCGGUUCC
 AUGACCAAGCUCCUGUGUAGCUCACAGCCCCGGGUCCGGCAGCUCACGACCCAGGGC
 CAGGACGUGACCCUCCGCCCGGCCACCGAGCCCGCCAGC3GGUCCCGCGACGUGGGG
 CAGGACGUCACCAAGCGUGCCCGUGACCCGCCCGCCCGUGGGAGCACACGCCGCCCGCC
 CACGACGUCACCUCCGCCCGGACAAACAGCCCGCGCGGGGAGCACCGCCCCCGCCG
 CACGGGGUGACCUCCGCCCGGACAGCGGCCCGGCCCGGAGCACCGCGCCCCCGCC
 CACGGCGUGACCUCCGCCCGGACACCCGCCCGCCCGCCGGGAGCACGGCCCCCGCGGG
 CACGGCGUACCUCCGCCCGGACACCCGCCCGCCCGCCGGGAGCACCGCCCCCGCCGCG
 CACGGGUGACCUCCGCCCGGACACCCGCCCGCCCGCCGGGAGCACCGCCCCCGCCGCG
 CACGGGUGACCUCCGCCCGGACACCCGCCCGCCCGCCGGGAGCACCGCCCCCGCCGCG
 CACGGGUGACCUCCGCCCGGACAAACCGCCCGCCUGGGAGCACCGCCCCCGCCGUG
 CACAACGUGACCUCCGCCAGCGGCUCCCGGAGCGGGUCCGCCAGCACCCUCCGUCACAAC
 GGCACGUCGCCCGGGCCACCACACCCCGCCAGCAAGUCCACGCCUUCAGCAUCCCG
 UCCCACCACAGCGACACCCCCACCACCCUGGCGUCCACAGCACGAAGACCGAGCCUCC
 AGCACCCACCACUCCAGCGUGCCCGCGUACAGCAGCUCCAACACAGCACGUCCCCGAG
 CUCAGCACCGGGUGUCCUUCUUCUCCUGAGCUUCCACAUCUCCAACUGCAGUUAAC
 AGCUCUCCUGAGGACCCAGCACCGACUACUACAGGAGCUGCAGCGGGACAUUCCGAG
 AUGUUCUGCAGAUUACAAGCAGGGCGGCUUCUCCGGGUGAGCAACAUAAGUUCGCG
 CCCGGUCCUGUGGGUGCAGUACCUCCGCUUCCGGGAGGGGACGAUACAACGUCAC
 GACGUGGAGACCCAGUUAACAGUACAAGACCGAGGCCCGCAGCCGCUACAACUGACC
 AUCUCCGACGUGAGCGUCCGACGUGCCCUUCCCGUUCAGCGCGCAGUCCGGCGCCGG
 GUGCCCGGUGGGGCAUCGCCUGCUCUGUCCUGGUGUGCGUGCUGGCCUCCGCAUC
 GUGUACCGUAGCGCGUGCCGUGUGCCAGUCCGGCGCAAGAUAACGGGCGAGCUCGAC
 AUCUUCUCCCGCCCGGACAGUACCAACCGGAUGAGCGAGUACCCGACCUACACACCCAC
 GGCCGCUACGUUCCCCCAGCUCCACCGACCGGAGCCCUACGAGAAGGUGUCCGCCGG
 AACGGCGGAGCUCUCCUGAGCUACCAACCCGGCGGUGGCCCGCCUCCGCCAACCUCCG
 UGACCACUAGUUAUAAGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCUCC
 CUUGCACCAGAUUAAUAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAUUAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAA
 GGCUCUUCUCCAGAGCCACCAGAAU

Фиг. 23

Muc1-5xVNTR CDS дикого типа

AUGACACCGGACCCAGCAGUCUUCUUCUUCUGCUGCUGCUCUCACAGUCUUAACAGUUGUUAACAGGUUCUGGUCUAUGCAAGCUCUACCCAGGUGGAGAAAGGAGACUUCGGCUACCCAGAGAAGUUCAGUGCCCAGCUCUACUGAGAAGAAUGCUGUGAGUAUGACCAGCAGCGUACUCUCCAGCCACAGCCCCGGUUCAGGCUCCUCCACCACUCAGGGACAGGAUGUCACUCUGGCCCCGGCCACGGAACCAAGCAGUUCAGGUUCAGCUGCCACCUUGGGGACAGGAUGUCACCUCUGUCCACAGUCACCAAGGCCAGCCUUGGGUCCACCACCCCGCAGCCACGAUGUCACCUCCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCUCCACCGCCCCCCAGCCACGGUGUCACCUCUGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCUCCACCGCCCCCCAGCCACGGUGUCACCUCUGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCUCCACCGCCCCCCAGCCACGGUGUCACCUCUGGCCCCGACACAGGCCGGCCCCGGGCUCCACCGCCCCCCAGCCACGGUGUCACCUCUGGCCCCGGACAACAGGCCGCCUUGGGUCCACCGCCUCCAGUCCACA AUGUCACCUCUGGCCUCAGGCUCUGCAUCAGGCUCAGCUUCUACUCUGGUGCACAACGGCACCUUGGCCAGGUACCAACAACCCAGCCAGCAAGAGCACUCCA AUUCUCAAU UCCAGCCACCACUCUGAUACUCCUACACCCUUGCCAGCCAUAGCACCAAGACUGAUGCCAGUAGCACUACCAUAGCUCGGUACCUCUCUACCUCCUCCAAUACACAGCACUUCUCCCCAGUUGUCUACUGGGGUCUCUUUCUUUUUCCUGUCUUUUCACAUUUCAAACUCCAGUUUAU UCCUCUCUGGAAGAUCCCAGCACCGACUACUACCAAGAGCUGCAGAGAGACAUUUCUGAAAUUUUUUGCAGAUUUAUA AACAGGGGGUUUUCUGGGCCUCCCAUAUUAUAGUUCAGGCCAGGAUCUGUGGUGUGACA AUUGACUCUGGCUUCUCCGAGAAGGUACCAUCA AUGUCCACGACGUGGAGACACAGUUCAUAGUAUAAAACGGAAGCAGCCUCUGCAUUAU AACCUAGACGAUCUCAGACGUCAGCGUGAGUGAUGUGCCAUUUCUUUCUCUGCCCAGUCUGGGGCUUGGGUGCCAGGCUGGGGC AUGCGCUGCUGGUGCUGGUCUGUGUUCUGGUUUGCGUGGCCAUUGUCUAUCUCUAUUGCCUUGGCUUGUCUGCAGUGCCGCCGCGAAAGAACUACGGGCAGCUGGACAUCUUUCCAGCCCCGGAUCCAGUACCAUUGAGCGAGUAACCCAGCAUACCCGCGCUAUUGGCCCUACCGCAGUACCAUGAGCCCCUACUGAGAAGGUUCUGCAGGUACGGGCGCAGCAGCUCUCUACACAACCAACCGCAGUGGCAGCGGCUUCUGGCCAACUUGAG

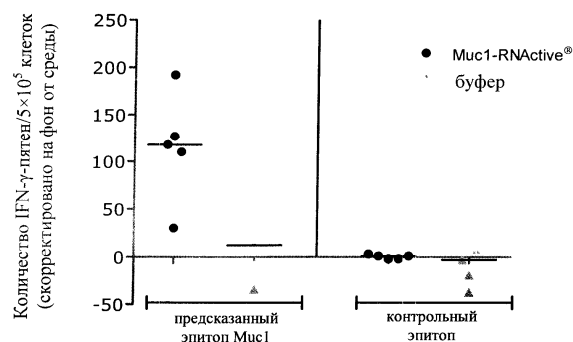
ФИГ. 24

MUC1-5xVNTR CDS GC-оптимизированная

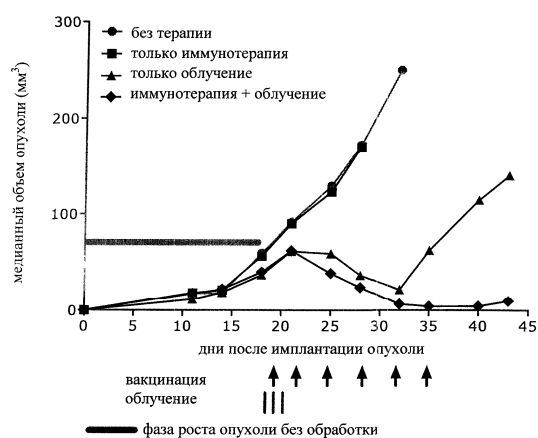
AUGACCCCGGCACCCAGAGCCCGUUCUUCUGUCUCUGUCACGAGGUCAGGCUUG
GUGACCGGGUCCGGCCACGCCAGCUCACCCCGGGGGGAGAAAGAGACGAGCGCCACC
CAGCGGUCCAGCGUGCCCUCCAGCACCGGAGAAGAACGCGGUCUCCAUGACCAGCUCUGUG
CUGAGUUCACAGCCCGCGGGUCCGGCAGCUCACAGCCAGGGCCAGGACGUGAGCCUUC
GCCCGGGCCACCGAGCCCGCCACGCGGGUCCGCCCGGACGUGGGGGCCAGGACGUAACCAAC
GUGCCCGUGAGACCGCGCCCGCCUCGGGGAGCACCAACGCCGCCGCCACGACGUAACCUUC
GCCCGCGACAACAGCCCGCGCGCGGACAGCACCGCGCCCGCCGCCACGGGGUGACCUUC
GCCCGGAGACACCGCGCCCGGCCCGGGAGCACCGCCCGCGCGCACGGCGUAACCUUC
GCCCGCGACACCGCGCCCGGCCCGGGAGCACCGCCCGCGCGCCACGGCGUGAGCUUC
GCGCCCGACACCGCGCCCGGCCCGGGAGCACCGCCCGCGCGCCACGGGGUGACCUUC
GCCCGGAGACGCGGCCCGCGCCCGGCAGCACCGCCCGCGCGGCCACGGGGUGACCUUC
GCGCCCGACAACCGCCCGCGCGUGGGGAGACCGCCCGCGCGUGACAACGUGACCUUC
GCCAGCGGUCUCGCGAGCGGGUUCGCCAGCACCCUCUGUCCACAACGGGACGUCGCCCGG
GCCACCACACCCCGGCCAGCAAGUCCACGCCCUUAGCAUCCGUCACCACAGCGAC
ACCCCGACCAACCCUGGCGUCCACAGCACGAAGACCGAGCGCCUCCAGCACACCAACCUUC
AGCGUGCCCGCGCGACCGACUCCAACACGACGAGUCGCGGACGUCAGCACCGGGGUG
UCCUUCUUCUUCUGAGCUUCCACUUCUCAAUCGAGUCAAAGCAGUCCUCUAGGAGAC
CCAGCACCGGACUACUACAGAGGUCGACGCGGGCAUCUCCGAGAUUGUCCUGCAGAUUC
UACAAGCAGGGCGGCUUCUUCGGGUGAGCAACAUAAGUUCGCCCGCGGUCUCGUGUG
GUGCAGCUGACCCUCGCGCUUCGGGAGGGGAGCAUAAAGUCCACGACGUGGAGACCCAG
UUAACAGUAACAAGACCGAGCGCGCAGCGCUACAACCUAGACCAUCUCCGACGUGAGC
GUCUCCGAGUGGCCUUCUCCGUUCAGCGCGAGUCUCCGCGCGGUGGCCGGUGGGGCG
AUCGCCUGUCUGUUCUGUGUGGUGUGGUGUGGCGGUCGCGCAUCGUGUACCUUAUCGCG
CUGGCCUGUGCGAGUGCCCGCGCAAGAACUACGGGCGAGCUCGACAUCUCCCGCGCCGG
GACACGUACCAACCGAUGAGCGAGUACCCGACCUUACCAACCCACCGCGCGGCUACGUCUCC
CCAGGCUCCACGACCGGAGCCCUUACGAGAAGUUCGCCCGGAGCGGCGGACGUCUCC
CUGAGUACCAACCAACCGCGCGGUGGCGCGCGCGCGUCCGCGCAACCUUGAGA

ФИГ. 25

Секреция IFN-γ в спленоцитах мышей,
вакцинированных Muc1-RNActive®



Фиг. 26



Фиг. 27

Белок 5T4 NP_001159864.1:

```
mpggcsrgpa agdgrlrar lalvllgwvs sssptssass fsssapflas avsaqpplpd
qcpalcecse aartvkcvmr nltevpdlp ayvrnflgtg nqlavlpaga farrpplael
aalnlsgrl devragafeh lpslrqldls hnpladlspf afsgsnasvs apsplvelil
nhivppeder qnrsfegmvv aallagralq glrrlelasn hfllylprdlv aqlpslrhld
lsnnslvslt yvsfrnlthl eslhlednal kvlhngtlae lqglphirvf ldnnpwvcdc
hmadmvtwk etevvqgkdr ltcaypekmr nrvillelnsa dldcdpilpp slqtsyvflg
ivlallgaif llvlylnrkg ikkwmhnird acrdhmegyh yryeinadpr ltnlssnsdv
```

Фиг. 28

Белок сурвивин (BIRC5) O15392:

```
MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFEC
FKELEGWEPDDDPTEHHKHSNGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREKAKNKIAKETNNK
KKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD
```

Фиг. 29

Белок сурвивин (BIRC5) NP_001159.2:

```
mgaptlppaw qpflkdhris tfknwpfleg cactpermae agfihcpten epdlaqcffc
fkelegwepd ddpieehkhs ssgcaflsvk kqfeeltlge flkldrera nkiaketnnk
kkefeetaek vrraieqlaa md
```

Фиг. 30

Белок NY-ESO-1 NP_001318.1:

```
mqaegrgtgg stgdadgpgg pgipdgpggn aggpgeagat ggrgprgaga arasgpggga
prgphggaas glngccrcga rgpesrllef ylampfatpn eaelarrsla qdaplpvpg
vllkeftvsg niltirltaa dhrqlqlsis sclqqlslm witqcflpvf laqppsgqrr
```

Фиг. 31

Блок MAGE-C1 NP_005453.2:

mgdkdmptag mpsllqssse spqscpeged sqsplqipqs spesddtlyp lqspqsrseg
 edssdplqrp pegkdsqspl qipqsspegd dtqsplqnsq sspgkdsls pleisqsppe
 gedvqsplqn passffssal lsifqsspes tqspfeqfpq svlqipvsaa ssstlvlsifq
 sspstqspq egfpqsplqi pvsrsfsstl lsifqssper tqstfegfaq splqipvpsps
 ssstllslfq sfsertqstf egfaqsslqi pvspfsstl vslfqssper tqstfegfpq
 splqipvsss ssstllslfq ssperthstf egfpqslqi pmtssfsstl lsifqssps
 aqstfegfpq splqipgsps fsstllslfq ssperthstf egfpqsplqi pmtssfsstl
 lsilqsspes aqsafegfpq splqipvsss fsytllslfq ssperthstf egfpqsplqi
 pvssssssst llslfqsspe ctqstfegfp qsplqipqsp pegenthspq qivpslpewe
 dslsphyfpq sppqgedsls phyfpqspq gedslspryf pqspqgedsl sphypqspq
 qgedmsply fpqsplqgee fqsslqspvs icssstpsl pqspessqs ppegvpqspl
 hspqsppegm hsqsplqspe sapegedsls plqipqspq gedsllslhf pqspeweds
 lsplhfpqfp pqgedfqssl qspvsicsss tsllspqsfq espqsppegp aqsplqrpvs
 sffsytlasl lqsshesps ppegpaqspl qspvssfpss tssslsqssp vssfpssstss
 slsksspesp lqspvisfss stslspsee sspvdeyts ssdtllesds ltdseslies
 eplftytlde kvdelarfll lkyqvkqpit kaemltntvis rytgyfpvif rkarefieil
 fgislrevdp ddsyvfvtl dltsegclsd eqgmsqnrl ililsiifik gtyaseeviw
 dvlsigivra grehfafgep relltkvwvq ehyleyrevp nssppryefl wgprahsevi
 krkvveflam lkntvpitfp ssykdkldv eeraqaidt tddstatesa sssvmsspsfs
 se

Фиг. 32

Блок MAGE-C2 NP_057333.1:

mppvpgvpfr nvdndsptsv eledwvdaqh ptdeeeeeeas sasstlylvf spssfstsss
 lilggpeeee vpsgvipnlt esipssppq ppqggsqspl sscsssfws sfseesssqk
 gedtgctqgl pdsessfyt ldekvaelve flllkyeae pvteaemlmi vikykydypv
 ilkrarefme llfqlaliev gpdhfcvfan tvqltdegds degmpensll iilsvifik
 gncaseeviw evlnavgvya grehfvgep relltkvwvq ghyleyrevp hssppryefl
 wgprahsesi kkvleflak lnntvpssfp swykdalkdv eervqatidt addatvmase
 slsvmssnvs fse

Фиг. 33

Блок MUC1 J05582.1:

mtpgtqspff llllltvlv vtgsghasst pggeketaa qrssvpsste knavmtssv
 lsshspgsgs sttggqdvlt apatepasgs aatwgqdvts vpvtrpalgs ttpahdvts
 apdnkpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt apdtrpapgs tappahgvt
 asgsasgsas tlvhngtsar atttpaskst pfsipshhsd tpttlashst ktdassthhs
 svppltsnh stspqlstgv sfflsfhis nlqfnssled pstdyygelq rdisemflqi
 ykqggflgls nikfrpgsvv vqltlafreg tinvhdvctq fnqykteaas rynltisdvs
 vsdvpfpfsa qsgagvpgwg iallvlcvl valaivyli lavcqcrrkn ygqldifpar
 dythpmseyp tythgryvp psstdrspe kvsagnggss lsytnpavaa asanl

Фиг. 34

Белок MUC1 5xVNTR

[illegible]

ФИГ. 35

MUC1 CDS дикого типа:

[illegible]

GCCCCGGACACCAGGCCGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAGCCACGGTGTCACCTCG
GCCCCGGACACCAGGCCGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAGCCACGGTGTCACCTCG
GCCCCGGACACCAGGCCGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAGCCATGGTGTCACCTCG
GCCCCGGACAACAGGCCGCTTGGGCTCCACCGCCCCCAGTCCACAATGTACCTCG
GCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCAACGGCACCTCTGCCAGG
GCTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATCCCAGCCACCACTCTGAT
ACTCCTACCACCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTACCATAGC
TCGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTTCTCCCAGTTGTCTACTGGGGTC
TCTTCTTTTTCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCCAGTTAATCCTCTCTGGAAGAT
CCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTGCAGATT
TATAAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTG
GTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCACGACGTGGAGACACAG
TTCAATCAGTATAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGACGTCAGC
GTGAGTGATGTGCCATTTCTTCTCTGCCAGTCTGGGCTGGGTGCCAGGCTGGGGC
ATCGCGCTGCTGGTGCTGGTCTGTGTCTGGTTGCGCTGCCATTGTCTATCTCATTGCC
TTGGCTGTCTGTGAGTGCCGCCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTCCAGCCCGG
GATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCCATGGGCGCTATGTGCC
CCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAGGTAACGGTGGCAGCAGC
CTCTCTTACAAAACCCAGCAGTGGCAGCCGCTTCTGCCAATTGTAG

Фиг. 36



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2