

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041756**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.29

(21) Номер заявки
201990670

(22) Дата подачи заявки
2017.10.26

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01)
C07C 219/06 (2006.01)
C07C 229/16 (2006.01)
C07C 233/18 (2006.01)
C07C 255/24 (2006.01)

(54) ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ мРНК В ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ

(31) PCT/EP2016/075843; PCT/
EP2016/075929; PCT/EP2017/064066

(32) 2016.10.26; 2016.10.27; 2017.06.09

(33) EP

(43) 2019.11.29

(86) PCT/EP2017/077517

(87) WO 2018/078053 2018.05.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КЬЮРВАК АГ (DE); АКУИТАС
ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (СА)**

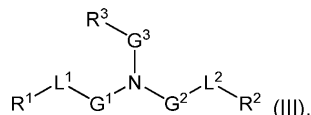
(72) Изобретатель:
**Баумхоф Патрик, Фотин-Млечек
Мариола, Хайденрайх Регина (DE),
Хоуп Майкл Дж. (СА), Ясни Эдит,
Лаццаро Сандра (DE), Линь Пауло**

**Цзя Цинь (СА), Лутц Йоханнес (DE),
Мун Барбара (СА), Петш Бенджамин,
Раух Сюзанна, Швендт Ким Эллен
(DE), Там Ин (СА)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2015164674
WO-A1-2015199952
WO-A1-2012019630
WO-A1-2016176330
WO-A1-2013143555
WO-A1-2014028487
WO-A2-2006138380
WO-A1-2013086373
WO-A1-2011143230
WO-A1-2017075531
WO-A2-2017049245

(57) Изобретение относится к липидным наночастицам, содержащим мРНК, и путям их применения в медицине. Липидные наночастицы согласно настоящему изобретению содержат катионный липид в соответствии с формулой (III)



и соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок; где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей указанную наночастицу, и применению указанных липидных наночастиц в качестве вакцин или лекарственных препаратов, в частности, для вакцинации против гриппа или бешенства.

041756 B1

041756 B1

Предпосылки изобретения

Изобретение относится к липидным наночастицам, содержащим мРНК, применимым в качестве вакцин на основе мРНК. Дополнительно, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей липидные наночастицы, содержащие мРНК, и применению липидных наночастиц, содержащих мРНК, или композиции для получения фармацевтической композиции, в частности вакцины, например, для применения в профилактике или лечении инфекционных заболеваний, опухолевых или раковых заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний. В настоящем изобретении дополнительно описывается способ лечения или профилактики вышеуказанных заболеваний.

Генная терапия и генетическая вакцинация относятся к наиболее перспективным и быстро развивающимся способам современной медицины. Они могут обеспечивать высокоспецифичные и индивидуальные варианты терапии большого разнообразия заболеваний.

Генетическая вакцинация позволяет вызывать необходимый иммунный ответ на выбранные антигены, такие как характерные компоненты поверхности бактериальных клеток, вирусные частицы, опухолевые антигены или т.п. В целом, вакцинация является одним из важнейших достижений современной медицины. Однако эффективные вакцины в настоящее время доступны только для ограниченного количества заболеваний. Соответственно, инфекции, которые не поддаются предупреждению посредством вакцинации, по-прежнему ежегодно поражают миллионы людей.

Вакцины обычно могут подразделяться на вакцины "первого", "второго" и "третьего" поколения. Вакцины "первого поколения", как правило, представляют собой вакцины на основе целых организмов. В их основе лежат живые и аттенуированные либо убитые патогены, например вирусы, бактерии или т.п. Основным недостатком живых и аттенуированных вакцин является риск реверсии к вариантам, опасным для жизни. Таким образом, такие патогены, хоть и будучи аттенуированными, могут по-прежнему по своей природе нести в себе непредсказуемые риски. Убитые патогены могут не быть столь эффективными, как это необходимо для формирования специфического иммунного ответа. С целью сведения к минимуму таких рисков разрабатывали вакцины "второго поколения". Они, как правило, представляют собой субъединичные вакцины, состоящие из определенных антигенов или рекомбинантных белковых компонентов, полученных из патогенов.

Генные вакцины, т.е. вакцины для генетической вакцинации, обычно понимаются как вакцины "третьего поколения". Они, как правило, состоят из созданных способами генетической инженерии молекул нуклеиновых кислот, которые обеспечивают возможность экспрессии фрагментов пептидов или белков (антигенов), характерных для патогена или опухолевого антигена, *in vivo*. Генные вакцины экспрессируются при введении пациенту после поглощения клетками-мишенями. Экспрессия введенных нуклеиновых кислот приводит к выработке кодируемых белков. В случае, если такие белки распознаются иммунной системой пациента как чужеродные, запускается иммунный ответ.

ДНК, а также РНК могут применяться в качестве молекул нуклеиновых кислот для введения в рамках генетической вакцинации. Известно, что ДНК является относительно стабильной и легкой в обращении.

Однако применение ДНК несет в себе риск нежелательной вставки вводимых фрагментов ДНК в геном пациента, что потенциально приводит в результате к мутагенным событиям, таким как потеря функции нарушенных генов. Появляется дополнительный риск в виде нежелательного образования антител к ДНК. Другим недостатком является ограниченный уровень экспрессии кодируемого пептида или белка, достигаемый при введении ДНК, поскольку ДНК должна поступить в ядро для того, чтобы транскрибироваться, прежде чем получаемая в результате мРНК может быть транслирована. Уровень экспрессии вводимой ДНК будет зависеть, среди других причин, от наличия специфических факторов транскрипции, регулирующих транскрипцию ДНК. В отсутствие таких факторов в результате транскрипции ДНК не будут образовываться достаточные количества РНК. В результате этого достигаемый уровень транслируемого пептида или белка является ограниченным.

При применении РНК вместо ДНК для генетической вакцинации риск нежелательной интеграции в геном и образования антител к ДНК сводится к минимуму или избегается. Однако, РНК считается довольно нестабильным молекулярным объектом, который может легко разрушаться под действием повсеместно распространенных РНКаз.

Вакцины на основе мРНК, содержащие мРНК, кодирующую антиген, в комплексе с протамином, уже были описаны в предшествующем уровне техники (например, Petsch et al., Nat. Biotechnol. 2012 Dec; 30(12):1210-6., Schnee et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 2016 Jun 23; 10(6):e0004746, EP 1083232, WO 2010/037539, WO 2012/116811, WO 2012/116810 и WO 2015/024665). Также в WO 2016/176330 описаны композиции на основе липидных наночастиц, содержащие РНК с модифицированными нуклеозидами, кодирующую различные антигены.

Даже при условии достижения значительного прогресса за последние годы в данной области техники по-прежнему существует необходимость в обеспечении эффективного способа вакцинации с помощью мРНК, который позволяет вызывать адаптивный иммунный ответ, где введение значительно не ухудшается ввиду раннего разрушения антигена или ввиду неэффективной трансляции мРНК, обусловленной неэффективным высвобождением мРНК в клетку. Кроме того, существует острая необходимость

в уменьшении дозы вакцин на основе мРНК для уменьшения потенциальных проблем безопасности и для того, чтобы сделать вакцины доступными для стран третьего мира.

Существует множество трудностей, связанных с доставкой нуклеиновых кислот для обеспечения необходимого ответа в биологической системе. Терапевтические средства на основе нуклеиновых кислот, такие как вакцины, имеют огромный потенциал, однако остается необходимость в более эффективной доставке нуклеиновых кислот в подходящие участки в клетке или организме для реализации данного потенциала.

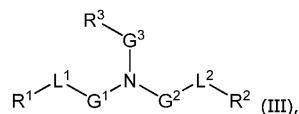
Однако при применении олигонуклеотидов в терапевтическом контексте в настоящее время сталкиваются с двумя проблемами. Во-первых, свободные РНК являются восприимчивыми к расщеплению нуклеазами в плазме крови. Во-вторых, свободные РНК обладают ограниченной способностью к получению доступа во внутриклеточное пространство, где находится соответствующий аппарат трансляции. Липидные наночастицы, образованные из катионных липидов и других липидных компонентов, таких как нейтральные липиды, холестерин, PEG, пегилированные липиды и олигонуклеотиды, применялись для блокирования разрушения РНК в плазме крови и облегчения поглощения олигонуклеотидов клетками.

Остается необходимость в улучшенных катионных липидах и липидных наночастицах для доставки олигонуклеотидов. Эти липидные наночастицы предпочтительно будут обеспечивать оптимальные соотношения лекарственное средство:липид, защищать нуклеиновую кислоту от разрушения и выведения из сыворотки крови, являться подходящими для системной или локальной доставки и обеспечивать внутриклеточную доставку нуклеиновой кислоты. Кроме того, такие липидные частицы, содержащие нуклеиновые кислоты, должны быть хорошо переносимыми и иметь надлежащий терапевтический индекс, так, чтобы лечение пациента нуклеиновой кислотой в эффективной дозе не было связано с неприемлемой токсичностью и/или риском для пациента. Настоящее изобретение обеспечивает эти и связанные преимущества.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены липидные наночастицы, содержащие мРНК, или фармацевтические композиции, содержащие указанные наночастицы, а также пути их применения. Липидные наночастицы, содержащие мРНК, в соответствии с настоящим изобретением содержат:

(i) катионный липид формулы III



или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер или стереоизомер, причем указанный катионный липид присутствует в количестве от приблизительно 30 до приблизительно 70 мольных процентов, где

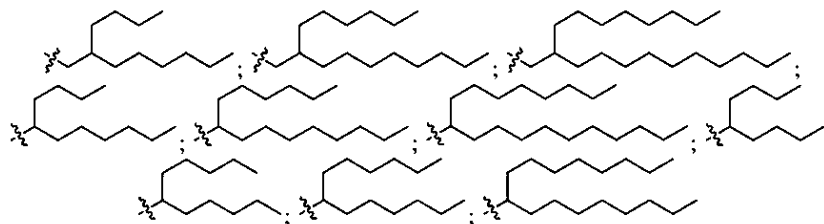
L^1 и L^2 каждый независимо представляет собой ---O(C=O)--- или (C=O)---O--- ;

G^1 и G^2 каждый независимо представляет собой незамещенный $\text{C}_1\text{---C}_{12}$ алкилен или $\text{C}_1\text{---C}_{12}$ алкенилен;

G^3 представляет собой $\text{C}_1\text{---C}_{24}$ алкилен или $\text{C}_1\text{---C}_{24}$ алкенилен; и

R^3 представляет собой H или OR^5 , где R^5 представляет собой H или $\text{C}_1\text{---C}_6$ алкил; и

R^1 и R^2 каждый независимо имеет одну из следующих структур:



(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок;

где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие указанные липидные наночастицы, а также способы получения указанных наночастиц. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к путям применения липидных наночастиц или фармацевтической композиции, содержащей их, в медицине.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способам медицинской профилактики или лечения с применением указанных липидных наночастиц, содержащих мРНК.

Определения

Для ясности и удобочитаемости представлена следующая научная справочная информация и определения. Любые раскрываемые технические признаки тем самым могут являться частью всех без исключения вариантов осуществления настоящего изобретения. В контексте настоящего изобретения могут

быть представлены дополнительные определения и пояснения.

Если не указано иное или если в конкретном контексте не требуется иное, все технические термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в соответствующей области техники.

Если в контексте не указано или не требуется иное, слова "содержат", "содержит" и "содержащий" и подобные выражения следует толковать в данном описании и в формуле изобретения в открытом и включительном смысле как "включающий без ограничения".

Выражения "один вариант осуществления", "вариант осуществления", "конкретный вариант осуществления" и т.п. означают, что конкретные признак, свойство или характеристика или конкретная группа или комбинация признаков, свойств или характеристик, упоминаемые в сочетании с соответствующим выражением, присутствуют по меньшей мере в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения. Такие выражения, находящиеся в различных местах во всем данном описании, не обязательно относятся к одному и тому же варианту осуществления. Более того, конкретные признаки, свойства или характеристики можно комбинировать любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

Формы единственного числа следует понимать как включающие ссылку на множественное число, если контекст явно не предусматривает иное.

Процентные доли применительно к числам следует понимать как приведенные относительно общего количества соответствующих объектов. В других случаях и если контекст не предусматривает иное, процентные доли следует понимать как процентные доли по весу (вес.%).

В контексте настоящего изобретения "композиция" относится к любому типу композиции, в состав которой могут быть включены указанные ингредиенты, необязательно наряду с любыми дополнительными составляющими, обычно по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем. Таким образом, композиция может представлять собой сухую композицию, такую как порошок или гранулы, или твердую единичную форму, такую как лиофилизированная форма или таблетка. В качестве альтернативы, композиция может находиться в жидкой форме, и каждая составляющая может быть независимо включена в растворенной или диспергированной (например, суспензированной или эмульгированной) формах. В одном из предпочтительных вариантов осуществления композиция составлена в виде стерильной твердой композиции, такой как порошок или лиофилизированная форма, для разведения водным жидким носителем. Такой состав также является предпочтительным для тех вариантов композиции, которые содержат нуклеиновую кислоту-карго, как более подробно описывается ниже.

Как используется в данном документе, "соединение" означает химическое вещество, которое представляет собой материал, состоящий из молекул, обладающих по сути одинаковыми химической структурой и свойствами. В случае с низкомолекулярным соединением молекулы, как правило, являются идентичными в том, что касается их атомного состава и структурной конфигурации. В случае с макромолекулярным или полимерным соединением молекулы соединения характеризуются высокой степенью сходства, но не обязательно все из них являются идентичными. Например, сегмент полимера, указываемый как состоящий из 50 мономерных единиц, также может включать отдельные молекулы с, например, 48 или 53 мономерными звеньями.

Липидоидное соединение, также просто называемое липидоидом, представляет собой липидоподобное соединение, т.е. амфифильное соединение с липидоподобными физическими свойствами. В контексте настоящего изобретения считается, что термин "липид" охватывает липидоиды.

Если из конкретного контекста не очевидно другое значение, термин "катионный" означает, что соответствующая структура несет положительный заряд, постоянно или непостоянно, но в результате воздействия определенных условий, таких как pH. Таким образом, термин "катионный" охватывает как "постоянно катионный", так и "катионизируемый".

Как используется в данном документе, "постоянно катионный" означает, что соответствующие соединения, или группа, или атом являются положительно заряженными при любых значениях pH или активности ионов водорода в их среде. Как правило, положительный заряд обусловлен наличием четвертичного атома азота. В случае, если соединение несет множество таких положительных зарядов, оно может называться постоянно поликатионным, что является подкатегорией "постоянно катионного".

Катионные компонент/соединение. Термин "катионные компонент/соединение", как правило, относится к заряженной молекуле, которая является положительно заряженной (катионной) при значении pH, составляющем, как правило, приблизительно 1-9. В некоторых вариантах осуществления катионные компонент/соединение предпочтительно являются заряженными при значении pH, равном или меньшем 9 (например, 5-9), равном или меньшем 8 (например, 5-8), равном или меньшем 7 (например, 5-7), наиболее предпочтительно при физиологических значениях pH, например, составляющих приблизительно 7,3-7,4. Соответственно, катионный пептид, белок, полисахарид, липид или полимер в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения является положительно заряженным в физиологических условиях, в частности в физиологических условиях солевого режима клетки *in vivo*. В другом предпочтительном варианте осуществления липидная наночастица, катионный пептид, белок, полисахарид,

липид или полимер в соответствии с настоящим изобретением являются незаряженными, имеют нейтральный заряд или являются относительно электронейтральными в физиологических условиях, в частности в физиологических условиях солевого режима клетки *in vivo*. Катионный пептид или белок предпочтительно содержит большее количество катионных аминокислот, например большее количество Arg, His, Lys или Orn, чем других аминокислотных остатков (в частности, больше катионных аминокислот, чем анионных аминокислотных остатков, таких как Asp или Glu), или содержит блоки, образованные преимущественно катионными аминокислотными остатками. Выражение "катионный" также может относиться к "поликатионным" компонентам/соединениям.

Катионные компонент/соединение также могут относиться к катионному липиду, способному быть положительно заряженным. Иллюстративные катионные липиды содержат одну или несколько аминокислотных групп, которые несут положительный заряд. Предпочтительные катионные липиды являются ионизируемыми, так что они могут существовать в положительно заряженной или нейтральной форме в зависимости от pH. Ионизация катионного липида влияет на поверхностный заряд липидной наночастицы (LNP) в различных условиях pH. Это зарядовое состояние может оказывать влияние на адсорбцию белков плазмы крови, выведение из крови и распределение в тканях (Semple S.C. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:3-17 (1998)), а также способность к образованию небеслойных структур (Hafez I.M. et al., *Gene Ther* 8:1188-1196 (2001)), которые являются критически важными для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот. Как описано в других источниках, pK_a составленных катионных липидов коррелирует с эффективностью LNP при доставке нуклеиновых кислот (см. Jayaraman et al., *Angewandte Chemie, International Edition* (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al., *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010)). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предпочтительный диапазон pK_a составляет от приблизительно 5 до приблизительно 7.

В данном контексте приставка "поли-" относится к множеству атомов или групп в соединении, обладающих соответствующим свойством. В случае заключения в круглые скобки наличие множества является необязательным. Например, (поли)катионный означает катионный и/или поликатионный. Однако отсутствие приставки не следует интерпретировать как исключение множества. Например, поликатионное соединение также является катионным соединением и может называться таковым.

"Катионируемый" означает, что соединение, или группа, или атом являются положительно заряженными при более низком pH и незаряженными при более высоком pH их среды. Также в неводных средах, где не может быть определено значение pH, катионируемые соединения, группа или атом являются положительно заряженными при высокой концентрации ионов водорода и незаряженными при низкой концентрации или активности ионов водорода. Это зависит от индивидуальных свойств катионируемого или поликатионируемого соединения, в частности от pK_a соответствующих катионируемых группы или атома, того, при каком значении pH или концентрации ионов водорода оно является заряженным или незаряженным. В разбавленных водных средах долю катионируемых соединений, групп или атомов, несущих положительный заряд, можно оценивать с помощью так называемого уравнения Гендерсона-Хассельбаха, хорошо известного специалисту в данной области.

Например, в некоторых вариантах осуществления в случае, если соединение или компонент являются катионируемыми, предпочтительно, чтобы они были положительно заряженными при значении pH, составляющем приблизительно 1-9, предпочтительно 4-9, 5-8 или даже 6-8, более предпочтительно при значении pH, равном или меньшем 9, равном или меньшем 8, равном или меньшем 7, наиболее предпочтительно при физиологических значениях pH, например, составляющих приблизительно 7,3-7,4, т.е. в физиологических условиях, в частности в физиологических условиях солевого режима клетки *in vivo*. В других вариантах осуществления предпочтительно, чтобы катионируемые соединения или компонент были преимущественно нейтральными при физиологических значениях pH, например, составляющих приблизительно 7,0-7,4, но становились положительно заряженными при более низких значениях pH. В некоторых вариантах осуществления предпочтительный диапазон pK_a для катионируемого соединения или компонента составляет от приблизительно 5 до приблизительно 7.

Нуклеиновая кислота. Термин "нуклеиновая кислота" означает любую молекулу ДНК или РНК. Данный термин может использоваться в отношении полинуклеотида и/или олигонуклеотида. Во всех случаях, где в данном документе упоминается нуклеиновая кислота или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конкретный белок и/или пептид, указанная нуклеиновая кислота или последовательность нуклеиновой кислоты соответственно предпочтительно также содержит регуляторные последовательности, обеспечивающие в организме подходящего хозяина, например, человека, возможность ее экспрессии, т.е. транскрипции и/или трансляции последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей конкретный белок или пептид.

Модификация нуклеозидов. В контексте настоящего изобретения термин "модификация нуклеозидов" относится к молекулам мРНК или соединениям, содержащим нуклеозиды, которые обычно не являются частью мРНК, предпочтительно неприродные нуклеозиды. В частности, данный термин предпочтительно относится к нуклеозидам мРНК, отличным от аденина, гуанина, цитозина, урацила и в некоторых случаях тимина.

Пептид. Пептид представляет собой олигомер или полимер по меньшей мере из двух аминокислот-

мономеров. Мономеры обычно соединены пептидными связями. Термин "пептид" не ограничивает длину полимерной цепи из аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пептид может, например, содержать менее 50 мономерных звеньев. Более длинные пептиды также называются полипептидами и, как правило, имеют 50-600 мономерных звеньев, более конкретно 50-300 мономерных звеньев.

Белок. Белок, как правило, состоит из одного или нескольких пептидов и/или полипептидов, свернутых в 3-мерную форму, облегчающую выполнение ими биологической функции.

Пандемия гриппа или пандемическая инфлюэнца. Пандемия гриппа может иметь место, когда вирус гриппа, отличный от человеческого (новый), приобретает способность к эффективной и устойчивой передаче от человека к человеку, а затем распространяется в глобальном масштабе. Вирусы гриппа, которые обладают потенциалом вызывания пандемии, называются "вирусами гриппа с пандемическим потенциалом" или "пандемическими вирусами гриппа".

Примеры вирусов гриппа с пандемическим потенциалом включают вирус птичьего гриппа А (H5N1) и вирус птичьего гриппа А (H7N9), которые являются двумя разными вирусами "птичьего гриппа". Они являются вирусами, отличными от человеческих (т.е. они являются новыми для людей и циркулируют среди птиц в различных частях света), поэтому иммунитет к таким вирусам у людей вырабатывается на уровне от незначительного до отсутствующего. Инфицирование людей такими вирусами происходит редко, но если бы какой-либо из этих вирусов изменился таким образом, что мог бы легко инфицировать людей и легко распространяться от человека к человеку, то могла бы произойти пандемия гриппа.

Вакцина от пандемического гриппа/инфлюэнцы или вакцина против пандемического гриппа/инфлюэнцы. Вакцина, направленная против пандемического вируса гриппа, называется в данном документе вакциной от пандемического гриппа/инфлюэнцы или вакциной против пандемического гриппа/инфлюэнцы.

Сезон инфлюэнцы/гриппа. Сезон инфлюэнцы представляет собой ежегодно повторяющийся период времени, который характеризуется распространенностью вспышек гриппа (инфлюэнцы). Сезон имеет место во время холодной половины года в каждом полушарии. Активность вирусов гриппа иногда можно предсказать и даже отследить в географическом отношении. Хотя начало периода основной активности вируса гриппа в каждом сезоне варьируется в зависимости от местоположения, в любом конкретном местоположении этим незначительным вспышкам эпидемии обычно требуется приблизительно 3 недели для достижения пика и еще 3 недели для значительного ослабления. Для ослабления эффектов сезона гриппа применялись вакцинации от гриппа; вакцинации от пневмонии дополнительно ослабляют эффекты и осложнения сезона гриппа. Поскольку в Северном и Южном полушариях зима наступает в разное время года, фактически ежегодно имеют место два сезона гриппа.

Вакцина от сезонного гриппа/инфлюэнцы или вакцина против сезонного гриппа/инфлюэнцы. Вакцина, направленная против сезонно встречающихся вирусов гриппа в сезон гриппа, называется в данном документе "вакциной от сезонного гриппа/инфлюэнцы или вакциной против сезонного гриппа/инфлюэнцы".

Иммунная система. Иммунная система может защищать организмы от инфекции. Если патоген преодолевает физический барьер организма и поступает в данный организм, то врожденная иммунная система обеспечивает немедленный, но неспецифический ответ. Если патогены ускользают от данного врожденного ответа, то у позвоночных задействуется второй уровень защиты - адаптивная иммунная система. В этом случае иммунная система адаптирует свой ответ во время инфекции для улучшения распознавания ею патогена. Данный улучшенный ответ затем сохраняется после устранения патогена в виде иммунологической памяти и позволяет адаптивной иммунной системе осуществлять более быстрые и более сильные атаки каждый раз при встрече с данным патогеном. В соответствии с этим иммунная система включает врожденную и адаптивную иммунную систему. Каждая из этих двух частей содержит так называемые гуморальные и клеточные компоненты.

Иммунный ответ. Иммунный ответ может, как правило, представлять собой специфическую реакцию адаптивной иммунной системы на конкретный антиген (так называемый специфический или адаптивный иммунный ответ) либо неспецифическую реакцию врожденной иммунной системы (так называемый неспецифический или врожденный иммунный ответ). Настоящее изобретение в сущности относится к специфическим реакциям (адаптивным иммунным ответам) адаптивной иммунной системы. В частности, оно относится к адаптивным иммунным ответам на инфекции, вызываемые вирусами, такими как, например, вирусы гриппа. Однако этот специфический ответ может поддерживаться дополнительной неспецифической реакцией (врожденным иммунным ответом). Следовательно, настоящее изобретение также относится к соединению для одновременной стимуляции врожденной и адаптивной иммунной системы с целью вызывания эффективного адаптивного иммунного ответа.

Адаптивная иммунная система. Адаптивная иммунная система состоит из высокоспециализированных системных клеток и процессов, обеспечивающих устранение или предупреждение роста патогенов. Адаптивный иммунный ответ наделяет иммунную систему способностью к распознаванию и запоминанию специфических патогенов (для формирования иммунитета) и осуществлению более сильных атак

каждый раз при встрече с данным патогеном. Данная система является высокоадаптируемой вследствие соматической гипермутации (процесса увеличения частоты соматических мутаций) и V(D)J-рекомбинации (необратимой генетической рекомбинации сегментов генов рецепторов антигенов). Данный механизм позволяет небольшому количеству генов образовывать огромное количество различных рецепторов антигенов, которые в таком случае уникальным образом экспрессируются в каждом отдельном лимфоците. Поскольку перестройка генов приводит к необратимому изменению ДНК каждой клетки, все потомство (потомки) этой клетки, в том числе В-клеток памяти и Т-клеток памяти, которые являются ключевыми в обеспечении длительного специфического иммунитета, будет в таком случае наследовать гены, кодирующие рецептор с одной и той же специфичностью. Теория иммунной сети является теорией того, как работает адаптивная иммунная система, основанной на взаимодействиях между вариабельными областями рецепторов Т-клеток, В-клеток и молекул, образующихся в Т-клетках и В-клетках, которые имеют вариабельные области.

Адаптивный иммунный ответ. Адаптивный иммунный ответ, как правило, понимается как антиген-специфический. Антигенная специфичность обеспечивает возможность формирования специализированных иммунных ответов на специфические антигены, патогены или клетки, инфицированные патогенами. Способность к осуществлению этих специализированных ответов поддерживается в организме "клетками памяти". В случае, если патоген инфицирует организм более одного раза, такие специфические клетки памяти используются для его быстрого устранения. В данной ситуации первая стадия адаптивного иммунного ответа представляет собой активацию "необученных" антигенспецифических Т-клеток или различных иммунных клеток, способных индуцировать антигенспецифический иммунный ответ, антигенпрезентирующими клетками. Это происходит в лимфоидных тканях и органах, через которые постоянно проходят "необученные" Т-клетки. Типами клеток, которые могут служить в качестве антигенпрезентирующих клеток, являются, помимо прочего, дендритные клетки, макрофаги и В-клетки. Каждая из этих клеток имеет свою собственную функцию в вызывании иммунных ответов. Дендритные клетки поглощают антигены путем фагоцитоза и макропиноцитоза, и посредством контакта с, например, чужеродным антигеном стимулируется их миграция в локальную лимфоидную ткань, где они дифференцируются в зрелые дендритные клетки. Макрофаги поглощают корпускулярные антигены, такие как бактерии, и возбудители инфекции или другие подходящие стимулы индуцируют в них экспрессию молекул МНС. Уникальная способность В-клеток к связыванию и интернализации растворимых белковых антигенов посредством своих рецепторов также может быть важной для индукции Т-клеток. Презентация антигена на молекулах МНС приводит к активации Т-клеток, что индуцирует их пролиферацию и дифференцировку в "вооруженные" эффекторные Т-клетки. Наиболее важной функцией эффекторных Т-клеток является уничтожение инфицированных клеток $CD8^+$ цитотоксическими Т-клетками и активация макрофагов Th1-клетками, которые вместе формируют клеточно-опосредованный иммунитет, а также активация как Th2-, так и Th1-клетками выработки в В-клетках различных классов антител с управлением таким образом гуморальным иммунным ответом. Т-клетки распознают антиген с помощью своих Т-клеточных рецепторов, которые не распознают антиген и не связываются с ним непосредственно, а вместо этого распознают короткие пептидные фрагменты, например, белковых антигенов патогена, связанные с молекулами МНС на поверхности других клеток.

Клеточный иммунитет/клеточный иммунный ответ. Клеточный иммунитет, как правило, относится к активации макрофагов, естественных клеток-киллеров (NK), антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов и высвобождению различных цитокинов в ответ на воздействие антигена. В более общем смысле клеточный иммунитет связан не с антителами, а с активацией клеток иммунной системы. Клеточный иммунный ответ характеризуется, например, активацией антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, способных индуцировать апоптоз в клетках организма, на поверхности которых представлены эпитопы антигена, таких как клетки, инфицированные вирусом, клетки с внутриклеточными бактериями и раковые клетки, на которых представлены опухолевые антигены; активацией макрофагов и естественных клеток-киллеров, что позволяет им уничтожать патогены; и стимуляцией секреции клетками разнообразных цитокинов, оказывающих влияние на функцию других клеток, участвующих в адаптивных иммунных ответах и врожденных иммунных ответах.

Гуморальный иммунитет/гуморальный иммунный ответ. Гуморальный иммунитет, как правило, относится к выработке антител и вспомогательным процессам, которые могут ей сопутствовать. Гуморальный иммунный ответ может, как правило, характеризоваться, например, активацией Th2 и выработкой цитокинов, образованием зародышевых центров и переключением изотипов, созреванием аффинности и образованием клеток памяти. Гуморальный иммунитет также, как правило, может относиться к эффекторным функциям антител, которые включают нейтрализацию патогенов и токсинов, классический путь активации системы комплемента и способствование опсонинами фагоцитозу и устранению патогенов.

Врожденная иммунная система. Врожденная иммунная система, также известная как неспецифическая иммунная система, включает в себя клетки и механизмы, обеспечивающие неспецифическую защиту организма-хозяина от инфицирования другими организмами. Это означает, что клетки врожденной системы распознают патогены и отвечают на них общим образом, и она, в отличие от адаптивной иммунной системы, не обеспечивает длительный или защитный иммунитет организма-хозяина. Врожден-

ная иммунная система может быть, например, активирована лигандами для рецепторов патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), например, Toll-подобных рецепторов (TLR), или другими вспомогательными веществами, такими как липополисахариды, TNF-альфа, лиганд для CD40, или цитокинами, монокинами, лимфокинами, интерлейкинами или хемокинами, 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, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-бета, TNF-альфа, факторами роста и hGH, лигандом для Toll-подобного рецептора человека TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, лигандом для Toll-подобного рецептора мыши TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 или TLR13, лигандом для NOD-подобного рецептора, лигандом для RIG-I-подобного рецептора, иммуностимулирующей нуклеиновой кислотой, иммуностимулирующей РНК (isRNA), CpG-содержащей ДНК, антибактериальным средством или противовирусным средством. Как правило, ответ врожденной иммунной системы включает привлечение иммунных клеток к очагам инфекции посредством выработки химических факторов, в том числе специализированных химических медиаторов, называемых цитокинами; активацию каскада реакций системы комплемента; идентификацию и удаление чужеродных веществ, присутствующих в органах, тканях, крови и лимфе, с помощью специализированных лейкоцитов; активацию адаптивной иммунной системы посредством процесса, известного как презентация антигена; и/или выполнение функции физического и химического барьера для возбудителей инфекции.

Адьювант/адьювантный компонент. Адьювант или адьювантный компонент в наиболее широком смысле, как правило, представляет собой средство или композицию (например, фармакологические или иммунологические), которые могут модифицировать, например усиливать, эффективность других средств, таких как лекарственное средство или вакцина. Данный термин в контексте настоящего изобретения традиционно относится к соединению или композиции, которые служат в качестве носителя или вспомогательного вещества для иммуногенов и/или других фармацевтически активных соединений. Его следует интерпретировать в широком смысле, и он относится к широкому спектру веществ, способных увеличивать иммуногенность антигенов, объединяемых с указанным адьювантом или вводимых совместно с ним. В контексте настоящего изобретения адьювант предпочтительно будет усиливать специфический иммуногенный эффект действующих веществ согласно настоящему изобретению. Как правило, термины "адьювант" или "адьювантный компонент" имеют одно и то же значение и могут использоваться совместно. Адьюванты могут подразделяться, например, на иммунопотенциаторы, системы доставки антигенов или даже их комбинации.

Термин "адьювант", как правило, понимается не как включающий средства, которые обеспечивают иммунитет сами по себе. Адьювант неспецифически помогает иммунной системе усиливать антигенспецифический иммунный ответ, например, способствуя презентации антигена иммунной системе или индукции неспецифического врожденного иммунного ответа. Кроме того, адьювант может, например, предпочтительно модулировать антигенспецифический иммунный ответ путем, например, сдвига от преимущественно Th2-зависимого антигенспецифического ответа к более Th1-зависимому антигенспецифическому ответу или наоборот. Соответственно, адьювант может благоприятным образом модулировать экспрессию/секрецию цитокинов, презентацию антигенов, тип иммунного ответа и т.д.

Иммуностимулирующая РНК. Иммуностимулирующая РНК (isRNA) в контексте настоящего изобретения может, как правило, представлять собой РНК, которая сама по себе способна индуцировать врожденный иммунный ответ. Она обычно не имеет открытой рамки считывания и, таким образом, на ней не образуется пептидный антиген или иммуноген, но она вызывает врожденный иммунный ответ, например, путем связывания с конкретным типом Toll-подобных рецепторов (TLR) или другими подходящими рецепторами. Однако разумеется, мРНК, имеющая открытую рамку считывания и кодирующая пептид/белок (например, с антигенной функцией), также может индуцировать врожденный иммунный ответ.

Антиген. В контексте настоящего изобретения "антиген", как правило, относится к веществу, которое может распознаваться иммунной системой, предпочтительно адаптивной иммунной системой, и способно запускать антигенспецифический иммунный ответ, например путем образования антител и/или антигенспецифических Т-клеток, в качестве части адаптивного иммунного ответа. Как правило, антиген может представлять собой или может содержать пептид или белок, который может быть презентируван с помощью МНС Т-клеткам. В смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, антиген может представлять собой продукт трансляции предоставляемой молекулы нуклеиновой кислоты, предпочтительно мРНК, определенной в данном документе. В данном контексте фрагменты, варианты и производные пептидов и белков, содержащие по меньшей мере один эпитоп, также понимаются как антигены.

Эпитоп (также называемый "антигенной детерминантой"). Т-клеточные эпитопы или части белков в контексте настоящего изобретения могут содержать фрагменты, предпочтительно имеющие длину, составляющую от приблизительно 6 до приблизительно 20 или еще большего количества аминокислот, например, фрагменты, процессированные и презентируемые молекулами МНС I класса, предпочтительно имеющие длину, составляющую от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот, например 8, 9 или 10 (или даже 11 или 12 аминокислот), или фрагменты, процессированные и презентируемые мо-

лекулами МНС II класса, предпочтительно имеющие длину, составляющую приблизительно 13 или больше аминокислот, например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или еще больше аминокислот, где эти фрагменты могут быть выбраны из любой части аминокислотной последовательности. Эти фрагменты, как правило, распознаются Т-клетками в виде комплекса, состоящего из пептидного фрагмента и молекулы МНС.

В-клеточные эпитопы, как правило, представляют собой фрагменты, расположенные на наружной поверхности (нативных) белковых или пептидных антигенов, определенных в данном документе, предпочтительно содержащие 5-15 аминокислот, более предпочтительно содержащие 5-12 аминокислот, еще более предпочтительно содержащие 6-9 аминокислот, которые могут распознаваться антителами, т.е. в их нативной форме.

Такие эпитопы белков или пептидов могут, кроме того, быть выбраны из любых упомянутых в данном документе вариантов таких белков или пептидов. В данном контексте антигенные детерминанты могут представлять собой конформационные или прерывистые эпитопы, состоящие из сегментов белков или пептидов, определенных в данном документе, которые являются прерывистыми в аминокислотной последовательности белков или пептидов, определенных в данном документе, но собраны воедино в трехмерной структуре или непрерывных или линейных эпитопах, которые состоят из одной полипептидной цепи.

Вакцина. Вакцина, как правило, понимается как профилактический или терапевтический материал, предоставляющий по меньшей мере один антиген или антигенную функцию. Антиген или антигенная функция могут стимулировать обеспечение адаптивной иммунной системой организма адаптивного иммунного ответа.

мРНК, обеспечивающая образование антигена. мРНК, обеспечивающая образование антигена, в контексте настоящего изобретения может, как правило, представлять собой мРНК, имеющую по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая может транслироваться в клетке или организме, которым предоставлена данная мРНК. Продуктом данной трансляции является пептид или белок, который может выступать в качестве антигена, предпочтительно в качестве иммуногена. Продуктом также может быть слитый белок, состоящий из более чем одного иммуногена, например слитый белок, состоящий из двух или более эпитопов, пептидов или белков, полученных из одного и того же или из различных вирусных белков, где эпитопы, пептиды или белки могут быть соединены линкерными последовательностями.

Искусственная (последовательность) мРНК. Искусственная (последовательность) мРНК может, как правило, пониматься как молекула мРНК, не встречающаяся в природе. Другими словами, искусственная молекула мРНК может пониматься как неприродная молекула мРНК. Такая молекула мРНК может быть неприродной благодаря своей индивидуальной последовательности (которая не встречается в природе) и/или благодаря другим модификациям, например структурным модификациям нуклеотидов, которые не встречаются в природе. Как правило, искусственные молекулы мРНК можно разрабатывать и/или создавать с помощью способов генной инженерии таким образом, чтобы они соответствовали необходимой искусственной последовательности нуклеотидов (гетерологичной последовательности). В данном контексте искусственная последовательность обычно представляет собой последовательность, которая может не встречаться в природе, т.е. она отличается от последовательности дикого типа по меньшей мере одним нуклеотидом. Термин "дикий тип" может пониматься как последовательность, встречающаяся в природе. Дополнительно, термин "искусственная молекула нуклеиновой кислоты" не ограничивается тем, что означает "одну-единственную молекулу", и он, как правило, понимается как включающий совокупность идентичных молекул. Соответственно, он может относиться к множеству идентичных молекул, содержащихся в аликвоте.

Би-/полицистронная мРНК. Это мРНК, которая, как правило, может иметь две (бицистронная) или более (полицистронная) открытые рамки считывания (ORF) (кодирующие области или кодирующие последовательности). Открытая рамка считывания в данном контексте представляет собой последовательность из нескольких нуклеотидных триплетов (кодонов), которая может транслироваться в пептид или белок. В результате трансляции такой мРНК образуются два (бицистронная) или более (полицистронная) различающихся между собой продукта трансляции (при условии, что ORF не являются идентичными). Для экспрессии у эукариот такие мРНК могут, например, содержать последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES).

Моноцистронная мРНК. Моноцистронная мРНК может, как правило, представлять собой мРНК, которая содержит только одну открытую рамку считывания (кодирующую последовательность или кодирующую область). Открытая рамка считывания в данном контексте представляет собой последовательность из нескольких нуклеотидных триплетов (кодонов), которая может транслироваться в пептид или белок.

5'-кэп-структура. 5'-кэп, как правило, представляет собой модифицированный нуклеотид (аналог кэп-структуры), в частности гуаниновый нуклеотид, добавленный к 5'-концу молекулы мРНК. 5'-кэп предпочтительно добавляется с использованием 5'-5'-трифосфатной связи (и он также называется m7GpppN). Дополнительные примеры 5'-кэп-структур включают глицерил, "перевернутый" дезоксири-

бозный остаток (компонент), лишенный азотистого основания, 4',5'-метиленимодифицированный нуклеотид, 1-(бета-D-эритрофуранозил)-модифицированный нуклеотид, 4'-тиомодифицированный нуклеотид, карбоциклический нуклеотид, 1,5-ангидрогекситмодифицированный нуклеотид, L-нуклеотиды, альфа-нуклеотид, нуклеотид с модифицированным азотистым основанием, треопентофуранозилмодифицированный нуклеотид, ациклический 3',4'-секо-нуклеотид, ациклический 3,4-дигидроксibuтилмодифицированный нуклеотид, ациклический 3,5-дигидроксипентилмодифицированный нуклеотид, 3'-3'-"перевернутый" нуклеотидный компонент, 3'-3'-"перевернутый" компонент, лишенный азотистого основания, 3'-2'-"перевернутый" нуклеотидный компонент, 3'-2'-"перевернутый" компонент, лишенный азотистого основания, 1,4-бутандиолфосфатный, 3'-фосфорамидатный, гексилфосфатный, аминогексилфосфатный, 3'-фосфатный, 3'-фосфотиоатный, фосфодитиоатный или мостиковый или немостиковый метилфосфонатный компонент. Эти модифицированные 5'-кэп-структуры можно применять в контексте настоящего изобретения для модификации последовательности мРНК композиции в соответствии с настоящим изобретением. Дополнительными модифицированными 5'-кэп-структурами, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, являются кэп 1 (дополнительное метилирование рибозы нуклеотида, смежного с m7GpppN), кэп 2 (дополнительное метилирование рибозы 2-го нуклеотида ниже m7GpppN), кэп 3 (дополнительное метилирование рибозы 3-го нуклеотида ниже m7GpppN), кэп 4 (дополнительное метилирование рибозы 4-го нуклеотида ниже m7GpppN), ARCA (аналог кэп-структуры с правильной ориентацией), модифицированный ARCA (например, фосфотиоатмодифицированный ARCA), инозин, N1-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-дезазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, LNA-гуанозин и 2-азидогуанозин.

В контексте настоящего изобретения 5'-кэп-структура может также быть образована в ходе химического синтеза РНК или транскрипции РНК *in vitro* (котранскрипционного экпирования) при использовании аналогов кэп-структур, или кэп-структура может быть образована *in vitro* при использовании экпирующих ферментов (например, коммерчески доступных наборов для экпирования).

Аналог кэп-структуры. Аналог кэп-структуры относится к неполимеризуемому динуклеотиду, который обладает функциональными возможностями кэп-структуры, выражающимися в том, что он облегчает трансляцию или локализацию и/или предупреждает разрушение молекулы РНК, будучи включенным в состав молекулы РНК на 5'-конце. Неполимеризуемый означает, что аналог кэп-структуры будет включен в состав только на 5'-конце, поскольку он не имеет 5'-трифосфата и, следовательно, не может удлиняться в 3'-направлении под действием матричнозависимой РНК-полимеразы.

Аналоги кэп-структур включают без ограничения химическую структуру, выбранную из группы, состоящей из m7GpppG, m7GpppA, m7GpppC; неметилированные аналоги кэп-структур (например, GpppG); диметилированный аналог кэп-структуры (например, m2,7GpppG), триметилированный аналог кэп-структуры (например, m2,2,7GpppG), диметилированные симметричные аналоги кэп-структур (например, m7Gpppm7G) или аналоги кэп-структур с правильной ориентацией (например, ARCA; m7,2'OmeGpppG, m7,2'dGpppG, m7,3'OmeGpppG, m7,3'dGpppG и их тетрафосфатные производные) (Stepinski et al., 2001. RNA 7(10): 1486-95).

Дополнительные аналоги кэп-структур были описаны ранее (US7074596, WO 2008/016473, WO 2008/157688, WO 2009/149253, WO 2011/015347 и WO 2013/059475). Недавно был описан синтез N7-(4-хлорфеноксиэтил)замещенных динуклеотидных аналогов кэп-структур (Kore et al. (2013) Bioorg. Med. Chem. 21(15): 4570-4).

Поли(С)-последовательность. Поли(С)-последовательность, как правило, представляет собой длинную последовательность из цитозиновых нуклеотидов, как правило, длиной от приблизительно 10 до приблизительно 200 цитозиновых нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 100 цитозиновых нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 70 цитозиновых нуклеотидов или еще более предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 50 или даже от приблизительно 20 до приблизительно 30 цитозиновых нуклеотидов. Поли(С)-последовательность может предпочтительно располагаться в 3'-направлении от кодирующей области, содержащейся в нуклеиновой кислоте.

Поли(А)-хвост/последовательность. Поли(А)-хвост, также называемый "3'-поли(А)-хвостом или поли(А)-последовательностью", как правило, представляет собой длинную последовательность из аденозиновых нуклеотидов длиной не более приблизительно 400 аденозиновых нуклеотидов, например, от приблизительно 25 до приблизительно 400, предпочтительно от приблизительно 50 до приблизительно 400, более предпочтительно от приблизительно 50 до приблизительно 300, еще более предпочтительно от приблизительно 50 до приблизительно 250, наиболее предпочтительно от приблизительно 60 до приблизительно 250 аденозиновых нуклеотидов, добавленную к 3'-концу РНК. Кроме того, поли(А)-последовательности или поли(А)-хвосты можно создавать *in vitro* путем ферментативного полиаденилирования РНК, например, с помощью поли(А)-полимераз, полученных из *E.coli* или дрожжей.

Полиаденилирование. Полиаденилирование, как правило, понимается как добавление поли(А)-последовательности к молекуле нуклеиновой кислоты, такой как молекула РНК, например, к незрелой мРНК. Полиаденилирование может быть индуцировано так называемым сигналом полиаденилирования. Данный сигнал предпочтительно расположен в пределах отрезка из нуклеотидов на 3'-конце молекулы

нуклеиновой кислоты, такой как молекула РНК, которая должна быть полиаденилирована. Сигнал полиаденилирования, как правило, содержит гексамер, состоящий из адениновых и урациловых/тиминовых нуклеотидов, предпочтительно гексамерную последовательность AAUAAA. Также допустимыми являются другие последовательности, предпочтительно гексамерные последовательности. Полиаденилирование, как правило, происходит во время процессинга пре-мРНК (также называемой незрелой мРНК). Как правило, созревание РНК (от пре-мРНК до зрелой мРНК) включает стадию полиаденилирования.

3'-нетранслируемая область (3'-UTR). 3'-UTR, как правило, представляет собой часть мРНК, которая расположена между областью, кодирующей белок (т.е. открытой рамкой считывания), и поли(А)-последовательностью мРНК. 3'-UTR мРНК не транслируется в аминокислотную последовательность. Последовательность 3'-UTR обычно кодируется геном, который транскрибируется в соответствующую мРНК в ходе процесса экспрессии гена. Геномная последовательность вначале транскрибируется в незрелую мРНК, которая содержит необязательные интроны. Незрелая мРНК затем дополнительно процессируется до зрелой мРНК в процессе созревания. Данный процесс созревания включает стадии экзирования 5'-конца, сплайсинга незрелой мРНК с вырезанием необязательных интронов и модификаций 3'-конца, таких как полиаденилирование 3'-конца незрелой мРНК, а также необязательного расщепления эндо- или экзонуклеазами и т. д. В контексте настоящего изобретения 3'-UTR соответствует последовательности зрелой мРНК, которая расположена в 3'-направлении от стоп-кодона области, кодирующей белок, предпочтительно непосредственно рядом со стоп-кодоном области, кодирующей белок, в 3'-направлении от него, и которая простирается до 5'-края поли(А)-последовательности, предпочтительно до нуклеотида, расположенного непосредственно рядом с поли(А)-последовательностью в 5'-направлении от нее. Термин "соответствует" означает, что последовательность 3'-UTR может представлять собой последовательность РНК, как, например, в последовательности мРНК, используемой для формулировки определения последовательности 3'-UTR, или последовательность ДНК, которая соответствует такой последовательности РНК. В контексте настоящего изобретения термин "3'-UTR гена", как, например, "3'-UTR гена альбумина", означает последовательность, которая соответствует 3'-UTR зрелой мРНК, полученной из данного гена, т.е. мРНК, полученной в результате транскрипции гена и созревания незрелой мРНК. Термин "3'-UTR гена" охватывает 3'-UTR в виде последовательности ДНК и последовательности РНК.

5'-нетранслируемая область (5'-UTR). 5'-UTR, как правило, понимается как конкретный участок матричной РНК (мРНК). Она расположена в 5'-направлении от открытой рамки считывания мРНК. Как правило, 5'-UTR начинается с сайта начала транскрипции и заканчивается за один нуклеотид до стартового кодона открытой рамки считывания. 5'-UTR может содержать элементы для контроля экспрессии генов, также называемые регуляторными элементами. Такие регуляторные элементы могут представлять собой, например, участки связывания рибосомы или 5'-концевой олигопиримидиновый тракт. 5'-UTR может подвергаться посттранскрипционным модификациям, например путем добавления 5'-кэпа. В контексте настоящего изобретения 5'-UTR соответствует последовательности зрелой мРНК, которая расположена между 5'-кэпом и стартовым кодоном. 5'-UTR предпочтительно соответствует последовательности, которая простирается от нуклеотида, расположенного в 3'-направлении от 5'-кэпа, предпочтительно от нуклеотида, расположенного непосредственно рядом с 5'-кэпом в 3'-направлении от него, до нуклеотида, расположенного в 5'-направлении от стартового кодона области, кодирующей белок, предпочтительно до нуклеотида, расположенного непосредственно рядом со стартовым кодоном области, кодирующей белок, в 5'-направлении от него. Нуклеотид, расположенный непосредственно рядом с 5'-кэпом зрелой мРНК в 3'-направлении от него, как правило, соответствует сайту начала транскрипции. Термин "соответствует" означает, что последовательность 5'-UTR может представлять собой последовательность РНК, как, например, в последовательности мРНК, используемой для формулировки определения последовательности 5'-UTR, или последовательность ДНК, которая соответствует такой последовательности РНК. В контексте настоящего изобретения термин "5'-UTR гена", как, например, "5'-UTR TOP-содержащего гена", означает последовательность, которая соответствует 5'-UTR зрелой мРНК, полученной из данного гена, т.е. мРНК, полученной в результате транскрипции гена и созревания незрелой мРНК. Термин "5'-UTR гена" охватывает 5'-UTR в виде последовательности ДНК и последовательности РНК.

5'-концевой олигопиримидиновый тракт (TOP). 5'-концевой олигопиримидиновый тракт (TOP), как правило, представляет собой отрезок из пиримидиновых нуклеотидов, расположенный в 5'-концевой области молекулы нуклеиновой кислоты, такой как 5'-концевая область некоторых молекул мРНК или 5'-концевая область функциональной структурной единицы, например, транскрибируемой области некоторых генов. Данная последовательность начинается с цитидина, который обычно соответствует сайту начала транскрипции, за которым расположен отрезок из обычно приблизительно 3-30 пиримидиновых нуклеотидов. Например, TOP может содержать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или еще больше нуклеотидов. Пиримидиновый отрезок, и, соответственно, 5'-TOP, заканчивается за один расположенный в 5'-направлении нуклеотид от первого пуринового нуклеотида, расположенного ниже TOP. Матричная РНК, которая содержит 5'-концевой олигопиримидиновый тракт, часто называется TOP-содержащей мРНК. Соответственно, гены, на которых образуются

такие матричные РНК, называются TOP-содержащими генами. Последовательности TOP были, например, обнаружены в генах и мРНК, кодирующих факторы элонгации пептидов и рибосомные белки.

TOP-мотив. В контексте настоящего изобретения TOP-мотив представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая соответствует 5'-TOP, определенному выше. Таким образом, TOP-мотив в контексте настоящего изобретения предпочтительно представляет собой отрезок из пиримидиновых нуклеотидов, имеющий длину 3-30 нуклеотидов. TOP-мотив предпочтительно состоит по меньшей мере из 3 пиримидиновых нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 4 пиримидиновых нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 5 пиримидиновых нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 6 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 7 нуклеотидов, наиболее предпочтительно по меньшей мере 8 пиримидиновых нуклеотидов, где отрезок из пиримидиновых нуклеотидов предпочтительно начинается на своем 5'-конце с цитозинового нуклеотида. В TOP-содержащих генах и TOP-содержащих мРНК TOP-мотив предпочтительно начинается на своем 5'-конце с сайта начала транскрипции и заканчивается за один расположенный в 5'-направлении нуклеотид от первого пуринового остатка в указанных гене или мРНК. TOP-мотив в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, предпочтительно расположен на 5'-конце последовательности, которая представляет собой 5'-UTR, или на 5'-конце последовательности, которая кодирует 5'-UTR. Таким образом, отрезок из 3 или более пиримидиновых нуклеотидов предпочтительно называется "TOP-мотивом" в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, если данный отрезок расположен на 5'-конце соответствующей последовательности, такой как мРНК в соответствии с настоящим изобретением, элемент 5'-UTR мРНК в соответствии с настоящим изобретением или последовательность нуклеиновой кислоты, полученная из 5'-UTR TOP-содержащего гена, описанного в данном документе. Другими словами, отрезок из 3 или более пиримидиновых нуклеотидов, который расположен не на 5'-конце 5'-UTR или элемента 5'-UTR, а где-либо в пределах 5'-UTR или элемента 5'-UTR, предпочтительно не называется "TOP-мотивом".

TOP-содержащий ген. TOP-содержащие гены, как правило, характеризуются наличием 5'-концевого олигопиримидинового тракта. Кроме того, большинство TOP-содержащих генов характеризуется регуляцией трансляции в соответствии с ростом. Однако известны также TOP-содержащие гены с тканеспецифической регуляцией трансляции. Как определено выше, 5'-UTR TOP-содержащего гена соответствует последовательности 5'-UTR зрелой мРНК, полученной из TOP-содержащего гена, которая предпочтительно простирается от нуклеотида, расположенного в 3'-направлении от 5'-кэпа, до нуклеотида, расположенного в 5'-направлении от стартового кодона. 5'-UTR TOP-содержащего гена, как правило, не содержит каких-либо стартовых кодонов, предпочтительно не содержит вышерасположенных AUG (uAUG) или вышерасположенных открытых рамок считывания (uORF). В данном случае вышерасположенные AUG и вышерасположенные открытые рамки считывания, как правило, понимаются как AUG и открытые рамки считывания, находящиеся в 5'-направлении от стартового кодона (AUG) открытой рамки считывания, которая должна транслироваться. 5'-UTR TOP-содержащих генов обычно являются довольно короткими. Значения длины 5'-UTR TOP-содержащих генов могут варьироваться от 20 нуклеотидов вплоть до 500 нуклеотидов и, как правило, составляют менее чем приблизительно 200 нуклеотидов, предпочтительно менее чем приблизительно 150 нуклеотидов, более предпочтительно менее чем приблизительно 100 нуклеотидов. Иллюстративные 5'-UTR TOP-содержащих генов в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, представляют собой последовательности нуклеиновых кислот, простирающиеся от нуклеотида в положении 5 до нуклеотида, расположенного непосредственно рядом со стартовым кодоном (например, ATG) в 5'-направлении от него, в последовательностях в соответствии с SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из международной заявки на патент WO2013/143700, или их гомологи или варианты, раскрытие которых настоящим включено посредством ссылки. В данном контексте особенно предпочтительным фрагментом 5'-UTR TOP-содержащего гена является 5'-UTR TOP-содержащего гена, не имеющая 5'-TOP-мотива. Термин "5'-UTR TOP-содержащего гена" предпочтительно относится к 5'-UTR встречающегося в природе TOP-содержащего гена.

Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, в частности мРНК. Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты состоит из непрерывного отрезка из нуклеотидов, соответствующего непрерывному отрезку из нуклеотидов в полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты, лежащей в основе последовательности нуклеиновой кислоты фрагмента, который представляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере 80% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты. Такой фрагмент в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты.

В данном контексте "фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты", например, фрагмент последовательности мРНК, предпочтительно представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фрагмент белка или его варианта, описанного в данном документе. Выражение "фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты" более предпочтительно относится к последовательно-

сти нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с соответствующей полноразмерной последовательностью нуклеиновой кислоты.

Вариант последовательности нуклеиновой кислоты, в частности мРНК. Вариант последовательности нуклеиновой кислоты относится к варианту последовательностей нуклеиновых кислот, который является основой последовательности нуклеиновой кислоты. Например, вариант последовательности нуклеиновой кислоты может характеризоваться одной или несколькими делециями, вставками, добавлениями и/или заменами нуклеотидов по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты, из которой получен данный вариант. Вариант последовательности нуклеиновой кислоты является предпочтительно на по меньшей мере 40%, предпочтительно на по меньшей мере 50%, более предпочтительно на по меньшей мере 60%, более предпочтительно на по меньшей мере 70%, еще более предпочтительно на по меньшей мере 80%, еще более предпочтительно на по меньшей мере 90%, наиболее предпочтительно на по меньшей мере 95% идентичным последовательности нуклеиновой кислоты, из которой получен вариант. Вариант предпочтительно является функциональным вариантом. "Вариант" последовательности нуклеиновой кислоты может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью нуклеотидов на отрезке из 10, 20, 30, 50, 75 или 100 нуклеотидов такой последовательности нуклеиновой кислоты.

Стабилизированная нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК. Стабилизированная нуклеиновая кислота, предпочтительно мРНК, как правило, характеризуется модификацией, увеличивающей устойчивость к разрушению *in vivo* (например, разрушению под действием экзо- или эндонуклеазы) и/или разрушению *ex vivo* (например, в процессе изготовления до введения вакцины, например в ходе получения вакцинного раствора, подлежащего введению). Стабилизации РНК можно, например, достичь путем введения 5'-кэп-структуры, поли(А)-хвоста или любой другой модификации UTR. Ее также можно достичь путем химической модификации или модификации содержания G/C в нуклеиновой кислоте. Различные другие способы известны из уровня техники и являются допустимыми в контексте настоящего изобретения.

Транскрипция РНК *in vitro*. Термины "транскрипция РНК *in vitro*" или "транскрипция *in vitro*" относятся к процессу, в ходе которого РНК синтезируется в бесклеточной системе (*in vitro*). ДНК, в частности плазмидную ДНК, применяют в качестве матрицы для образования РНК-транскриптов. РНК может быть получена с помощью ДНК-зависимой транскрипции *in vitro* подходящей ДНК-матрицы, которая в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой линейаризованную плазмидную ДНК-матрицу. Промотор для контроля транскрипции *in vitro* может являться любым промотором для любой ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Конкретными примерами ДНК-зависимых РНК-полимераз являются РНК-полимеразы T7, T3 и SP6. ДНК-матрица для транскрипции РНК *in vitro* может быть получена путем клонирования нуклеиновой кислоты, в частности кДНК, которая соответствует соответствующей РНК, которая должна транскрибироваться *in vitro*, и введения ее в подходящий вектор для транскрипции *in vitro*, например, в плазмидную ДНК. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ДНК-матрицу подвергают линейаризации подходящим ферментом рестрикции перед транскрипцией *in vitro*. кДНК может быть получена путем обратной транскрипции мРНК или химического синтеза. Кроме того, ДНК-матрица для синтеза РНК *in vitro* также может быть получена с помощью синтеза генов.

Способы осуществления транскрипции *in vitro* известны из уровня техники (см., например, Geall et al. (2013) *Semin. Immunol.* 25(2): 152-159; Brunelle et al. (2013) *Methods Enzymol.* 530:101-14). Реагенты, используемые в указанном способе, как правило, включают:

- 1) линейаризованную ДНК-матрицу с промоторной последовательностью, обладающей высоким сродством связывания с соответствующей ей РНК-полимеразой, такой как РНК-полимеразы, кодируемые бактериофагами;
- 2) рибонуклеозидтрифосфаты (NTP) для четырех азотистых оснований (аденина, цитозина, гуанина и урацила);
- 3) необязательно аналог кэп-структуры, определенный выше (например, m7G(5')PPP(5')G (m7G));
- 4) ДНК-зависимую РНК-полимеразу, способную связываться с промоторной последовательностью в пределах линейаризованной ДНК-матрицы (например, РНК-полимеразу T7, T3 или SP6);
- 5) необязательно ингибитор рибонуклеаз (РНКаза) для инактивации любых загрязняющих РНКаз;
- 6) необязательно пирофосфатазу для разрушения пирофосфата, который может ингибировать транскрипцию;
- 7) MgCl₂, который предоставляет ионы Mg²⁺ в качестве кофактора полимеразы;
- 8) буфер для поддержания подходящего значения pH, который может также содержать антиоксиданты (например, DTT) и/или полиамины, такие как спермидин, в оптимальных концентрациях.

Полноразмерный белок. Термин "полноразмерный белок", используемый в данном документе, как

правило, относится к белку, который фактически содержит целую аминокислотную последовательность белка, встречающегося в природе. Тем не менее, термин "полноразмерный белок" также охватывает замены аминокислот, например, вследствие мутации в белке.

Фрагменты белков. "Фрагменты" белков или пептидов в контексте настоящего изобретения могут, как правило, содержать последовательность белка или пептида, определенного в данном документе, который в том, что касается его аминокислотной последовательности (или кодирующей его молекулы нуклеиновой кислоты), является усеченным на N-конце и/или C-конце по сравнению с аминокислотной последовательностью исходного (нативного) белка (или кодирующей его молекулы нуклеиновой кислоты). Такое усечение может, таким образом, иметь место на уровне аминокислот либо, соответственно, на уровне нуклеиновой кислоты. Идентичность последовательности по отношению к такому фрагменту, определенному в данном документе, может, следовательно, предпочтительно относиться ко всему белку или пептиду, определенному в данном документе, или ко всей (кодирующей) молекуле нуклеиновой кислоты, соответствующей такому белку или пептиду.

В данном контексте фрагмент белка может, как правило, содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью соответствующего встречающегося в природе полноразмерного белка.

Фрагменты белков или пептидов в контексте настоящего изобретения могут, кроме того, содержать последовательность белка или пептида, определенного в данном документе, которая имеет длину, составляющую, например, по меньшей мере 5 аминокислот, предпочтительно имеет длину, составляющую по меньшей мере 6 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 7 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 8 аминокислот, еще более предпочтительно по меньшей мере 9 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 10 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 11 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 12 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 13 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 15 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 16 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 17 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 18 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 19 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 25 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 30 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 35 аминокислот; еще более предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот или наиболее предпочтительно по меньшей мере 100 аминокислот. Например, такой фрагмент может иметь длину, составляющую от приблизительно 6 до приблизительно 20 или еще большего количества аминокислот, например, фрагменты, процессированные и презентируемые молекулами МНС I класса, предпочтительно имеют длину, составляющую от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот, например, 8, 9 или 10 (или даже 6, 7, 11 или 12 аминокислот), или фрагменты, процессированные и презентируемые молекулами МНС II класса, предпочтительно имеют длину, составляющую приблизительно 13 или больше аминокислот, например, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или еще больше аминокислот, где эти фрагменты могут быть выбраны из любой части аминокислотной последовательности. Такие фрагменты, как правило, распознаются Т-клетками в виде комплекса, состоящего из пептидного фрагмента и молекулы МНС, т.е. фрагменты, как правило, не распознаются в их нативной форме. Фрагменты белков или пептидов могут содержать по меньшей мере один эпитоп из этих белков или пептидов. Кроме того, домены белка, такие как внеклеточный домен, внутриклеточный домен или трансмембранный домен, и укороченные или усеченные варианты белка также могут пониматься как предусматривающие фрагмент белка.

Варианты белков. "Варианты" белков или пептидов, определенных в контексте настоящего изобретения, могут быть образованы с аминокислотной последовательностью, которая отличается от исходной последовательности одной или несколькими мутациями, такими как замены, вставки и/или делеции одной или нескольких аминокислот. Эти фрагменты и/или варианты предпочтительно обладают такой же биологической функцией или специфической активностью по сравнению с полноразмерным нативным белком, например, своим специфическим свойством антигенности. "Варианты" белков или пептидов, определенных в контексте настоящего изобретения, могут содержать консервативную(консервативные) аминокислотную(аминокислотные) замену(замены) по сравнению с их нативной, т.е. немутантной физиологической, последовательностью. Эти аминокислотные последовательности, а также кодирующие их нуклеотидные последовательности, в частности, входят в объем термина "варианты", определенного в данном документе. Замены, при которых аминокислоты, которые относятся к одному и тому же классу, заменяются друг на друга, называются консервативными заменами. В частности, ими являются аминокислоты, имеющие алифатические боковые цепи, положительно или отрицательно заряженные боковые цепи, ароматические группы в боковых цепях, или аминокислоты, боковые цепи которых могут форми-

ровать между собой водородные мостики, например, боковые цепи, имеющие гидроксильную функциональную группу. Это означает, что, например, аминокислота, имеющая полярную боковую цепь, замещается другой аминокислотой, аналогичным образом имеющей полярную боковую цепь, или, например, аминокислота, характеризующаяся гидрофобной боковой цепью, замещается другой аминокислотой, аналогичным образом имеющей гидрофобную боковую цепь (например, серин (треонин) треонином (серином) или лейцин (изолейцин) изолейцином (лейцином)). Вставки и замены являются возможными, в частности, в тех положениях в последовательностях, в которых они не вызывают модификацию трехмерной структуры или не влияют на область связывания. Модификации трехмерной структуры с помощью вставки(вставок) или делеции(делеций) можно легко определить, например, с использованием спектров CD (спектров кругового дихроизма) (Urry, 1985, Absorption, Circular Dichroism and ORD of Polypeptides, в: Modern Physical Methods in Biochemistry, Neuberger et al. (ed.), Elsevier, Amsterdam).

"Вариант" белка или пептида может характеризоваться по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью аминокислот на отрезке из 10, 20, 30, 50, 75 или 100 аминокислот такого белка или пептида.

Кроме того, варианты белков или пептидов, определенных в данном документе, которые могут кодироваться молекулой нуклеиновой кислоты, могут также содержать такие последовательности, где нуклеотиды в кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты заменены в соответствии с вырожденностью генетического кода, что не приводит к изменению соответствующей аминокислотной последовательности белка или пептида, т.е. аминокислотная последовательность или, по меньшей мере, ее часть может не отличаться от исходной последовательности одной или несколькими мутациями в рамках вышеприведенного значения.

Идентичность последовательности. С целью определения процентного значения идентичности двух последовательностей, например, последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, определенных в данном документе, предпочтительно аминокислотных последовательностей, кодируемых последовательностью нуклеиновой кислоты в полимерном носителе, определенной в данном документе, или аминокислотных последовательностей самих по себе, последовательности можно выравнивать с целью последующего сравнения друг с другом. Таким образом, например, положение первой последовательности можно сравнить с соответствующим положением второй последовательности. Если положение в первой последовательности занято тем же компонентом (остатком), что и в случае с положением во второй последовательности, то две последовательности являются идентичными в данном положении. Если это не так, то последовательности отличаются в данном положении. Если во второй последовательности имеют место вставки по сравнению с первой последовательностью, то можно ввести гэпы в первую последовательность, что позволяет проводить дополнительное выравнивание. Если во второй последовательности имеют место делеции по сравнению с первой последовательностью, то можно ввести гэпы во вторую последовательность, что позволяет проводить дополнительное выравнивание. Процентное значение идентичности двух последовательностей зависит, таким образом, от числа идентичных положений, деленного на общее число положений, включающее те положения, которые заняты только в одной последовательности. Процентное значение идентичности двух последовательностей можно определить с помощью математического алгоритма. Предпочтительным, но не ограничивающим, примером математического алгоритма, который можно использовать, является алгоритм Karlin и соавт. (1993), PNAS USA, 90:5873-5877 или Altschul и соавт. (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Такой алгоритм интегрирован в программу BLAST. С помощью данной программы можно идентифицировать последовательности, которые являются в некоторой степени идентичными последовательностям согласно настоящему изобретению.

Производное белка или пептида. Производное пептида или белка, как правило, понимается как молекула, полученная из другой молекулы, такой как указанный пептид или белок. "Производное" пептида или белка также охватывает продукты слияния, содержащие пептид или белок, применяемый в настоящем изобретении. Например, продукт слияния содержит метку, такую как, например, эпитоп, например, эпитоп FLAG или эпитоп V5. Например, эпитоп представляет собой эпитоп FLAG. Такая метка является применимой, например, для очистки слитого белка.

Фармацевтически эффективное количество. Фармацевтически эффективное количество в контексте настоящего изобретения, как правило, понимают как количество, достаточное для индукции иммунного ответа.

Носитель/полимерный носитель. Носитель в контексте настоящего изобретения может, как правило, представлять собой соединение, которое облегчает транспорт и/или комплексообразование другого соединения. Указанный носитель может образовывать комплекс с указанным другим соединением. Полимерный носитель представляет собой носитель, образованный из полимера.

Инертная среда. Это средство, например носитель, которое может, как правило, применяться в фармацевтической композиции или вакцине для облегчения введения компонентов фармацевтической композиции или вакцины индивидууму.

Струйная инъекция. Термин "струйная инъекция", используемый в данном документе, относится к безыгольному способу выполнения инъекции, где жидкость, содержащую по меньшей мере одну после-

довательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением и необязательно дополнительные подходящие наполнители, проталкивают через отверстие, создавая таким образом сверхтонкий поток жидкости высокого давления, способный проникать в кожу и, в зависимости от ситуации, в которой выполняют инъекцию, подкожную ткань или мышечную ткань млекопитающих. По существу, поток жидкости образует отверстие в коже, через которое поток жидкости быстро вводится в ткань-мишень. Струйную инъекцию предпочтительно применяют для внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекции последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением. В предпочтительном варианте осуществления струйную инъекцию применяют для внутримышечной инъекции последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления струйную инъекцию применяют для внутривенной инъекции последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении авторами настоящего изобретения того, что мРНК, кодирующая по меньшей мере один антигенный пептид или белок, содержащаяся в липидных наночастицах (LNP), весьма эффективно индуцирует антигенспецифические иммунные ответы на кодируемый антигенный пептид или белок при очень низких дозах и режиме дозирования, который не требует частого введения.

Дополнительными преимуществами мРНК в соответствии с настоящим изобретением, кодирующей по меньшей мере один антигенный пептид или белок, содержащейся в липидных наночастицах (LNP), являются

- индукция сильного гуморального иммунного ответа;
- индукция формирования В-клеточной памяти;
- более быстрое наступление иммунной защиты;
- долгосрочность индуцированных иммунных ответов;
- индукция обширных клеточных Т-клеточных ответов;
- индукция формирования (локальной и временной) провоспалительной среды;
- отсутствие индукции системного цитокинового или хемокинового ответа;
- хорошая переносимость, отсутствие побочных эффектов, нетоксичность;
- преимущественные характеристики стабильности;
- состав, совместимый с многими различными антигенами: возможность применения больших коктейлей антигенов при использовании той же самой (производственной) технологии;
- отсутствие иммунитета к векторам, т.е. технология может применяться для вакцинации одного и того же субъекта несколько раз против нескольких (различных) антигенов;
- скорость, адаптируемость, простота и масштабируемость производства.

В частности, настоящее изобретение относится к липидным наночастицам, содержащим мРНК, и путям их применения. Чтобы быть подходящими для настоящего изобретения, липидные наночастицы содержат по меньшей мере:

- (i) катионный липид и/или конъюгат PEG-липид, определенный ниже; и
- (ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую антигенный пептид или белок.

Липидная наночастица, содержащая мРНК, может содержать дополнительные соединения, такие как один или несколько нейтральных липидов, стероидов и комбинации указанных соединений. Подходящие соединения будут подробно описаны ниже.

Соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую антигенный пептид или белок, может представлять собой молекулу мРНК. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение мРНК представляет собой природную и немодифицированную мРНК. В контексте настоящего изобретения природная и немодифицированная мРНК охватывает мРНК, образующуюся *in vitro* без химических модификаций или изменений в последовательности.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения соединение мРНК включает искусственную мРНК. В контексте настоящего изобретения искусственная мРНК охватывает мРНК с химическими модификациями, модификациями последовательности или неестественными последовательностями.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение мРНК не содержит модификаций нуклеозидов, в частности не содержит модификаций азотистых оснований. В дополнительном варианте осуществления соединения мРНК не содержит 1-метилпсевдоуридиновых модификаций. В одном предпочтительном варианте осуществления мРНК содержит только встречающиеся в природе нуклеозиды. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления соединения мРНК не содержит каких-либо химических модификаций и необязательно содержит модификации последовательности. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение мРНК содержит только встречающиеся в природе нуклеозиды, содержащие аденин, урацил, гуанин и цитозин.

В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения последова-

тельность мРНК является моно-, би- или полицистронной, предпочтительно определенной в данном документе. Кодированные последовательности в би- или полицистронной мРНК предпочтительно кодируют различающиеся между собой пептиды или белки, определенные в данном документе, или их фрагменты или варианты. Кодированные последовательности, кодирующие два или более пептида или белка, предпочтительно могут быть разделены в би- или полицистронной мРНК по меньшей мере одной последовательностью IRES (участка внутренней посадки рибосомы), определенной ниже. Таким образом, термин "кодирующий два или более пептида или белка" может означать, без ограничения, что би- или даже полицистронная мРНК может кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или более (предпочтительно различных) пептидов или белков или их фрагментов или вариантов в рамках определений, представленных в данном документе. Более предпочтительно, без ограничения, би- или даже полицистронная мРНК может кодировать, например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или более (предпочтительно различных) пептидов или белков, определенных в данном документе, или их фрагментов или вариантов, определенных в данном документе. В данном контексте так называемая последовательность IRES (участка внутренней посадки рибосомы), определенная выше, может функционировать в качестве единственного участка связывания рибосомы, но она может также служить для обеспечения би- или даже полицистронной мРНК, определенной выше, которая кодирует несколько пептидов или белков, которые должны образовываться в результате трансляции на рибосомах независимо друг от друга. Примерами последовательностей IRES, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, являются последовательности пикорнавирусов (например, FMDV), пестивирусов (CFFV), полиовирусов (PV), вирусов энцефаломиокардита (ECMV), вирусов ящура (FMDV), вирусов гепатита С (HCV), вирусов классической чумы свиней (CSFV), вируса лейкоза мышей (MLV), вирусов иммунодефицита обезьян (SIV) или вирусов паралича сверчков (CrPV).

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением может кодировать по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь и более пептидов или белков (или их фрагментов и производных), определенных в данном документе, соединенных с помощью или без помощи аминокислотной линкерной последовательности, где указанная линкерная последовательность может включать жесткие линкеры, гибкие линкеры, расщепляемые линкеры (например, саморасщепляющиеся пептиды) или их комбинацию. В данном случае пептиды или белки могут являться идентичными, или различными, или комбинацией таковых. Конкретные комбинации пептидов или белков могут кодироваться указанной мРНК, кодирующей по меньшей мере два пептида или белка, как поясняется в данном документе (также называемой в данном документе "мРНК, кодирующей полиантгенные конструкции").

В конкретном аспекте настоящего изобретения липидные наночастицы содержат соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую антигенный пептид или белок или его фрагмент, вариант или производное.

Такие антигенные пептиды или белки могут быть получены из патогенных антигенов, опухолевых антигенов, аллергенных антигенов или собственных аутоантигенов, предпочтительно определенных в данном документе. В контексте настоящего изобретения антигенные пептиды или белки предпочтительно не включают в себя люциферазы.

Патогенные антигены.

Такие патогенные антигены получены из патогенных организмов, в частности бактериальных, вирусных или простейших (многоклеточных) патогенных организмов, которые вызывают иммунную реакцию у субъекта, в частности субъекта-млекопитающего, более конкретно человека. Более конкретно, патогенные антигены предпочтительно представляют собой поверхностные антигены, например, белки (или фрагменты белков, например, наружная часть поверхностного антигена), расположенные на поверхности вируса или бактериального или простейшего организма.

Патогенные антигены представляют собой пептидные или белковые антигены, предпочтительно полученные из патогена, ассоциированного с инфекционным заболеванием, которые предпочтительно выбраны из антигенов, полученных из патогенов *Acinetobacter baumannii*, рода *Anaplasma*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, рода *Aspergillus*, *Astroviridae*, рода *Babesia*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, вируса БК, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, рода *Borrelia*, видов *Borrelia*, рода *Brucella*, *Brugia malayi*, семейства *Bunyaviridae*, *Burkholderia cepacia* и других видов *Burkholderia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, семейства *Caliciviridae*, рода *Campylobacter*, *Candida albicans*, видов *Candida*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomonas pneumoniae*, *Chlamydomonas psittaci*, приона, вызывающего GD, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens*, видов *Clostridium*, *Clostridium tetani*, видов *Coccidioides*, коронавирусов, *Corynebacterium diphtheriae*, *Coxiella burnetii*, вируса геморрагической лихорадки Крым-Конго, *Cryptococcus neoformans*, рода *Cryptosporidium*, цитомегаловируса (CMV), вирусов лихорадки Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4), *Dientamoeba fragilis*, вируса Эбола (EBOV), рода *Echinococcus*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, рода *Ehrlichia*, *Entamoeba histolytica*, рода *Enterococcus*, рода *Enterovirus*, энтеровирусов, преимущественно вируса Коксаки А и энтеровируса 71 (EV71), видов *Epi-*

dermophyton, вируса Эпштейна-Барр (EBV), *Escherichia coli* O157:H7, O111 и O104:H4, *Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica*, приона, вызывающего FFI, надсемейства Filarioidea, флавивирусов, *Francisella tularensis*, рода *Fusobacterium*, *Geotrichum candidum*, *Giardia intestinalis*, видов *Gnathostoma*, приона, вызывающего GSS, вируса Гуанарито, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, хенипавируса (вируса Хендра, вируса Нипах), вируса гепатита А, вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV), вируса гепатита D, вируса гепатита Е, вируса простого герпеса 1 и 2 типа (HSV-1 и HSV-2), *Histoplasma capsulatum*, HIV (вируса иммунодефицита человека), *Hortaea werneckii*, бокавируса человека (HBoV), вируса герпеса человека 6 типа (HHV-6) и вируса герпеса человека 7 типа (HHV-7), метапневмовируса человека (hMPV), вируса папилломы человека (HPV), вирусов парагриппа человека (HPIV), вируса японского энцефалита, вируса JC, вируса Джунин, *Kingella kingae*, *Klebsiella granulomatis*, приона, вызывающего куру, вируса Ласса, *Legionella pneumophila*, рода *Leishmania*, рода *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), вируса Мачупо, видов *Malassezia*, вируса Марбург, вируса кори, *Metagonimus yokagawai*, отдела *Microsporidia*, вируса контагиозного моллюска (MCV), вируса эпидемического паротита, *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Naegleria fowleri*, *Necator americanus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, видов *Nocardia*, *Onchocerca volvulus*, *Orientia tsutsugamushi*, семейства *Orthomyxoviridae* (вирусов гриппа), *Paracoccidioides brasiliensis*, видов *Paragonimus*, *Paragonimus westermani*, парвовируса B19, рода *Pasteurella*, рода *Plasmodium*, *Pneumocystis jirovecii*, полиовируса, вируса бешенства, респираторно-синцитиального вируса (RSV), *Rhinovirus*, риновирусов, *Rickettsia akari*, рода *Rickettsia*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, вируса лихорадки Рифт-Валли, ротавируса, вируса краснухи, вируса Сабиа, рода *Salmonella*, *Sarcoptes scabiei*, коронавируса, вызывающего SARS, рода *Schistosoma*, рода *Shigella*, вируса Син Номбре, хантавируса, *Sporothrix schenckii*, рода *Staphylococcus*, рода *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Strongyloides stercoralis*, рода *Taenia*, *Taenia solium*, вируса клещевого энцефалита (TBEV), *Toxocara canis* или *Toxocara cati*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis*, видов *Trichophyton*, *Trichuris trichiura*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Ureaplasma urealyticum*, вируса ветряной оспы (VZV), вируса ветряной оспы (VZV), *Variola major* или *Variola minor*, приона, вызывающего vCJD, вируса венесуэльского энцефалита лошадей, *Vibrio cholerae*, вируса лихорадки Западного Нила, вируса западного энцефалита лошадей, *Wuchereria bancrofti*, вируса желтой лихорадки, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*.

В данном контексте особенно предпочтительными являются антигены патогенов, выбранных из вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса простого герпеса (HSV), вируса папилломы человека (HPV), вируса иммунодефицита человека (HIV), плазмодия, *Staphylococcus aureus*, вируса лихорадки Денге, *Chlamydia trachomatis*, цитомегаловируса (CMV), вируса гепатита В (HBV), *Mycobacterium tuberculosis*, вируса бешенства и вируса желтой лихорадки.

Кроме того, патогенный антиген (антиген, полученный из патогена, ассоциированного с инфекционным заболеванием) может быть предпочтительно выбран из следующих антигенов: белка А наружной мембраны *OmpA*, белка *Var*, ассоциированного с биопленками, транспортного белка *MucK* (*Acinetobacter baumannii*, акинетобактериальные инфекции); вариабельного поверхностного гликопротеина *VSG*, белка *MAPP15*, ассоциированного с микротрубочками, транс-сиалидазы *TSA* (*Trypanosoma brucei*, африканская сонная болезнь (африканский трипаносомоз)); антигена *p24 HIV*, белков оболочки *HIV* (*Gp120*, *Gp41*, *Gp160*), полипротеина *GAG*, белка негативного фактора экспрессии *Nef*, трансактиватора транскрипции *Tat* (*HIV* (вирус иммунодефицита человека), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита)); адгезивного белка *GIAP*, ингибируемого галактозой, антигена *Eh29* размером 29 кДа, *Gal/GalNAc*-специфического лектина, белка *CRT*, иммунодоминантного антигена размером 125 кДа, белка *M17*, адгезина *ADH112*, белка *STIRP* (*Entamoeba histolytica*, амебиаз); главных поверхностных белков 1-5 (*MSP1a*, *MSP1b*, *MSP2*, *MSP3*, *MSP4*, *MSP5*), белков системы секреции IV типа (*VirB2*, *VirB7*, *VirB11*, *VirD4*) (род *Anaplasma*, анаплазмоз); протективного антигена *PA*, фактора *EF*, вызывающего отек, фактора летальности *LF*, белков с доменами гомологии S-слоя *SLH* (*Bacillus anthracis*, сибирская язва); акранолизина, фосфолипазы *D*, коллагенсвязывающего белка *CbpA* (*Aerobacterium haemolyticum*, инфекция, вызываемая *Aerobacterium haemolyticum*); нуклеокапсидного белка *NP*, предшественника гликопротеина *GPC*, гликопротеина *GP1*, гликопротеина *GP2* (вирус Джунин, аргентинская геморрагическая лихорадка); белков хитиново-белковых слоев, поверхностного антигена *A14* размером 14 кДа, главного белка сперматозоидов *MSP*, белка-организатора полимеризации *MSP MPOP*, белка волокон 2 *MSP MFP2*, МРАК-киназы, активирующей полимеризацию *MSP*, АВА-1-подобного белка *ALB*, белка *ABA-1*, кутикулина *CUT-1* (*Ascaris lumbricoides*, аскаридоз); аллергена *Asp v13* размером 41 кДа, аллергена *Asp f3*, главного поверхностного белка конидий *Rodlet A*, протеазы *Perlp*, GPI-заякоренного белка *Gellp*, GPI-заякоренного белка *Crflp* (род *Aspergillus*, аспергиллез); белка семейства *VP26*, белка *VP29* (*Astroviridae*, астровирусная инфекция); белка *1 RAP-1*, ассоциированного с роптриями, поверхностных антигенов мерозоитов *MSA-1*, *MSA-2* (*a1*, *a2*, *b*, *c*), *12D3*, *11C5*, *21B4*, *P29*, варианта поверхностного антигена эритроцитов *VESA1*, антигена *1* апикальной мембраны *AMA-1* (род *Babesia*, бабезиоз); гемолизина, энтеротоксина *C*, *PXO1-51*, гликолатоксидазы, АВС-транспортера, пенициллинсвязывающего белка, белка семей-

ства транспортеров цинка, псевдоуридинсинтазы Rsu, белка репликации плазмид RepX, олигоэндопептидазы F, мембранного белка профагов, белка HemK, жгутикового антигена H, антигена клеточной поверхности размером 28,5 кДа (*Bacillus cereus*, инфекция, вызываемая *Bacillus cereus*); большого Т-антигена LT, малого Т-антигена, капсидного белка VP1, капсидного белка VP2 (вирус ВК, инфекция, вызываемая вирусом ВК); белка размером 29 кДа, каспаза-3-подобных антигенов, гликопротеинов (*Blastocystis hominis*, инфекция, вызываемая *Blastocystis hominis*); поверхностного адгезина дрожжей WI-1 (*Blastomyces dermatitidis*, бластомикоз); нуклеопротеина N, полимеразы L, белка матрикса Z, гликопротеина GP (вирус Мачупо, боливийская геморрагическая лихорадка); белка A наружной поверхности OspA, белка наружной поверхности OspB, белка наружной поверхности OspC, декоринсвязывающего белка A DbpA, декоринсвязывающего белка B DbpB, корового белка филамента жгутика Fla размером 41 кДа, предшественника основного мембранного белка A BmpA (иммунодоминантного антигена P39), предшественника липопroteина наружной поверхности размером 22 кДа (антигена IPLA7), варибельного поверхностного липопroteина vlsE (род *Borrelia*, боррелиозная инфекция); ботулинических нейротоксинов BoNT/A1, BoNT/A2, BoNT/A3, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, BoNT/G, Hc-домена рекомбинантного ботулинического токсина F FHC (*Clostridium botulinum*, ботулизм (и детский ботулизм)); нуклеокапсида, предшественника гликопротеина (вирус Сабиа, бразильская геморрагическая лихорадка); медь/цинксодержащей супероксиддисмутазы SodC, бактериоферритина Bfr, белка 50S-субъединицы рибосомы RpIL, OmpA-подобного белка Omp1, содержащего трансмембранный домен, иммуногенного белка M5 P39 размером 39 кДа, ABC-транспортера цинка, представляющего собой периплазматический цинксвязывающий белок znuA, периплазматического иммуногенного белка Bp26, белка 30S-субъединицы рибосомы S12 RpsL, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы Gap, предшественника иммуногенного белка наружной мембраны Omp25 размером 25 кДа, белка BlalB, ассоциированного с инвазией, иницирующего фактора Tig, молекулярного шаперона DnaK, предполагаемой пептидилпролил-цис-транс-изомеразы SurA, липопroteина Omp19, белка наружной мембраны MotY Omp16, консервативного белка наружной мембраны D15, малатдегидрогеназы Mdh, компонента VirJ системы секреции IV типа (T4SS), липопroteина с неизвестной функцией BAB1_0187 (род *Brucella*, бруцеллез); представителей семейства ABC-транспортеров (LolC, OppA и PotF), предполагаемого трансмембранного белка системы высвобождения липопroteинов LolC/E, флагеллина FliC, белка A внутриклеточной подвижности *Burkholderia* BimA, бактериального фактора элонгации Tu EF-Tu, OmpA-подобного белка размером 17 кДа, белка, кодируемого *boaA*, белка, кодируемого *boaB* (*Burkholderia* серасия и другие виды *Burkholderia*, инфекция, вызываемая *Burkholderia*); миколитрансферазы Ag85A, белка теплового шока Hsp65, белка TB10.4, антигена размером 19 кДа, белка PstS3, белка теплового шока Hsp70 (*Mycobacterium ulcerans*, язва Бурули); главного и минорного вирусных капсидных белков VP1 и VP2 норовирусов, геномного полипротеина, капсидного белка VP1 саповирусов, белка Vp3, геномного полипротеина (семейство *Caliciviridae*, калицивирусная инфекция (норовирус и саповирус)); главного белка наружной мембраны PorA, флагеллина FlaA, поверхностного антигена CjaA, фибронектинсвязывающего белка CadF, аспартат/глутаматсвязывающего белка Peb1A, являющегося ABC-транспортером, белка FspA1, белка FspA2 (род *Campylobacter*, кампилобактериоз); гликолитического фермента енолазы, секретируемых аспартилпротеиназ SAP1-10, белка клеточной стенки, связанного с гликофосфатидилинозитолом (GPI), белка Hup1, белка CR3-RP, родственного рецептору комплемента 3, адгезина Als3p, белка теплового шока hsp90 размером 90 кДа, белка CSH, отвечающего за гидрофобность клеточной поверхности (обычно *Candida albicans* и другие виды *Candida*, кандидоз); антигена размером 17 кДа, белка P26, тримерных адгезинов-аутоотранспортеров TAA, адгезина A BadA *Bartonella*, белков наружной мембраны Vomp с варибельной экспрессией, белка Pap3, белка HbpAA, протеазы HtrA, ассоциированной с оболочкой, белка OMP89, белка GroEL, белка LalB, белка OMP43, дигидролипоамидсукцинилтрансферазы SucB (*Bartonella henselae*, лихорадка от кошачьих царапин); поверхностного белка 2 амастигот, поверхностного белка SSP4, специфичного для амастигот, круципаина, транс-сиалидазы TS, поверхностного гликопротеина трипомастигот TSA-1, регуляторного белка системы комплемента CRP-10, белка G4, белка G2, белка параксонемального тяжа PAR2, компонента парафлагеллярного тяжа Par1, муцин-ассоциированных поверхностных белков MPSP (*Trypanosoma cruzi*, болезнь Шагаса (американский трипаномоз)); гликопротеинов оболочки (gB, gC, gE, gH, gI, gK, gL) (вирус ветряной оспы (VZV), ветрянка); главного белка наружной мембраны MOMP, предполагаемого белка наружной мембраны PMPC, белка B комплекса белков наружной мембраны OmcB, белков теплового шока Hsp60, HSP10, белка IncA, белков системы секреции III типа, белка малой цепи рибонуклеотидредуктазы NrdB, плазмидного белка Pgp3, наружного белка хламидий N CopN, антигена CT521, антигена CT425, антигена CT043, антигена TC0052, антигена TC0189, антигена TC0582, антигена TC0660, антигена TC0726, антигена TC0816, антигена TC0828 (*Chlamydia trachomatis*, хламидиоз); белка низкого кальциевого ответа E LCtE, наружного белка хламидий N CopN, серин/треониновой протеинкиназы PknD, S-малонилтрансферазы ацилпереносящего белка FabD, белка Ssb, связывающего одонитевую ДНК, главного белка наружной мембраны MOMP, белка 2 наружной мембраны Omp2, семейства полиморфных мембранных белков (Pmp1, Pmp2, Pmp3, Pmp4, Pmp5, Pmp6, Pmp7, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp12, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp17, Pmp18, Pmp19, Pmp20, Pmp21) (*Chlamydia pneumoniae*, инфекция, вызываемая *Chlamydia pneumoniae*).

pneumoniae); холерного токсина В СТВ, пилина А TcrA, регулируемого совместно с токсином, пилина TcrF, регулируемого совместно с токсином, белка F биосинтеза пилей TcrF, регулируемого совместно с токсином, субъединицы А холерного энтеротоксина, субъединицы В холерного энтеротоксина, термостабильного энтеротоксина ST, маннозочувствительного гемагглютинина MSHA, белка наружной мембраны порина U ompU, белка порина B, полиморфного мембранного белка-D (*Vibrio cholerae*, холера); пропионил-КоА-карбоксилазы PCC, белка 14-3-3, прохибитина, цистеиновых протеаз, глутатионтрансферазы, гельзолина, протеиназы катепсина L CatL, белка тегумента TP20.8 размером 20,8 кДа, белка тегумента TP31.8 размером 31,8 кДа, фосфатазы лизофосфатидной кислоты LPAP (*Clonorchis sinensis*, клонорхоз); белков поверхностного слоя SLP, антигена глутаматдегидрогеназы GDH, токсина А, токсина В, цистеиновой протеазы Cwp84, цистеиновой протеазы Cwp13, цистеиновой протеазы Cwp19, белка клеточной стенки CwpV, белка жгутиков FliC, белка жгутиков FliD (*Clostridium difficile*, инфекция, вызываемая *Clostridium difficile*); риновирусы: капсидных белков VP1, VP2, VP3, VP4; коронавирусы: белков шиповидных отростков S, белков оболочки Е, мембранных белков М, нуклеокапсидных белков N (обычно риновирусы и коронавирусы, простуда (острый вирусный ринофарингит; острый ринит)); прионного белка Prp (прион, вызывающий GD, болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD)); белка оболочки Gc, белка оболочки Gn, нуклеокапсидных белков (вирус конго-крымской геморрагической лихорадки, конго-крымская геморрагическая лихорадка (CCHF)); РНК-геликазы DEAD-бокса VAD1, ассоциированной с вирулентностью, конъюгата галактоксиломаннан-белок GalXM, глюкуроноксикоманнана GXM, маннопротеина MP (*Cryptococcus neoformans*, криптококкоз); кислого рибосомного белка P2 Crp2, муциновых антигенов Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc6, Muc7, поверхностного адгезивного белка CP20, поверхностного адгезивного белка CP23, поверхностного белка CP12, поверхностного белка CP21, поверхностного белка CP40, поверхностного белка CP60, поверхностного белка CP15, гликопептидов gp40, ассоциированных с клеточной поверхностью, гликопептидов gp15, ассоциированных с клеточной поверхностью, белка стенки ооцисты AB, профилина PRF, апиразы (род *Cryptosporidium*, криптоспориоз); белка 1 FAR-1, связывающего жирные кислоты и ретинол, тканевого ингибитора металлопротеиназы TIMP (TMP), цистеиновой протеиназы ACEY-1, цистеиновой протеиназы ACCP-1, поверхностного антигена Ac-16, секретируемого белка 2 ASP-2, металлопротеазы 1 MTP-1, ингибитора аспартилпротеазы API-1, антигена SAA-1, ассоциированного с клеточной поверхностью, секретируемого ингибитора сериновой протеазы фактора Ха антикоагулянта AP, специфичного для взрослых, катепсин-D-подобной аспарагиновой протеазы ARR-1 (обычно *Ancylostoma braziliense*; множество других паразитов, кожная форма синдрома "блуждающей личинки" (CLM)); катепсин-подобных протеаз, антигена размером 53/25 кДа, представителей семейства белков с размером 8 кДа, белка цистицерков TsAg5 с несущественной трипсиноподобной активностью, белка онкосферы TSOL18, белка онкосферы TSOL45-1A, лактатдегидрогеназы A LDHA, лактатдегидрогеназы B LDHB (*Taenia solium*, цистицеркоз); антигена pp65, мембранного белка pp15, белка тегумента pp150, проксимального по отношению к капсиду, белка M45, ДНК-полимеразы UL54, геликазы UL105, гликопротеина gM, гликопротеина gN, гликопротеина H, гликопротеина B gB, белка UL83, белка UL94, белка UL99 (цитомегаловирус (CMV), цитомегаловирусная инфекция); капсидного белка C, преэмбранного белка rgM, мембранного белка M, белка оболочки E (домена I, домена II, домена II), белка NS1, белка NS2A, белка NS2B, белка NS3, белка NS4A, белка 2K, белка NS4B, белка NS5 (вирусы лихорадки Денге (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4) - флавивирусы, лихорадка Денге); белка размером 39 кДа (*Dientamoeba fragilis*, дизентамебиаз); предшественника дифтерийного токсина Tox, дифтерийного токсина DT, пилин-специфичной сортазы SrtA, белка пилина стержня пилей SpaA, белка пилина кончиков пилей SpaC, минорного белка пилина SpaB, белка DIP1281, ассоциированного с клеточной поверхностью (*Corynebacterium diphtheriae*, дифтерия); гликопротеина GP, нуклеопротеина NP, минорного белка матрикса VP24, главного белка матрикса VP40, активатора транскрипции VP30, кофактора полимеразы VP35, РНК-полимеразы L (вирус Эбола (EBOV), геморрагическая лихорадка Эбола); прионного белка (прион, вызывающий vGD, вариантная болезнь Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD)); белка В системы UvrABC, белка Flp1, белка Flp2, белка Flp3, белка TadA, рецептора гемоглобина HgbA, белка наружной мембраны TdhA, белка CpsRA, регулятора CpxR, белка SapA, антигена размером 18 кДа, белка наружной мембраны NcaA, белка LspA, белка LspA1, белка LspA2, белка LspB, компонента наружной мембраны DsgA, лектина DltA, липопротеина Hlp, главного белка наружной мембраны OMP, белка наружной мембраны OmpA2 (*Haemophilus ducreyi*, мягкий шанкр); аспартилпротеазы 1 Pep1, фосфолипазы B PLB, альфа-маннозидазы 1 AMN1, глюканозилтрансферазы GEL1, уреазы URE, белка матрикса пероксисом Pmp1, антигена Pra, богатого пролином, белка TcrP, реактивного в отношении Т-клеток человека (*Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*, кокцидиоидомикоз); аллергена Tri r2, белка теплового шока 60 Hsp60, грибного актина Act, антигена Tri r2, антигена Tri r4, антигена Tri t1, белка IV, глицерин-3-фосфатдегидрогеназы Gpd1, осморепратора HwSho1A, осморепратора HwSho1B, гистидинкиназы HwHhk7B, аллергена Mala s1, аллергена Mala s11, тиоредоксина Trx Mala s13, аллергена Mala f, аллергена Mala s (обычно виды *Trichophyton*, виды *Epidermophyton*, виды *Malassezia*, *Hortaea werneckii*, дерматофитоз); белка EG95, белка EG10, белка EG18, белка EgA31, белка EM18, антигена EPC1, антигена B, антигена 5, белка P29, белка 14-3-3, белка размером 8 кДа, миофилина, белка теплового шока 20 HSP20, гликопротеина GP-89, белка FAPB, связывающего жирные кислоты (род *Echinococcus*, эхино-

коккоз), главного поверхностного белка 2 MSP2, главного поверхностного белка 4 MSP4, варианта MSP SGV1, варианта MSP SGV2, белка наружной мембраны OMP, белка наружной мембраны 19 OMP-19, главного антигенного белка MAP1, главного антигенного белка MAP1-2, главного антигенного белка MAP1B, главного антигенного белка MAP1-3, белка, кодируемого Egm2510, белка GroEL, белка GroES, главных белков наружной мембраны размером 30 кДа, белка GE размером 100 кДа, белка GE размером 130 кДа, белка GE размером 160 кДа (род *Ehrlichia*, эрлихиоз); секретируемого антигена SagA, sagA-подобных белков SalA и SalB, коллагенадгезина Scm, поверхностных белков Fms1 (EbpA(fm)), Fms5 (EbpB(fm)), Fms9 (EpbC(fm)) и Fms10, белка EbpC(fm), иммунопротективного гликопротеина G1 размером 96 кДа (род *Enterococcus*, энтерококковая инфекция); геномного полипротеина, полимеразы 3D, вирусного капсидного белка VP1, вирусного капсидного белка VP2, вирусного капсидного белка VP3, вирусного капсидного белка VP4, протеазы 2A, протеазы 3C (род *Enterovirus*, энтеровирусная инфекция); белков наружной мембраны OM, белка наружной мембраны размером 60 кДа, антигена клеточной поверхности OmpA, антигена клеточной поверхности OmpB (sca5), белка наружной мембраны размером 134 кДа, белка наружной мембраны размером 31 кДа, белка наружной мембраны размером 29,5 кДа, белка клеточной поверхности SCA4, белка клеточной поверхности Adr1 (RP827), белка клеточной поверхности Adr2 (RP828), белка клеточной поверхности SCA1, белка invA, ассоциированного с инвазией, белка клеточного деленияfts, секреторных белков семейства sec 0, вирулентных белков virB, tlyA, tlyC, парвулиноподобного белка Plp, препротеинтранслоказы SecA, поверхностного белкового антигена SPA размером 120 кДа, сложного антигена размером 138 кДа, главного белка размером 100 кДа (белка I), внутрицитоплазматического белка D, протективного поверхностного белкового антигена SPA (*Rickettsia prowazekii*, эпидемический тиф); ядерных антигенов вируса Эпштейна-Барр (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, лидерного белка EBNA (EBNA-LP)), латентных мембранных белков (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B), раннего антигена EBV-EA, мембранного антигена EBV-MA, вирусного капсидного антигена EBV-VCA, щелочной нуклеазы EBV-AN, гликопротеина H, гликопротеина gp350, гликопротеина gp110, гликопротеина gp42, гликопротеина gHgL, гликопротеина gB (вирус Эпштейна-Барр (EBV), инфекционный мононуклеоз, вызываемый вирусом Эпштейна-Барр); капсидного белка VP2, капсидного белка VP1, главного белка NS1 (парвовирус B19, инфекционная эритема (пятая болезнь)); антигена pp65, гликопротеина 105, главного капсидного белка, гликопротеина оболочки H, белка U51 (вирус герпеса человека 6 типа (HHV-6) и вирус герпеса человека 7 типа (HHV-7), внезапная экзантема); тиоредоксин-глутатионредуктазы TGR, катепсинов L1 и L2, белка типа Кунитца KTM, лейциновой аминопептидазы LAP, цистеиновой протеиназы Fas2, сапозиноподобного белка-2 SAP-2, тиоредоксинпероксидазы TPx, Prx-1, Prx-2, цистеиновой протеиназы катепсина L CL3, протеазы катепсина L CL1, фосфоглицераткиназы PGK, секреторного белка размером 27 кДа, белка HSP35-альфа размером 60 кДа, глутатионтрансферазы GST, антигена тегумента TA размером 28,5 кДа, протеазы катепсина B3 CatB3, цистатина стефина-11 типа, катепсина L5, катепсина L1g и катепсина B, белка FABP, связывающего жирные кислоты, лейциновых аминопептидаз LAP (*Fasciola hepatica* и *Fasciola gigantica*, фасциолез); прионного белка (прион, вызывающий FFI, фатальная семейная бессонница (FFI)); белка VAL-1, подобного гомологу аллергена яда, многокопийного транскрипта личинок ALT-1, многокопийного транскрипта личинок ALT-2, тиоредоксинпероксидазы TPX, гомолога аллергена ос VAN, тиоредоксинпероксидазы 2 TPX-2, антигенного белка SXP (пептидов N, N1, N2 и N3), белка-1 ASP-1, ассоциированного с активацией, тиоредоксина TRX, транслутаминазы BmTGA, глутатион-S-трансферазы GST, миозина, гомолога аллергена ос VAN, коллагеназы размером 175 кДа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH, коллагена кутикулы Col-4, секретируемых кислых белков личинок SLAP, хитиназы CHI-1, мальтозосвязывающего белка МБР, гликолитического фермента фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы Fba, тропомиозина TMY-1, продукта гена OvB20, специфичного для нематод, онхоцистатина CPI-2, Cox-2 (надсемейство Filarioidea, филяриоз); фосфолипазы C PLC, термолабильного энтеротоксина B, компонента йота-токсина Ib, белка CPE1281, пируватферредоксиноксидоредуктазы, фактора элонгации G EF-G, перфринголизина O Pfo, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GapC, фруктозобисфосфатаальдозазы Alf2, энтеротоксина *Clostridium perfringens* CPE, альфа-токсина AT, альфа-токсоида ATd, эпсилон-токсоида ETd, белка HP, большого цитотоксина TpeL, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидазы Naglu, фосфоглицеромутаза Pgm (*Clostridium perfringens*, пищевое отравление, вызываемое *Clostridium perfringens*); лейкотоксина IktA, адгезивного белка FadA, белка наружной мембраны RadD, высокомолекулярного аргининсвязывающего белка (род *Fusobacterium*, фузобактериальная инфекция); фосфолипазы C PLC, термолабильного энтеротоксина B, компонента йота-токсина Ib, белка CPE1281, пируватферредоксиноксидоредуктазы, фактора элонгации G EF-G, перфринголизина O Pfo, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GapC, фруктозобисфосфатаальдозазы Alf2, энтеротоксина *Clostridium perfringens* CPE, альфа-токсина AT, альфа-токсоида ATd, эпсилон-токсоида ETd, белка HP, большого цитотоксина TpeL, эндо-бета-N-ацетилглюкозаминидазы Naglu, фосфоглицеромутаза Pgm (обычно *Clostridium perfringens*; другие виды *Clostridium*, газовая гангрена (клостридиальный мионекроз)); липазы A, липазы B, пероксидазы Dec1 (*Geotrichum candidum*, геотрихоз); прионного белка (прион, вызывающий GSS, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (GSS)); белков стенки цисты CWP1, CWP2, CWP3, варианта поверхностного белка VSP, VSP1, VSP2, VSP3, VSP4, VSP5, VSP6, антигена размером 56 кДа, пируватферредоксинокси-

доредуктазы PFOR, алкогольдегидрогеназы E ADHE, альфа-гиардина, альфа8-гиардина, альфа1-гиардина, бета-гиардина, цистеиновых протеаз, глутатион-S-трансферазы GST, аргининдезимины ADI, фруктозо-1,6-бисфосфатальдолазы FBA, антигенов трофозоитов лямблий GTA (GTA1, GTA2), орнитин-карбоксилтрансферазы OCT, белка SALP, подобного ассемблину поперечнополосатых волокон, белка UPL, подобного уридинфосфорилазе, альфа-тубулина, бета-тубулина (*Giardia intestinalis*, гиардиоз); представителей семейства ABC-транспортёров (LolC, OppA и PotF), предполагаемого трансмембранного белка системы высвобождения липопротеинов LolC/E, флагеллина FliC, белка A внутриклеточной подвижности Burkholderia BimA, бактериального фактора элонгации Tu EF-Tu, OmpA-подобного белка размером 17 кДа, белка, кодируемого boaA (*Burkholderia mallei*, can); циклофилина CyP, белка личинки третьей стадии GS24 размером 24 кДа, продуктов экскреции-секреции ESP (40, 80, 120 и 208 кДа) (*Gnathostoma spinigerum* и *Gnathostoma hispidum*, гнатостомоз); белков пилинов, минорной субъединицы pilC, ассоциированной с пилинами, главной пилиновой субъединицы pilE и ее вариантов, pilS, белка фазовой вариации porA, порина B PorB, белка TraD, антигена наружной мембраны нейссерий H.8, антигена размером 70 кДа, главного белка наружной мембраны PI, белков наружной мембраны PIA и PIB, W-антигена, поверхностного белка A NspA, белка TbpA, связывающего трансферрин, белка TbpB, связывающего трансферрин, PBP2, белка, кодируемого mtrR, белка, кодируемого ropA, мембранной пермеазы FbpBC, белковой системы FbpABC, белков LbpAB, белка наружной мембраны Opa, транспортера наружной мембраны FetA, регулятора MpeR, репрессируемого железом (*Neisseria gonorrhoeae*, гонорея); белка наружной мембраны A OmpA, белка наружной мембраны C OmpC, белка наружной мембраны K17 OmpK17 (*Klebsiella granulomatis*, паховая гранулема (донованоз)); фибронектинсвязывающего белка Sfb, фибронектин/фибриногенсвязывающего белка FBP54, фибронектинсвязывающего белка FbaA, белка M 1 типа Emm1, белка M6 типа Emm6, белка 35 Sib35, связывающего иммуноглобулины, поверхностного белка R28 Spr28, супероксиддисмутаза SOD, пептидазы C5a ScpA, антигена I/II AgI/II, адгезина AspA, белка GRAB, связывающего альфа2-макроглобулин, родственного G-белкам, поверхностного фибриллярного белка M5 (*Streptococcus pyogenes*, инфекция, вызываемая стрептококком группы A); β -антигена C-белка, белков аргининдезимины, адгезина BibA, белка BPS размером 105 кДа, поверхностных антигенов с, поверхностных антигенов R, поверхностных антигенов X, белка R1, устойчивого к трипсину, белка R3, устойчивого к трипсину, белка R4, устойчивого к трипсину, поверхностного иммуногенного белка Sip, поверхностного белка Rib, белка LtrG с богатыми лейцином повторами, белка Sgt-2 с богатыми серином повторами, альфа-антигена C-белка Vsa, бета-антигена Bag, поверхностного антигена эпсилон, альфа-подобного белка ALP1, альфа-подобного белка ALP5, поверхностного антигена дельта, альфа-подобного белка ALP2, альфа-подобного белка ALP3, альфа-подобного белка ALP4, белка C-бета Vac (*Streptococcus agalactiae*, инфекция, вызываемая стрептококком группы B); белка 2 Tbp2, связывающего трансферрин, фосфатазы P4, белка наружной мембраны P6, липопротеина Pal, ассоциированного с пептидогликанами, белка D, белка E, белка Nap, отвечающего за адгезию и пенетрацию, белка наружной мембраны 26 Omp26, белка наружной мембраны P5 (фимбрина), белка наружной мембраны D15, белка наружной мембраны OmpP2, 5'-нуклеотидазы NucA, белка наружной мембраны P1, белка наружной мембраны P2, липопротеина наружной мембраны Pcr, липопротеина E, белка наружной мембраны P4, фукулокиназы FucK, [Cu,Zn]-содержащей супероксиддисмутаза SodC, протеазы HtrA, белка 0145, альфа-галактозилцерамида (*Haemophilus influenzae*, инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae*); полимеразы 3D, вирусного капсидного белка VP1, вирусного капсидного белка VP2, вирусного капсидного белка VP3, вирусного капсидного белка VP4, протеазы 2A, протеазы 3C (энтеровирусы, преимущественно вирус Коксаки А и энтеровирус 71 (EV71), болезнь рук, ног и рта (HFMD)); РНК-полимеразы L, белка L, гликопротеина Gn, гликопротеина Gc, нуклеокапсидного белка S, гликопротеина оболочки G1, нуклеопротеина NP, белка N, полипротеина M (вирус Син Номбре, хантавирус, хантавирусный легочный синдром (HPS)); белка теплового шока HspA, белка теплового шока HspB, цитратсинтазы GltA, белка UreB, белка теплового шока Hsp60, белка NAP, активирующего нейтрофилы, каталазы KatA, вакуолизованный цитотоксин VacA, уреазы альфа UreA, уреазы бета Ureb, белка Cpn10, белка groES, белка теплового шока Hsp10, белка MorB, белка CAG размером 10 кДа, ассоциированного с цитотоксичностью, антигена размером 36 кДа, бета-лактамазы HcrA, бета-лактамазы HcrB (*Helicobacter pylori*, инфекция, вызываемая *Helicobacter pylori*); интегральных мембранных белков, белков, склонных к агрегации, O-антигена, антигенов токсина Stx2B, антигена токсина Stx1B, фрагмента адгезивного антигена Int28, белка EspA, белка EspB, интимина, белка Tir, белка IntC300, белка Eae (*Escherichia coli* O157:H7, O111 и O104:H4, гемолитико-уремический синдром (HUS)); РНК-полимеразы L, белка L, гликопротеина Gn, гликопротеина Gc, нуклеокапсидного белка S, гликопротеина оболочки G1, нуклеопротеина NP, белка N, полипротеина M (семейство Bunyaviridae, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (HFRS)); гликопротеина G, белка матрикса М, нуклеопротеина N, слитого белка F, полимеразы L, белка W, белка C, фосфопротеина р, неструктурного белка V (хенипавирус (вирус Хендра, вирус Нипах), хенипавирусные инфекции); полипротеина, гликопротеина Gr2, поверхностного антигена вируса гепатита А HBsAg, белка 2A, вирусного белка VP1, вирусного белка VP2, вирусного белка VP3, вирусного белка VP4, белка P1B, белка P2A, белка P3AB, белка P3D (вирус гепатита А, гепатит А); поверхностного антигена вируса гепатита В HBsAg, корового антигена вируса гепатита В HbcAg, полимеразы, белка Hbx, среднего по-

верхностного белка preS2, поверхностного белка L, большого белка S, вирусного белка VP1, вирусного белка VP2, вирусного белка VP3, вирусного белка VP4 (вирус гепатита В (HBV), гепатит В); гликопротеина оболочки E1 gp32 gp35, гликопротеина оболочки E2 NS1 gp68 gp70, капсидного белка С, корового белка Core, полипротеина, вирусного белка VP1, вирусного белка VP2, вирусного белка VP3, вирусного белка VP4, антигена G, белка NS3, белка NS5A (вирус гепатита С, гепатит С); вирусного белка VP1, вирусного белка VP2, вирусного белка VP3, вирусного белка VP4, большого дельта-антигена вируса гепатита, малого дельта-антигена вируса гепатита (вирус гепатита D, гепатит D); вирусного белка VP1, вирусного белка VP2, вирусного белка VP3, вирусного белка VP4, капсидного белка E2 (вирус гепатита E, гепатит E); гликопротеина L UL1, урацил-ДНК-гликозилазы UL2, белка UL3, белка UL4, белка репликации ДНК UL5, портового белка UL6, белка созревания вириона UL7, ДНК-геликазы UL8, белка UL9, связывающегося в точке начала репликации, гликопротеина M UL10, белка UL11, щелочной экзонуклеазы UL12, серин-треониновой протеинкиназы UL13, белка тегумента UL14, терминазы UL15, белка тегумента UL16, белка UL17, капсидного белка VP23 UL18, главного капсидного белка VP5 UL19, мембранного белка UL20, белка тегумента UL21, гликопротеина H (UL22), тимидинкиназы UL23, белка UL24, белка UL25, капсидного белка P40 (UL26, VP24, VP22A), гликопротеина В (UL27), белка ICP18.5 (UL28), главного ДНК-связывающего белка ICP8 (UL29), ДНК-полимеразы UL30, белка ядерного матрикса UL31, гликопротеина оболочки UL32, белка UL33, белка внутренней ядерной мембраны UL34, капсидного белка VP26 (UL35), большого белка тегумента UL36, белка UL37, участвующего в сборке капсида, белка VP19C (UL38), рибонуклеотидредуктазы (большой субъединицы) UL39, рибонуклеотидредуктазы (малой субъединицы) UL40, белка тегумента/белка вириона, останавливающего синтез белков клетки-хозяина (UL41), фактора процессивности ДНК-полимеразы UL42, мембранного белка UL43, гликопротеина С (UL44), мембранного белка UL45, белков тегумента VP11/12 (UL46), белка тегумента VP13/14 (UL47), белка созревания вириона VP16 (UL48, альфа-TIF), белка оболочки UL49, dUTP-дифосфатазы UL50, белка тегумента UL51, белка UL52 комплекса ДНК-геликаза/праймазы, гликопротеина К (UL53), белка IE63, регулирующего транскрипцию (ICP27, UL54), белка UL55, белка UL56, белка репликации вируса ICP22 (IE68, US1), белка US2, серин/треониновой протеинкиназы US3, гликопротеина G (US4), гликопротеина J (US5), гликопротеина D (US6), гликопротеина I (US7), гликопротеин E (US8), белка тегумента US9, капсидного белка/белка тегумента US10, белка Vmw21 (US11), белка ICP47 (IE12, US12), главного активатора транскрипции ICP4 (IE175, RS1), E3-убиквитинлигазы ICPO (IE110), белка 1 LRP1, связанного с латентностью, белка 2 LRP2, связанного с латентностью, фактора нейровирулентности RL1 (ICP34.5), транскрипта LAT, ассоциированного с латентностью (вирус простого герпеса 1 и 2 типов (HSV-1 и HSV-2), простой герпес); белка теплового шока Hsp60, белка клеточной поверхности H1C, дипептидилпептидазы IV типа DppIV, М-антигена, белка размером 70 кДа, гистоноподобного белка размером 17 кДа (*Histoplasma capsulatum*, гистоплазмоз); белка-1 FAR-1, связывающего жирные кислоты и ретинол, тканевого ингибитора металлопротеиназы TIMP (TMP), цистеиновой протеиназы ACEY-1, цистеиновой протеиназы ACCP-1, поверхностного антигена Ac-16, секретируемого белка 2 ASP-2, металлопротеазы 1 MTP-1, ингибитора аспартилпротеазы API-1, антигена SAA-1, ассоциированного с клеточной поверхностью, антигена SAA-2, ассоциированного с клеточной поверхностью, секретируемого ингибитора сериновой протеазы фактора Ха антикоагулянта AP, специфичного для взрослых, катепсин-D-подобной аспарагиновой протеазы ARR-1, глутатион-S-трансферазы GST, аспарагиновой протеазы APR-1, ацетилхолинэстеразы AChE (*Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus*, анкилостомоз); белка NS1, белка NP1, белка VP1, белка VP2, белка VP3 (бокавирус человека (HBoV), инфекция, вызываемая бокавирусом человека); главного поверхностного белка 2 MSP2, главного поверхностного белка 4 MSP4, варианта MSP SGV1, варианта MSP SGV2, белка наружной мембраны OMP, белка наружной мембраны 19 OMP-19, главного антигенного белка MAP1, главного антигенного белка MAP1-2, главного антигенного белка MAP1B, главного антигенного белка MAP1-3, Egm2510, кодирующего белок, белка GroEL, белка GroES, главных белков наружной мембраны размером 30 кДа, белка GE размером 100 кДа, белка GE размером 130 кДа, белка GE размером 160 кДа (*Ehrlichia ewingii*, эрлихиоз человека, вызываемый *Ehrlichia ewingii*); главных поверхностных белков 1-5 (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5), белков системы секреции IV типа VirB2, VirB7, VirB11, VirD4 (*Anaplasma phagocytophilum*, гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA)); белка NS1, малого гидрофобного белка NS2, белка SH, слитого белка F, гликопротеина G, белка матрикса М, белка матрикса М2-1, белка матрикса М2-2, фосфопротеина Р, нуклеопротеина N, полимеразы L (метапневмовирус человека (hMPV), инфекция, вызываемая метапневмовирусом человека); главного поверхностного белка 2 MSP2, главного поверхностного белка 4 MSP4, варианта MSP SGV1, варианта MSP SGV2, белка наружной мембраны OMP, белка наружной мембраны 19 OMP-19, главного антигенного белка MAP1, главного антигенного белка MAP1-2, главного антигенного белка MAP1B, главного антигенного белка MAP1-3, белка, кодируемого Egm2510, белка GroEL, белка GroES, главных белков наружной мембраны размером 30 кДа, белка GE размером 100 кДа, белка GE размером 130 кДа, белка GE размером 160 кДа (*Ehrlichia chaffeensis*, моноцитарный эрлихиоз человека); белка репликации E1, регуляторного белка E2, белка E3, белка E4, белка E5, белка E6, белка E7, белка E8, главного капсидного белка L1, минорного капсидного белка L2 (вирус папилломы человека (HPV), инфекция, вызываемая вирусом папилломы человека (HPV)); слитого белка F, гемагглютини-

нейраминидазы HN, гликопротеина G, белка матрикса М, фосфопротеина Р, нуклеопротеина N, полимеразы L (вирусы парагриппа человека (HPIV), инфекция, вызываемая вирусом парагриппа человека); гемагглютинины (HA), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), белка M1, белка M2, белка NS1, белка NS2 (белка NEP: белка ядерного экспорта), белка PA, белка PB1 (основного полимеразного белка 1), белка PB1-F2 и белка PB2 (семейство Orthomyxoviridae, вирус гриппа (flu)); геномного полипротеина, белка E, белка M, капсидного белка C (вирус японского энцефалита, японский энцефалит); токсина RTX, пилей IV типа, главной субъединицы пилей PilA, факторов регуляции транскрипции PilS и PilR, белка сигма-54, белков наружной мембраны (*Kingella kingae*, инфекция, вызываемая *Kingella kingae*); прионного белка (прион, вызывающий куру, куру); нуклеопротеина N, полимеразы L, белка матрикса Z, гликопротеина GP (вирус Ласса, лихорадка Ласса); липопротеина PAL, ассоциированного с пептидогликанами, шаперонина Cpn60 размером 60 кДа (groEL, HspB), белка пилей IV типа PHE, белка наружной мембраны MIP, главного белка наружной мембраны MompS, цинковой металлопротеиназы MSP (*Legionella pneumophila*, легионеллез (болезнь легионеров, понтиакская лихорадка)); нуклеазы P4, белка WD, рибонуклеотидредуктазы M2, поверхностного мембранного гликопротеина Pg46, цистеиновой протеиназы CP, белка 78 GRP-78, регулируемого глюкозой, стадиспецифического белка A2, подобного S-антигену, АТФазы F1, бета-тубулина, белка теплового шока 70 Hsp70, KMP-11, гликопротеина GP63, белка BT1, нуклеозидгидролазы NH, белка клеточной поверхности B1, белка P1, подобного рибосомному белку P1, стерин-24-с-метилтрансферазы SMT, белка LACK, гистона H1, белка SPB1, тиол-специфичного антиоксиданта TSA, белкового антигена STI1, сигнальной пептидазы SP, гистона H2B, поверхностного антигена PSA-2, цистеиновой протеиназы b Cpb (род *Leishmania*, лейшманиоз); главного мембранного белка I, антигена, богатого серином, размером 45 кДа, шаперонина GroES размером 10 кДа, антигена HSP кДа, аминоксононаноатсинтазы AONS, белка рекомбиназы A RecA, ацетил/пропионил-кофермент А-карбоксилазы альфа, аланинрацемазы, шаперонина 2 размером 60 кДа, ESAT-6-подобного белка EscB (L-ESAT-6), белка Lsr2, белка ML0276, гепаринсвязывающего гемагглютинины HBHA, белка теплового шока 65 Hsp65, белков, кодируемых тусP1 или ML0041, белков, кодируемых htrA2 или ML0176, белков, кодируемых htrA4 или ML2659, белков, кодируемых gsr или ML0379, белков, кодируемых clpC или ML0235 (*Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, лепра); белка наружной мембраны LipL32, мембранного белка LIC10258, мембранного белка LP30, мембранного белка LIC12238, OmpA-подобного белка Lsa66, поверхностного белка LigA, поверхностного белка LigB, главного белка наружной мембраны OmpL1, белка наружной мембраны LipL41, белка LigAni, поверхностного белка LcpA, адгезивного белка LipL53, белка наружной мембраны UpL32, поверхностного белка Lsa63, флагеллина FlaB1, мембранного липопротеина LipL21, мембранного белка pL40, поверхностного адгезина лептоспир Lsa27, белка наружной мембраны OmpL36, белка наружной мембраны OmpL37, белка наружной мембраны OmpL47, белка наружной мембраны OmpL54, ацилтрансферазы LpxA (род *Leptospira*, лептоспироз); предшественника листериолизина O Hly (LLO), белка Iap (P60), ассоциированного с инвазией, белка PrfA, регулирующего экспрессию листериолизина, цинковой металлопротеиназы Mpl, фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы C PLC (PlcA, PlcB), О-ацетилтрансферазы Oat, ABC-транспортера, представляющего собой пермеазу Im.G_1771, адгезивного белка LAP, рецептора LAP Hsp60, адгезина LapB, гемолизина листериолизина O LLO, белка ActA, интерналина A InlA, белка InlB (*Listeria monocytogenes*, листериоз); белка A наружной поверхности OspA, белка наружной поверхности OspB, белка наружной поверхности OspC, декоринсвязывающего белка A DbpA, декоринсвязывающего белка B DbpB, корового белка филамента жгутика Fla размером 41 кДа, основного мембранного белка A BmpA (иммунодоминантного антигена P39), предшественника липопротеина наружной поверхности размером 22 кДа (антигена IPLA7), варибельного поверхностного липопротеина vlsE (обычно *Borrelia burgdorferi* и другие виды *Borrelia*, болезнь Лайма (боррелиоз Лайма)); белка VAL-1, подобного гомологу аллергена яда, многокопийного транскрипта личинок ALT-1, многокопийного транскрипта личинок ALT-2, тиоредоксинпероксидазы TPX, гомолога аллергена ос VAN, тиоредоксинпероксидазы 2 TPX-2, антигенного белка SXP (пептидов N, N1, N2 и N3), белка-1 ASP-1, ассоциированного с активацией, тиоредоксина TRX, транслутаминазы BmTGA, глутатион-S-трансфераз GST, миозина, гомолога аллергена ос VAN, коллагеназы размером 175 кДа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH, коллагена кутикулы Col-4, секретируемых кислых белков личинок SLAP, хитиназы CHI-1, мальтозосвязывающего белка МБР, гликолитического фермента фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы Fba, тропомиозина TMY-1, продукта гена OvB20, специфичного для нематод, онхоистатина CPI-2, белка Cox-2 (*Wuchereria bancrofti* и *Brugia malayi*, лимфатический филяриатоз (слоновая болезнь)); гликопротеина GP, белка матрикса Z, полимеразы L, нуклеопротеина N (вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), лимфоцитарный хориоменингит); безымянного белка TRAP, родственного тромбоспондину, поверхностного белка 2 спорозитов SSP2, антигена 1 апикальной мембраны AMA1, мембранного антигена RMA1, ассоциированного с ропртиями, антигена с повторами из кислых и основных остатков ABRA, белка PF, отвечающего за прохождение через клетки, белка Pvs25, поверхностного белка 1 мерозоитов MSP-1, поверхностного белка 2 мерозоитов MSP-2, поверхностного антигена RESA эритроцитов, инфицированных кольцевидным трофозоитом, антигена 3 печеночной стадии LSA-3, белка Eba-175, антигена 5 с сериновыми повторами SERA-5, циркумспорозоитного белка CS, поверхностного белка 3 мерозоитов MSP3, поверхностного белка 8 мерозоитов MSP8, енолазы PF10, гепатоцитар-

но-эритроцитарного белка HEP17 размером 17 кДа, белка 1 мембраны эритроцитов EMP1, белка К-бета, поверхностного белка 4/5 мерозоитов MSP 4/5, белка теплового шока Hsp90, белка GLURP, богатого глутаматом, поверхностного белка 4 мерозоитов MSP-4, белка STARP, предшественника антигена CRA, родственного циркумспорозоитному белку (род *Plasmodium*, малярия); нуклеопротеина N, белка VP24, ассоциированного с мембраной, минорного нуклеопротеина VP30, кофактора полимеразы VP35, полимеразы L, белка матрикса VP40, гликопротеина оболочки GP (вирус Марбург, марбургская геморрагическая лихорадка (MHF)); белка С, белка матрикса М, фосфопротеина Р, неструктурного белка V, гликопротеина гемагглютинина Н, полимеразы L, нуклеопротеина N, слитого белка F (вирус кори, корь); представителей семейства ABC-транспортеров (LolC, OppA и PotF), предполагаемого трансмембранного белка системы высвобождения липопротеинов LolC/E, флагеллина FliC, белка А внутриклеточной подвижности Burkholderia BimA, бактериального фактора элонгации Tu EF-Tu, OmpA-подобного белка размером 17 кДа, белка, кодируемого boaA, белка, кодируемого boaB (*Burkholderia pseudomallei*, мелиоидоз (болезнь Уитмора)); белков пилинов, минорной субъединицы pilC, ассоциированной с пилинами, главной пилиновой субъединицы pilE и ее вариантов, pilS, белка фазовой вариации roqA, порина B PorB, белка TraD, антигена наружной мембраны нейссерий H.8, антигена размером 70 кДа, главного белка наружной мембраны PI, белков наружной мембраны PIA и PIB, W-антигена, поверхностного белка A NspA, белка TbpA, связывающего трансферрин, белка TbpB, связывающего трансферрин, PBP2, белка, кодируемого mtrR, белка, кодируемого ropA, мембранной пермеазы FbpBC, белковой системы FbpABC, белков LbpAB, белка наружной мембраны Opa, транспортера наружной мембраны FetA, регулятора MpeR, репрессируемого железом, белка fHbp, связывающего фактор H, адгезина NadA, белка NhbA, репрессора FarR (*Neisseria meningitidis*, менингококковое заболевание); белка размером 66 кДа, белка размером 22 кДа (обычно *Metagonimus yokogawai*, метагонимоз); белков полярных трубок (34, 75 и 170 кДа у *Glugea*, 35, 55 и 150 кДа у *Encephalitozoon*), белка, родственного кинезину, наибольшей субъединицы РНК-полимеразы II, белка, сходного с интегральным мембранным белком YIPA, антисайленсингового белка I, фактора транскрипции белков теплового шока HSF, протеинкиназы, тимидинкиназы, NOP-2-подобного ядрышкового белка (отдел *Microsporidia*, микроспоридиоз); CASP8- и FADD-подобного регулятора апоптоза, глутатионпероксидазы GPX1, РНК-геликазы NPH-II NPH2, каталитической субъединицы поли(А)-полимеразы PAPL, главного белка оболочки P43K, субъединицы размером 70 кДа раннего фактора транскрипции VETFS, субъединицы размером 82 кДа раннего фактора транскрипции VETFL, металлоэндопептидазы G1-типа, нуклеозидтрифосфатазы I NPH1, белка MC134L, подобного белку репликации A28, субъединицы размером 7 кДа РНК-полимеразы RP07 (вирус контагиозного моллюска (MCV), контагиозный моллюск (MC)); белка матрикса М, фосфопротеина P/V, малого гидрофобного белка SH, нуклеопротеина N, белка V, слитого гликопротеина F, гемагглютинина-нейраминидазы HN, РНК-полимеразы L (вирус эпидемического паротита, эпидемический паротит); белков наружной мембраны OM, антигена клеточной поверхности OmpA, антигена клеточной поверхности OmpB (sca5), белка клеточной поверхности SCA4, белка клеточной поверхности SCA1, внутрицитоплазматического белка D, кристаллического белка поверхностного слоя SLP, протективного поверхностного белкового антигена SPA (*Rickettsia typhi*, крысиный тиф (эндемический тиф)); адгезина P1, адгезина P30, белка p116, белка P40, белка цитоскелета HMW1, белка цитоскелета HMW2, белка цитоскелета HMW3, белка, кодируемого MPN152, MPN426, кодирующего белок, MPN456, кодирующего белок, MPN-500, кодирующего белок (*Mycoplasma pneumoniae*, микоплазменная пневмония); NosA, железозависимого регуляторного белка, VarA, VarD, VarF, VarG, казеинолитической протеазы, белка размером 43 кДа, ассоциированного с кончиками филаментов, белка P24, белка P61, белка размером 15 кДа, белка размером 56 кДа (обычно *Nocardia asteroides* и другие виды *Nocardia*, нокардиоз); белка VAL-1, подобного гомологу аллергена яда, многокопийного транскрипта личинок ALT-1, многокопийного транскрипта личинок ALT-2, тиоредоксинпероксидазы TPX, гомолога аллергена ос VAN, тиоредоксинпероксидазы 2 TPX-2, антигенного белка SXP (пептидов N, N1, N2 и N3), белка-1 ASP-1, ассоциированного с активацией, тиоредоксина TRX, транслутаминазы BmTGA, глутатион-S-трансфераз GST, миозина, гомолога аллергена ос VAN, коллагеназы размером 175 кДа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH, коллагена кутикулы Col-4, секретируемых кислых белков личинок SLAP, хитиназы CHI-1, мальтозосвязывающего белка МБР, гликолитического фермента фруктозо-1,6-бисфосфатаальдозазы Fba, тропомиозина TMY-1, продукта гена OvB20, специфичного для нематод, онхоцистатина CPI-2, Cox-2 (*Onchocerca volvulus*, онхоцеркоз (речная слепота)); секретируемого гликопротеина размером 43 кДа, гликопротеина gp0, гликопротеина gp75, антигена Pb27, антигена Pb40, белка теплового шока Hsp65, белка теплового шока Hsp70, белка теплового шока Hsp90, белка P10, триозофосфатизомеразы TPI, лектина паракокцина, связывающего N-ацетилглюкозамин, белка Pb28 размером 28 кДа (*Paracoccidioides brasiliensis*, паракокцидиоз (южноамериканский бластомикоз)); круципаиноподобной цистеиновой протеазы Pw28CCP размером 28 кДа (обычно *Paragonimus westermani* и другие виды *Paragonimus*, парагонимоз); белка наружной мембраны OmpH, белка наружной мембраны Omp28, белка PM1539, белка PM0355, белка PM1417, репарационного белка MutL, белка BcbC, белка PM0305, формилатдегидрогеназы-N, белка PM0698, белка PM1422, ДНК-гиразы, липопротеина PlpE, адгезивного белка Crp39, рецептора системы поглощения гема HasR, капсульного белка размером 39 кДа, OMP IROMP, регулируемого железом, белка наружной мембраны

OmpA87, фимбриального белка Ptf, фимбриального субъединичного белка PtfA, белка TbpI, связывающего трансферрин, фермента эстеразы MesA, токсина *Pasteurella multocida* PMT, адгезивного белка Crp39 (род *Pasteurella*, пастереллез); филаментного гемагглютиниона FhaB, аденилатциклазы CyaA, предшественника субъединицы 4 коклюшного токсина PtxD, предшественника пертактина Prn, субъединицы 1 токсина PtxA, белка Crp60, белка brkA, предшественника субъединицы 2 коклюшного токсина PtxB, предшественника субъединицы 3 коклюшного токсина 3 PtxC, предшественника субъединицы 5 коклюшного токсина PtxE, пертактина Prn, белка Fim2, белка Fim3 (*Bordetella pertussis*, коклюш (судорожный кашель)); капсульного антигена F1, V-антигена, ассоциированного с вирулентностью, секретируемого эффекторного белка LcrV, V-антигена, протеазы наружной мембраны Pla, секретируемого эффекторного белка YopD, предполагаемой секретируемой протеинтирозинфосфатазы YopH, главной субъединицы комплекса иглы YscF, протеинкиназы YopO, предполагаемого белка-аутопереносчика YnfF, ABC-транспортера внутренней мембраны YbtQ (Irp7), предполагаемого сахаросвязывающего белка YPO0612, белка теплового шока 90 HtpG, предполагаемого белка сульфатазы YdeN, белка-переносчика липопротеинов наружной мембраны LolA, секреторного шаперона YegA, предполагаемого липопротеина YPO0420, белка-активатора гемолизина HpmB, рецептора пестицина/иерсиниобакина наружной мембраны Psp, секретируемого эффекторного белка YopE, секретируемого эффекторного белка YopF, секретируемого эффекторного белка YopK, белка наружной мембраны YopN, белка наружной мембраны YopM, предшественника коагулазы/фибринолизина Pla (*Yersinia pestis*, чума); белка PhpA, поверхностного адгезина PsaA, пневмолизина Ply, АТФ-зависимой протеазы Clp, липоатпротеинлигазы LplA, белка psrP, заякоренного на поверхности клеточной стенки, сортазы SrtA, глутамил-тРНК-синтазы GltX, холинсвязывающего белка A CbpA, поверхностного белка A пневмококков PspA, поверхностного белка C пневмококков PspC, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы Gnd, железосвязывающего белка PiaA, муреингидролазы LytB, белка LytC, протеазы A1 (*Streptococcus pneumoniae*, пневмококковая инфекция); главного поверхностного белка B, кексиподобной протеазы KEX1, белка A12, антигена P55 размером 55 кДа, главного поверхностного гликопротеина Msg (*Pneumocystis jirovecii*, пневмоцистная пневмония (PCP)); геномного полипротеина, полимеразы 3D, вирусного капсидного белка VP1, вирусного капсидного белка VP2, вирусного капсидного белка VP3, вирусного капсидного белка VP4, протеазы 2A, протеазы 3C (полиовирус, полиомиелит); белка Nfa1, эксендина-3, секреторной липазы, катепсин-B-подобной протеазы, цистеиновой протеазы, катепсина, пероксиредоксина, белка Cry1Ac (обычно *Naegleria fowleri*, первичный амёбный менингоэнцефалит (ПАМ)); агнопротеина, большого Т-антигена, малого Т-антигена, главного капсидного белка VP1, минорного капсидного белка Vp2 (вирус JC, прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия); белка низкого кальциевого ответа E LCrE, наружного белка хламидий N CopN, серин/треониновой протеинкиназы PknD, S-малонилтрансферазы ацилпереносящего белка FabD, белка Ssb, связывающего одонитевую ДНК, главного белка наружной мембраны MOMP, белка 2 наружной мембраны Omp2, семейства полиморфных мембранных белков (Pmp1, Pmp2, Pmp3, Pmp4, Pmp5, Pmp6, Pmp7, Pmp8, Pmp9, Pmp10, Pmp11, Pmp12, Pmp13, Pmp14, Pmp15, Pmp16, Pmp17, Pmp18, Pmp19, Pmp20, Pmp21) (*Chlamydomonas psittaci*, пситтакоз); белка наружной мембраны P1, белка теплового шока B HspB, ABC-транспортера пептидов, GTP-связывающего белка, белка IcmB, рибонуклеазы R, фосфатазы SixA, белка DsbD, белка наружной мембраны TolC, ДНК-связывающего белка PhoB, АТФазы DotB, белка теплового шока B HspB, мембранного белка Com1, белка размером 28 кДа, ДНК-3-метиладенингликозидазы I, белка наружной мембраны OmpH, белка наружной мембраны AdaA, Т-белка системы расщепления глицина (*Coxiella burnetii*, Ку-лихорадка); нуклеопротеина N, большого структурного белка L, фосфопротеина P, белка матрикса M, гликопротеина G (вирус бешенства, бешенство); слитого белка F, нуклеопротеина N, белка матрикса M, белка матрикса M2-1, белка матрикса M2-2, фосфопротеина P, малого гидрофобного белка SH, главного поверхностного гликопротеина G, полимеразы L, неструктурного белка 1 NS1, неструктурного белка 2 NS2 (респираторно-синцитиальный вирус (RSV), инфекция, вызываемая респираторно-синцитиальным вирусом); геномного полипротеина, полимеразы 3D, вирусного капсидного белка VP1, вирусного капсидного белка VP2, вирусного капсидного белка VP3, вирусного капсидного белка VP4, протеазы 2A, протеазы 3C (риновирус, риновирусная инфекция); белков наружной мембраны OM, антигена клеточной поверхности OmpA, антигена клеточной поверхности OmpB (sca5), белка клеточной поверхности SCA4, белка клеточной поверхности SCA1, белка PS120, внутрицитоплазматического белка D, протективного поверхностного белкового антигена SPA (род *Rickettsia*, риккетсиозная инфекция); белков наружной мембраны OM, антигена клеточной поверхности OmpA, антигена клеточной поверхности OmpB (sca5), белка клеточной поверхности SCA4, белка клеточной поверхности SCA1, внутрицитоплазматического белка D (*Rickettsia akari*, везикулезный риккетсиоз); гликопротеина оболочки GP, полимеразы L, нуклеопротеина N, неструктурного белка NSS (вирус лихорадки Рифт-Валли, лихорадка Рифт-Валли (RVF)); белков наружной мембраны OM, антигена клеточной поверхности OmpA, антигена клеточной поверхности OmpB (sca5), белка клеточной поверхности SCA4, белка клеточной поверхности SCA1, внутрицитоплазматического белка D (*Rickettsia rickettsii*, пятнистая лихорадка Скалистых гор (RMSF)); неструктурного белка 6 NS6, неструктурного белка 2 NS2, белка промежуточного слоя капсида VP6, белка внутреннего слоя капсида VP2, неструктурного белка 3 NS3, РНК-зависимой РНК-полимеразы L, белка VP3, неструктурного белка 1 NS1, неструктурного белка

5 NS5, гликопротеина наружного слоя капсида VP7, неструктурного гликопротеина 4 NS4, белка наружного слоя капсида VP4 (ротавирус, ротавирусная инфекция); полипротеина P200, гликопротеина E1, гликопротеина E2, белка NS2, капсидного белка С (вирус краснухи, краснуха); шаперонина GroEL (MorA), инозитолфосфатфосфатазы SopB, белка теплового шока HslU, белка-шаперона DnaJ, белка TviB, белка IroN, флагеллина FlhC, белка SipC, ассоциированного с инвазией, гликопротеина gp43, белка наружной мембраны LamB, белка наружной мембраны PagC, белка наружной мембраны TolC, белка наружной мембраны NmpC, белка наружной мембраны FadL, транспортного белка SadA, трансферазы WgaP, эффекторных белков SifA, SteC, SseL, SseJ и SseF (род *Salmonella*, сальмонеллез); белка 14, неструктурного белка NS7b, неструктурного белка NS8a, белка 9b, белка 3a, нуклеопротеина N, неструктурного белка NS3b, неструктурного белка NS6, белка 7a, неструктурного белка NS8b, мембранного белка M, малого мембранного белка оболочки EsM, полипротеина репликазы 1a, гликопротеина шиповидных отростков S, полипротеина репликазы 1ab (SARS-ассоциированный коронавирус, SARS (тяжелый острый респираторный синдром)); сериновой протеазы, атипичного антигена 1 *Sarcoptes* ASA1, глутатион-S-трансферазы GST, цистеиновой протеазы, сериновой протеазы, апополипротеина (*Sarcoptes scabiei*, чесотка); глутатион-S-трансферазы GST, парамиозина, гемоглобиназы SM32, главного антигена яиц, белка Sm14, связывающего жирные кислоты, размером 14 кДа, главного поверхностного антигена личинок P37, антигена тегумента размером 22,6 кДа, кальпаина CANP, трифосфатизомеразы Tim, поверхностного белка 9B, белка наружного слоя капсида VP2, интегрального мембранного белка Sm23 размером 23 кДа, Cu/Zn-содержащей супероксиддисмутазы, гликопротеина Grp, миокина (род *Schistosoma*, шистосомоз (бильгарциоз)); шаперонина размером 60 кДа, типоспецифического антигена размером 56 кДа, пируват-фосфатдикиназы, 4-гидроксibenзоатоктапренилтрансферазы (*Orientia tsutsugamushi*, кустарниковый тиф); дегидрогеназы GuaB, белка Spa32, ассоциированного с инвазией, инвазина IpaA, инвазина IpaB, инвазина IpaC, инвазина IpaD, инвазина IpaH, инвазина IpaJ (род *Shigella*, шигеллез (бациллярная дизентерия)); белка P53, гомолога белка вириона US10, регулятора транскрипции IE63, транскриптора транскрипции IE62, протеазы P33, белка транс-индуцирующего фактора альфа размером 74 кДа, дезоксиуридин-5'-трифосфатнуклеотидгидролазы, транскриптора транскрипции IE4, гомолога мембранного белка UL43, гомолога ядерного фосфопротеина UL3, гомолога ядерного белка UL4, белка, связывающегося в точке начала репликации, мембранного белка 2, фосфопротеина 32, белка 57, фактора процессивности ДНК-полимеразы, портового белка 54, ДНК-праймазы, гомолога белка тегумента UL14, гомолога белка тегумента UL21, гомолога белка тегумента UL55, гомолога субъединицы UL33 терминазы, состоящей из трех субъединиц, гомолога субъединицы UL15 терминазы, состоящей из трех субъединиц, белка 44, связывающегося с капсидом, упаковывающего белка вириона 43 (вирус ветряной оспы (VZV), опоясывающий герпес (опоясывающий лишай)); усеченного гомолога 3-бетагидрокси-5-енстероиддегидрогеназы, мембранного белка вириона A13, белка A19, белка A31, усеченного гомолога белка A35, гомолога белка A37.5, белка A47, белка A49, белка A51, семафориноподобного белка A43, ингибитора 1 сериновых протеиназ, ингибитора 2 сериновых протеиназ, ингибитора 3 сериновых протеиназ, белка A6, белка B15, белка C1, белка C5, белка C6, белка F7, белка F8, белка F9, белка F11, белка F14, белка F15, белка F16 (*Variola major* или *Variola minor*, натуральная оспа (черная оспа)); адгезина/гликопротеина gp70, протеаз (*Sporothrix schenckii*, споротрихоз); белка IsdB, связывающего железо гема, коллагенадгезина Spa, фактора слипания A ClfA, белка MecA, фибронектинсвязывающего белка A FnbA, энтеротоксина типа A EntA, энтеротоксина типа B EntB, энтеротоксина типа C EntC1, энтеротоксина типа C EntC2, энтеротоксина типа D EntD, энтеротоксина типа E EntE, токсина-1 TSST-1, вызывающего синдром токсического шока, стафилокиназы, пенициллинсвязывающего белка 2a PBP2a (MecA), секреторного антигена SssA (род *Staphylococcus*, пищевое отравление, вызываемое стафилококками); белка IsdB, связывающего железо гема, коллагенадгезина Spa, фактора слипания A ClfA, белка MecA, фибронектинсвязывающего белка A FnbA, энтеротоксина типа A EntA, энтеротоксина типа B EntB, энтеротоксина типа C EntC1, энтеротоксина типа C EntC2, энтеротоксина типа D EntD, энтеротоксина типа E EntE, токсина-1 TSST-1, вызывающего синдром токсического шока, стафилокиназы, пенициллинсвязывающего белка 2a PBP2a (MecA), секреторного антигена SssA (род *Staphylococcus*, например, *aureus*, стафилококковая инфекция); антигена Ss-IR, антигена NIE, стронгиластациона, Na⁺/K⁺-АТФазы Sseat-6, тропомиозина SsTmy-1, белка LEC-5, антигена P5 размером 41 кДа, белка личинок размером 41 кДа, белка личинок размером 31 кДа, белка личинок размером 28 кДа (*Strongyloides stercoralis*, стронгилоидоз); глицерофосфодиэфирфосфодиэстеразы GlpQ (Gpd), белка наружной мембраны TmpB, белка Trp92, антигена TrpF1, белка с повторами Trp, белка с повторами F TrpF, белка с повторами G TrpG, белка с повторами I TrpI, белка с повторами J TrpJ, белка с повторами K TrpK, мембранного белка A трепонемы TmpA, липопротеина, Tpp15 размером 15 кДа, мембранного антигена размером 47 кДа, миниферритина TrpF1, адгезина Trp0751, липопротеина TP0136, белка TrpN17, белка TrpN47, белка наружной мембраны TP0136, белка наружной мембраны TP0155, белка наружной мембраны TP0326, белка наружной мембраны TP0483, белка наружной мембраны TP0956 (*Treponema pallidum*, сифилис); катепсин-L-подобных протеаз, антигена размером 53/25 кДа, представителей семейства белков размером 8 кДа, белка цистиптерков TsAg5 с несущей трипсиноподобной активностью, белка онкосферы TSOL18, белка онкосферы TSOL4 5-1A, лактатдегидрогеназы A LDHA, лактатдегидрогеназы B LDHB (род *Taenia*, тениоз);

столбнячного токсина TetX, столбнячного токсина С TTC, белка S-слоя размером 140 кДа, бета-субъединицы флавопротеина CT3, фосфолипазы (лецитиназы), белка-переносчика фосфатной группы HPr (*Clostridium tetani*, столбняк (тризм)); геномного полипротеина, белка E, белка M, капсидного белка C (вирус клещевого энцефалита (TBEV), клещевой энцефалит); антигена размером 58 кДа, антигенов размером 68 кДа, экскреторно-секреторного антигена личинок Тохосага TES, гликопротеина размером 32 кДа, гликопротеина TES-70, гликопротеина GP31, экскреторно-секреторного антигена TcES-57, антигена околокишечной жидкости Pe, растворимых экстрагируемых антигенов Ex, экскреторно-секреторных антигенов личинок ES, антигена TES-120, полипротеи нового аллергена TBA-1, катепсин-L-подобной цистеиновой протеазы s-cpl-1, белка размером 26 кДа (Тохосага canis или Тохосага cati, токсокароз (глазная форма синдрома "блуждающей личинки" (OLM) и висцеральная форма синдрома "блуждающей личинки" (VLM))); белков микронем (MIC1, MIC2, MIC3, MIC4, MIC5, MIC6, MIC7, MIC8), белка роптрий Rop2, белков роптрий (Rop1, Rop2, Rop3, Rop4, Rop5, Rop6, Rop7, Rop16, Rop17), белка SR1, поверхностного антигена P22, главного антигена р24, главного поверхностного антигена р30, белков плотных гранул (GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8, GRA9, GRA10), антигена размером 28 кДа, поверхностного антигена SAG1, антигена, родственного SAG2, нуклеозидтрифосфатазы 1, нуклеозидтрифосфатазы 2, белка Stt3, белка, содержащего HesB-подобный домен, ромбовидной протеазы 5, токсомепсина 1 (*Toxoplasma gondii*, токсоплазмоз); секретируемого гликопротеина размером 43 кДа, секретируемого гликопротеина размером 53 кДа, парамиозина, антигена Ts21, антигена Ts87, антигена р46000, антигенов TSL-1, кавеолина-1 CAV-1, антигена новорожденных личинок размером 49 кДа, гомолога просапозина, сериновой протеазы, ингибитора сериновых протеиназ, гликопротеина Gr45 размером 45 кДа (*Trichinella spiralis*, трихинеллез); Myb-подобных факторов транскрипции (Myb1, Myb2, Myb3), адгезивного белка AP23, адгезивного белка AP33, адгезивного белка AP33-3, адгезинов AP51, адгезина AP65, адгезивного белка AP65-1, альфа-актинаина, белка, ассоциированного с кинезином, теневина, протеиназы размером 62 кДа, субтилизиноподобной сериновой протеазы SUB1, гена 3 цистеиновой протеиназы CP3, альфа-енолазы Enol, цистеиновой протеиназы CP30, белков теплового шока (Hsp70, Hsp60), иммуногенного белка P270 (*Trichomonas vaginalis*, трихомоноз); бета-тубулина, белка размером 47 кДа, секреторной протеиназы-1 SLP-1, подобной протеиназе лейкоцитов, белка TT50 размером 50 кДа, антигена размером 17 кДа, белка размером 43/47 кДа (*Trichuris trichiura*, трихоцефалез (инфекция, вызываемая власоглавом)); белка ESAT-6 (EsxA), фильтруемого антигена EsxB размером 10 кДа, секретируемого антигена 85-B FBPB, фибронектинсвязывающего белка A FbpA (Ag85A), сериновой протеазы PerA, белка семейства PPE PPE18, фибронектинсвязывающего белка D FbpD, иммуногенного белка MPT64, секретируемого белка MPT51, каталазы-пероксидазы-пероксинитридазы T KATG, периплазматического фосфатсвязывающего липопротеина PSTS3 (PBP-3, Phos-1), гепаринсвязывающего гемагглютинина Hbha, регулируемого железом, белка семейства PPE PPE14, белка семейства PPE PPE68, белка Mtb72F, белка Ara, иммуногенного белка MPT63, периплазматического фосфатсвязывающего липопротеина PSTS1 (PBP-1), молекулярного шаперона DnaK, липопротеина клеточной поверхности Mpt83, липопротеина P23, белка пермеазы системы транспорта фосфатов pstA, антигена размером 14 кДа, фибронектинсвязывающего белка C FbpC1, аланиндегидрогеназы TB43, глутаминсинтетазы 1, белка ESX-1, белка CFP10, белка TB10.4, белка MPT83, белка MTB12, белка MTB8, Rpf-подобных белков, белка MTB32, белка MTB39, кристаллина, белка теплового шока HSP65, белка PST-S (обычно *Mycobacterium tuberculosis*, туберкулез); белка наружной мембраны FobA, белка наружной мембраны FobB, локуса внутриклеточного роста IglC1, локуса внутриклеточного роста IglC2, аминотрансферазы WbtI, шаперонина GroEL, главного мембранного белка TUL4 размером 17 кДа, липопротеина LpnA, белка семейства хитиназ 18, изоцитратдегидрогеназы, белка семейства Nif3, белка, отвечающего за гликозилирование пилей IV типа, белка наружной мембраны tolC, белка семейства FAD-связывающих белков, мультимерного белка наружной мембраны пилей IV типа, двухкомпонентного рецепторного белка KdpD, белка-шаперона DnaK, белка TolQ (*Francisella tularensis*, туляремия); антигена MB, уреазы, белка GytA, белка GytB, белка PagC, белка PagE, мембранных белков LAMP, ассоциированных с липидами, тимидинкиназы TK, фосфолипазы PL-A1, фосфолипазы PL-A2, фосфолипазы PL-C, антигена размером 96 кДа, экспрессируемого на поверхности клеток (*Ureaplasma urealyticum*, инфекция, вызываемая *Ureaplasma urealyticum*); неструктурного полипротеина, структурного полипротеина, капсидного белка CP, белка E1, белка E2, белка E3, протеазы P1, протеазы P2, протеазы P3 (вирус венесуэльского энцефалита лошадей, венесуэльский энцефалит лошадей); гликопротеина GP, белка матрикса Z, полимеразы L, нуклеопротеина N (вирус Гуанарито, венесуэльская геморрагическая лихорадка); полипротеина, белка E, белка M, капсидного белка C, протеазы NS3, белка NS1, белка NS2A, белка AS2B, белка NS4A, белка NS4B, белка NS5 (вирус лихорадки Западного Нила, лихорадка Западного Нила); капсидного белка CP, белка E1, белка E2, белка E3, протеазы P2 (вирус западного энцефалита лошадей, западный энцефалит лошадей); геномного полипротеина, белка E, белка M, капсидного белка C, протеазы NS3, белка NS1, белка NS2A, белка AS2B, белка NS4A, белка NS4B, белка NS5 (вирус желтой лихорадки, желтая лихорадка); предполагаемого нацеливающегося белка Yop YobB, эффекторного белка YopD, эффекторного белка YopE, белка YopH, эффекторного белка YopJ, транслокационного белка YopK, эффекторного белка YopT, белка YpkA, белка FlhA, отвечающего за биосинтез жгутиков, пептидазы M48, белка системы эффлюкса ионов калия KefA, регулято-

ра транскрипции RovA, адгезина Ifp, транслокаторного белка LcrV, белка PcrV, инвазина Inv, белка наружной мембраны, представляющего собой OmpF-подобный порин, адгезина YadA, протеинкиназы C, фосфолипазы C1, белка PsaA, белка WbyK, подобного маннозилтрансферазе, белка YscU, антигена YpMa (*Yersinia pseudotuberculosis*, инфекция, вызываемая *Yersinia pseudotuberculosis*); эффекторного белка YopB, шаперонина размером 60 кДа, белка WbcP, протеинтирозинфосфатазы YopH, белка YopQ, энтеротоксина, галактозидпермеазы, редуктазы NrdE, белка YasN, инвазина Inv, адгезина YadA, порина наружной мембраны F OmpF, белка UspA1, белка EibA, белка Hia, белка клеточной поверхности Ail, шаперона SycD, белка LcrD, белка LcrG, белка LcrV, белка SycE, белка YopE, регуляторного белка TyeA, белка YopM, белка YopN, белка YopO, белка YopT, белка YopD, протеазы ClpP, белка MyfA, белка FilA и белка PsaA (*Yersinia enterocolitica*, иерсиниоз).

В круглых скобках в предыдущем разделе указаны конкретный патоген или семейство патогенов, из которых получен(получены) антиген(антигены), и инфекционное заболевание, с которым ассоциирован данный патоген.

Вирус гриппа.

В особенно предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения соединение мРНК содержит последовательность мРНК, содержащую кодирующую область, которая кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), белка матрикса 1 (M1), белка матрикса 2 (M2), неструктурного белка 1 (NS1), неструктурного белка 2 (NS2), белка ядерного экспорта (NEP), кислого полимеразного белка (PA), основного полимеразного белка PB1, PB1-F2 или основного полимеразного белка 2 (PB2) вируса гриппа, или его фрагмент или вариант.

В данном контексте аминокислотная последовательность по меньшей мере одного антигенного пептида или белка может быть выбрана из любого пептида или белка, полученного из гемагглютинина (HA), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), белка матрикса 1 (M1), белка матрикса 2 (M2), неструктурного белка 1 (NS1), неструктурного белка 2 (NS2), белка ядерного экспорта (NEP), кислого полимеразного белка (PA), основного полимеразного белка PB1, PB1-F2 или основного полимеразного белка 2 (PB2) вируса гриппа или их фрагмента или варианта, или из любого пептида или белка вируса гриппа, сконструированного синтетическим путем.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кодирующая область кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA) вируса гриппа, или его фрагмент или вариант. В данном контексте гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) могут быть выбраны из одного и того же вируса гриппа или из разных вирусов гриппа.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая область кодировала по меньшей мере один полноразмерный белок гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), белок матрикса 1 (M1), белок матрикса 2 (M2), неструктурный белок 1 (NS1), неструктурный белок 2 (NS2), белок ядерного экспорта (NEP), кислый полимеразный белок (PA), основной полимеразный белок PB1, PB1-F2 или основной полимеразный белок 2 (PB2) вируса гриппа или его вариант.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере одна кодирующая область кодирует по меньшей мере один полноразмерный белок гемагглютинин (HA) и/или по меньшей мере один полноразмерный белок нейраминидазу (NA) вируса гриппа или его вариант.

Термин "полноразмерный белок", используемый в данном документе, как правило, относится к белку, который фактически содержит целую аминокислотную последовательность белка, встречающегося в природе. Термин "полноразмерный белок", используемый в данном документе, предпочтительно относится к полноразмерной последовательности белка, указанной в перечне последовательностей настоящего изобретения, т.е. к аминокислотной последовательности, определенной под любым из SEQ ID NO, перечисленных в перечне последовательностей (SEQ ID NO: 1-30504, или SEQ ID NO: 224269, или SEQ ID NO: 224309), или к аминокислотной последовательности, представленной в базе данных под соответствующим номером доступа в базе данных.

Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению.

В данном контексте дополнительно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая последовательность последовательности мРНК согласно настоящему изобретению кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из

белка гемагглютинина (HA) вируса гриппа А; или белка гемагглютинина (HA) вируса гриппа В; или белка нейраминидазы (NA) вируса гриппа А; или белка нейраминидазы (NA) вируса гриппа В; или его фрагмент или вариант, где белок гемагглютинин (HA) вируса гриппа А, или белок гемагглютинин (HA) вируса гриппа В, или белок нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, или белок нейраминидазы (NA) вируса гриппа В выбраны из белков гемагглютининов (HA) или белков нейраминидаз (NA), перечисленных в перечне последовательностей настоящего изобретения.

В перечне последовательностей раскрыты все белки гемагглютинины (HA) вируса гриппа А или гриппа В и все белки нейраминидазы (NA) вируса гриппа А или гриппа В, которые являются предпочти-

тельными в настоящем изобретении. Каждый предпочтительный антигенный пептид или белок и кодирующая его последовательность могут быть идентифицированы с помощью элемента данных, показанного с числовым идентификатором <223>. Другими словами, каждая предпочтительная последовательность гемагглютиниона (НА) или нейраминидазы (НА) вируса гриппа А или В может быть идентифицирована по конкретному номеру доступа в базе данных (т.е. № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank) путем прочтения записей в перечне последовательностей с числовым идентификатором <223>.

Если говорить в целом, каждая предпочтительная последовательность описана под своим номером доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank, который в свою очередь описан семью различными предпочтительными SEQ ID NO в перечне последовательностей (белок, нуклеиновая кислота дикого типа, оптимизированные нуклеиновые кислоты 1-5). Это видно для числового идентификатора <223>.

Т.е. первая последовательная запись конкретного № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank в перечне последовательностей с числовым идентификатором <223> указывает на SEQ ID NO, который соответствует соответствующей аминокислотной последовательности (т.е. SEQ ID NO последовательности белка дикого типа).

В дополнение, вторая последовательная запись № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank в перечне последовательностей с числовым идентификатором <223> соответствует последовательности нуклеиновой кислоты мРНК дикого типа, кодирующей белок (т.е. SEQ ID NO нуклеотидной последовательности дикого типа).

В дополнение, в следующих пяти последовательных записях № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank в перечне последовательностей с числовым идентификатором <223> представлены SEQ ID NO, соответствующие пяти различным модифицированным/оптимизированным последовательностям нуклеиновых кислот относительно последовательностей, описанных в данном документе, которые кодируют белок, предпочтительно имеющий аминокислотную последовательность, определенную первой последовательной записью конкретного № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank в перечне последовательностей (т.е. SEQ ID NO оптимизированных нуклеотидных последовательностей).

Соответственно, ссылка на конкретный № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank эквивалентна ссылке на блок из семи последовательностей, описанных выше (белок=1, нуклеиновая кислота=2, оптимизированные последовательности=3-7).

Одним примером может быть первый № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank, который указан в перечне последовательностей, т.е. под SEQ ID NO: 1 с числовым идентификатором <223> AAA16879. Если провести поиск по № доступа AAA16879 во всем перечне последовательностей, то будет видно, что, как описано выше, с этим № доступа связаны семь SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 32013, SEQ ID NO: 64025, SEQ ID NO: 96037, SEQ ID NO: 128049, SEQ ID NO: 160061 и SEQ ID NO: 192073.

В соответствии с приведенным выше пояснением

для SEQ ID NO: 1 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная последовательность белка (wt) гемагглютиниона вируса гриппа AAAA16879";

для SEQ ID NO: 32013 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная CDS-последовательность (wt) гемагглютиниона вируса гриппа AAAA16879";

для SEQ ID NO: 64025 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная CDS-последовательность (opt1) гемагглютиниона вируса гриппа AAAA16879";

для SEQ ID NO: 96037 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная CDS-последовательность (opt2) гемагглютиниона вируса гриппа AAAA16879";

для SEQ ID NO: 128049 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная CDS-последовательность (opt3) гемагглютиниона вируса гриппа AAAA16879";

для SEQ ID NO: 160061 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная CDS-последовательность (opt4) гемагглютиниона вируса гриппа AAM16879"; и

для SEQ ID NO: 192073 числовой идентификатор <223> прочитывается как "производная и/или модифицированная CDS-последовательность (opt5) гемагглютиниона вируса гриппа AAM16879".

Следовательно, ссылка на AM16879 эквивалентна ссылке на семь последовательностей, описанных выше (белок=1-я последовательность, нуклеиновая кислота=2-я последовательность, пять различных оптимизированных последовательностей=3-я - 7-я последовательности).

Вторым примером может быть второй № доступа белка или нуклеиновой кислоты в GenBank, который указан в перечне последовательностей, т.е. под SEQ ID NO: 2 с числовым идентификатором <223> "AAA16880". С № доступа AAA16880 связаны такие семь последовательностей в перечне последовательностей: SEQ ID NO: 2 (белок), 32014 (нуклеиновая кислота дикого типа), 64026 (оптимизированная последовательность 1), 96038 (оптимизированная последовательность 2), 128050 (оптимизированная последовательность 3), 160062 (оптимизированная последовательность 4) и 192074 (оптимизированная последовательность 5). Соответственно, ссылка на AAA16880 соответствует ссылке на семь последовательностей, описанных выше.

Дополнительную иллюстрацию данного обстоятельства можно увидеть на иллюстративных фиг. 20-24, на которых показана структура перечня последовательностей с приведением в качестве примера

белков гемагглютининов (НА) и белков нейраминидаз (НА) вирусов гриппа А и В и гликопротеинов вируса бешенства:

- иллюстративные белки гемагглютинины (НА) вируса гриппа А (фиг. 20);
- иллюстративные белки гемагглютинины (НА) вируса гриппа В (фиг. 21);
- иллюстративные белки нейраминидазы (НА) вируса гриппа А (фиг. 22);
- иллюстративные белки нейраминидазы (НА) вируса гриппа В (фиг. 23);
- иллюстративные гликопротеины вируса бешенства (фиг. 24).

В данном документе делается ссылка на содержание фиг. 20-24 из РСТ/ЕР2016/075843, поданной 26 октября 2016 г., т.е. заявки, приоритетной по отношению к настоящей международной заявке на патент, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления пептид или белок вируса гриппа получен из (штамма) вируса гриппа А, В или С.

Вирус гриппа А может быть выбран из вирусов гриппа А, характеризующихся наличием гемагглютиниона (НА), выбранного из группы, состоящей из Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н6, Н7, Н8, Н9, Н10, Н11, Н12, Н13, Н14, Н15, Н16, Н17 и Н18. Вирус гриппа А предпочтительно выбран из вируса гриппа, характеризующегося наличием гемагглютиниона (НА), выбранного из группы, состоящей из Н1, Н3, Н5 или Н9.

Кроме того, особенно предпочтительными являются вирусы гриппа А, характеризующиеся наличием нейраминидазы (НА), выбранной из группы, состоящей из Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н6, Н7, Н8, Н9, Н10 и Н11. Вирус гриппа А наиболее предпочтительно характеризуется наличием нейраминидазы (НА), выбранной из группы, состоящей из Н1, Н2 и Н8.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления вирус гриппа А выбран из группы, состоящей из Н1Н1, Н1Н2, Н2Н2, Н3Н1, Н3Н2, Н3Н8, Н5Н1, Н5Н2, Н5Н3, Н5Н8, Н5Н9, Н7Н1, Н7Н2, Н7Н3, Н7Н4, Н7Н7, Н7Н9, Н9Н2, Н10Н8 и Н10Н7, предпочтительно из Н1Н1, Н3Н2, Н5Н1 и Н5Н8.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютиниона (НА), и/или по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А, выбранного из группы, состоящей из Н1Н1, Н1Н2, Н2Н2, Н3Н1, Н3Н2, Н3Н8, Н5Н1, Н5Н2, Н5Н3, Н5Н8, Н5Н9, Н7Н1, Н7Н2, Н7Н3, Н7Н4, Н7Н7, Н7Н9, Н9Н2, Н10Н8 и Н10Н7, предпочтительно из Н1Н1, Н3Н2, Н5Н1, Н5Н8, или их фрагмент или вариант.

В контексте настоящего изобретения фрагмент белка или его вариант, кодируемый по меньшей мере одной кодирующей областью последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением, может, как правило, содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью соответствующего встречающегося в природе полноразмерного белка или его варианта, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 1-30504.

В конкретных вариантах осуществления антигенный пептид или белок получен из белка гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 1-14031.

В данном контексте дополнительно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая последовательность последовательности мРНК согласно настоящему изобретению кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А, или его фрагмент или вариант, где белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа А выбран из белков гемагглютининов (НА), перечисленных в перечне последовательностей (см. SEQ ID NO: 1-32012, или SEQ ID NO: 224269, или SEQ ID NO: 224309 и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"). В данном случае каждый гемагглютинин (НА) идентифицируется по номеру доступа соответствующего белка в базе данных (см. числовой идентификатор <223> в перечне последовательностей, который указывает на № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)). При дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующий SEQ ID NO, под которым показан указанный № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) с числовым идентификатором <223>, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты мРНК дикого типа, кодирующей указанный белок. При продолжающемся дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующие пять SEQ ID NO, под которыми показаны соответствующие № доступа белка или нуклеиновой кислоты с числовым идентификатором <223>, соответствуют пяти модифицированным/оптимизированным последовательностям нуклеиновой кислоты мРНК, описанным в данном документе, которые кодируют белок, предпочтительно имеющий соответствующую аминокислотную последовательность, указанную ранее (в первой записи, имеющей соответствующий № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)).

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие последовательности бел-

ков НА:

белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) (SEQ ID NO: 13861-13871);

белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1) (SEQ ID NO: 13859-13860); белок НА вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (SEQ ID NO: 13853-13856); белок НА вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1) (SEQ ID NO: 13848-13850); белок НА вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) (SEQ ID NO: 13836-13844); белок НА вируса гриппа А/Мичиган/45/2015 (H1N1) (SEQ ID NO: 13845-13847).

В конкретных вариантах осуществления антигенный пептид или белок получен из белка гемагглютинина (НА) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 26398-28576.

В данном контексте дополнительно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая последовательность последовательности мРНК согласно настоящему изобретению кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка гемагглютинина (НА) вируса гриппа В, или его фрагмент или вариант, где белок гемагглютинин (НА) вируса гриппа В выбран из белков гемагглютининов (НА), перечисленных в перечне последовательностей (см. SEQ ID NO: 1-32012, или SEQ ID NO: 224269, или SEQ ID NO: 224309 и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"). В данном случае каждый гемагглютинин (НА) идентифицируется по номеру доступа соответствующего белка в базе данных (см. числовой идентификатор <223> в перечне последовательностей, который указывает на № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)). При дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующий SEQ ID NO, под которым показан указанный № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) с числовым идентификатором <223>, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты мРНК дикого типа, кодирующей указанный белок. При продолжающемся дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующие пять SEQ ID NO, под которыми показаны соответствующие № доступа белка или нуклеиновой кислоты с числовым идентификатором <223>, соответствуют пяти модифицированным/оптимизированным последовательностям нуклеиновой кислоты мРНК, описанным в данном документе, которые кодируют белок, предпочтительно имеющий соответствующую аминокислотную последовательность, указанную ранее (в первой записи, имеющей соответствующий № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)). Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие последовательности белков НА:

белок НА вируса гриппа В/Пхукет/3037/2013 (EPI540671; SEQ ID NO: 28530-28532);

белок НА вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (SEQ ID NO: 28524-28529).

В дополнительных конкретных вариантах осуществления антигенный пептид или белок получен из белка нейраминидазы (НА) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 14032-26397, 224309 или 224310.

В данном контексте дополнительно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая последовательность последовательности мРНК согласно настоящему изобретению кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка нейраминидазы (НА) вируса гриппа А, или его фрагмент или вариант, где белок нейраминидаза (НА) вируса гриппа А выбран из белков нейраминидаз (НА), перечисленных в перечне последовательностей (см. SEQ ID NO: 1-32012, или SEQ ID NO: 224269, или SEQ ID NO: 224309 и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"). В данном случае каждая нейраминидаза (НА) идентифицируется по номеру доступа соответствующего белка в базе данных (см. числовой идентификатор <223> в перечне последовательностей, который указывает на № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)). При дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующий SEQ ID NO, под которым показан указанный № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) с числовым идентификатором <223>, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты мРНК дикого типа, кодирующей указанный белок. При продолжающемся дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующие пять SEQ ID NO, под которыми показаны соответствующие № доступа белка или нуклеиновой кислоты с числовым идентификатором <223>, соответствуют пяти модифицированным/оптимизированным последовательностям нуклеиновой кислоты мРНК, описанным в данном документе, которые кодируют белок, предпочтительно имеющий соответствующую аминокислотную последовательность, указанную ранее (в первой записи, имеющей соответствующий № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)).

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие последовательности белков НА: белок НА вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2): SEQ ID NO: 26251-26254; белок НА вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09: SEQ ID NO: 26238-26243; белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1): SEQ ID NO: 224310; белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1): SEQ ID NO: 26255-26257; белок НА вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1): SEQ ID NO: 26246-26250; белок НА вируса гриппа А/Мичиган/45/2015 (H1N1) (SEQ ID NO: 26244-26245).

В дополнительных конкретных вариантах осуществления антигенный пептид или белок получен из

белка нейраминидазы (NA) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 28577-30504.

В данном контексте дополнительно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая последовательность последовательности мРНК согласно настоящему изобретению кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка нейраминидазы (NA) вируса гриппа В, или его фрагмент или вариант, где белок нейраминидаза (NA) вируса гриппа В выбран из белков нейраминидаз (NA), перечисленных в перечне последовательностей (см. SEQ ID NO: 1-32012, или SEQ ID NO: 224269, или SEQ ID NO: 224309 и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"). В данном случае каждая нейраминидаза (NA) идентифицируется по номеру доступа соответствующего белка в базе данных (см. числовой идентификатор <223> в перечне последовательностей, который указывает на № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)). При дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующий SEQ ID NO, под которым показан указанный № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) с числовым идентификатором <223>, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты мРНК дикого типа, кодирующей указанный белок. При продолжающемся дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующие пять SEQ ID NO, под которыми показаны соответствующие № доступа белка или нуклеиновой кислоты с числовым идентификатором <223>, соответствуют пяти модифицированным/оптимизированным последовательностям нуклеиновой кислоты мРНК, описанным в данном документе, которые кодируют белок, предпочтительно имеющий соответствующую аминокислотную последовательность, указанную ранее (в первой записи, имеющей соответствующий № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)).

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие последовательности белков NA: белок NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008: SEQ ID NO: 30455-30460; белок NA вируса гриппа В/Пхукет/3037/2013: SEQ ID NO: 30461-30462.

Кроме того, в данном контексте кодирующая область, кодирующая по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA) вируса гриппа, или его фрагмент, вариант или производное, может быть выбрана из любой последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую область, кодирующую гемагглютинин (HA) или нейраминидазу (NA), полученные из любого изолята вируса гриппа, или их фрагмент или вариант.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении, таким образом, представлена последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область, кодирующая гемагглютинин (HA) вируса гриппа А, содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей (т.е. SEQ ID NO: 32013-46043; 64025-78055, 224085-224106, 96037-110067, 128049-142079, 160061-174091, 192073-206103; см. пояснение выше и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"), или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержала по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гемагглютинин (HA) вируса гриппа А, содержащую последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК, раскрытым в перечне последовательностей, см. пояснение выше и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению" (SEQ ID NO: 32013-46043; 64025-78055, 224085-224106, 96037-110067, 128049-142079, 160061-174091, 192073-206103), или ее фрагмент или вариант.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гемагглютинин (HA) вируса гриппа А, содержащую последовательность РНК, выбранную из следующих последовательностей РНК:

мРНК, кодирующей белок HA вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 45873-45883, 77885-77895, 109897-109907, 141909-141919, 173921-173931, 205933-205943;

мРНК, кодирующей белок HA вируса гриппа А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 45871, 45872, 77883, 77884, 109895, 109896, 141907, 141908, 173919, 173920, 205931, 205932;

мРНК, кодирующей белок HA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 45865-45868, 77877-77877, 109889-109889, 141901-141901, 173913-173913, 205925-205925;

мРНК, кодирующей белок HA вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 45860-45862, 77872-77874, 109884-109886, 173908-173910, 205920-205922;

мРНК, кодирующей белок HA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 45848-45856, 77860-77868, 109872-109880, 141884-141892, 173896-173904, 205908-205916;

мРНК, кодирующей белок НА вируса гриппа А/Мичиган/45/2015 (H1N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 45857-45859, 77869-77871, 109881-109883, 141893-141895, 173905-173907, 205917-205919.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении, таким образом, представлена последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область, кодирующая гемагглютинин (НА) вируса гриппа В, содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 2 или на фиг. 21 в РСТ/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 58410-60588, 90422-92600, 224107-224112, 122434-124612, 154446-156624, 186458-188636, 218470-220648, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержала по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гемагглютинин (НА) вируса гриппа В, содержащую последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК, раскрытым в перечне последовательностей, имеющим числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 2 или на фиг. 21 в РСТ/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 58410-60588, 90422-92600, 224107-224112, 122434-124612, 154446-156624, 186458-188636, 218470-220648, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гемагглютинин (НА) вируса гриппа В, содержащую последовательность РНК, выбранную из следующих последовательностей РНК:

мРНК, кодирующей белок НА вируса гриппа В/Пхукет/3037/2013, предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 60542-60544, 92554-92556, 124566-124568, 156578-156580, 188590-188592, 220602-220604;

мРНК, кодирующей белок НА вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (GI: 223950973; FJ766840.1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 60536-60541, 92548-92553, 124560-124565, 156572-156577, 188584-188589, 220596-220601.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении, таким образом, представлена последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область, кодирующая нейраминидазу (НА) вируса гриппа А, содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 3 или на фиг. 22 в РСТ/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 46044-58409, 224311, 224312, 78056-90421, 224113, 224313-224317, 110068-122433, 142080-154445, 174092-186457, 206104-218469, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержала по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую нейраминидазу (НА) вируса гриппа А, содержащую последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК, раскрытым в перечне последовательностей, имеющим числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 3 или на фиг. 22 в РСТ/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 46044-58409, 224311, 224312, 78056-90421, 224113, 224313-224317, 110068-122433,

142080-154445, 174092-186457, 206104-218469, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую нейраминидазу (NA) вируса гриппа А, содержащую последовательность РНК, выбранную из следующих последовательностей РНК:

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2): SEQ ID NO: 58263-58266, 90275-90278, 122287-122290, 154299-154302, 186311-186314, 218323-218326;

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09: SEQ ID NO: 58250-58255, 90262-90267, 122274-122279, 154286-154291, 186298-186303, 218310-218315;

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1): SEQ ID NO: 224312;

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1): SEQ ID NO: 58267-58269, 90279-90281, 122291-122293, 154303-154305, 186315-186317, 218327-218329;

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа А/Мичиган/45/2015 (H1N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 58256-58257, 90268-90269, 122280-122281, 154292-154293, 186304-186305, 218316-218317;

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 58258-58262, 90270-90274, 122282-122286, 154294-154298, 186306-186310, 218318-218322.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении, таким образом, представлена последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область, кодирующая нейраминидазу (NA) вируса гриппа В, содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 4 или на фиг. 23 в РСТ/ЕР2016/075843, под SEQ ID NO: 60589-62516, 92601-94528, 124613-126540, 156625-158552, 188637-190564, 220649-222576, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержала по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую нейраминидазу (NA) вируса гриппа В, содержащую последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК, раскрытым в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 4 или на фиг. 23 в РСТ/ЕР2016/075843, под SEQ ID NO: 60589-62516, 92601-94528, 124613-126540, 156625-158552, 188637-190564, 220649-222576, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую нейраминидазу (NA) вируса гриппа В, содержащую последовательность РНК, выбранную из следующих последовательностей РНК:

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (GI: 223950973; FJ766840.1): SEQ ID NO: 62467-62472, 94479-94484, 126491-126496, 158503-158508, 190515-190520, 222527-222532;

мРНК, кодирующей белок NA вируса гриппа В/Пхукет/3073/2013: SEQ ID NO: 62473-62474, 94485-94486, 126497-126498, 158509-158510, 190521-190522, 222533-222534.

Вирус бешенства.

В особенно предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G вируса бешенства, или его фрагмент или вариант.

В данном контексте аминокислотная последовательность по меньшей мере одного антигенного пептида или белка может быть выбрана из любого пептида или белка, полученного из гликопротеина вируса бешенства или его фрагмента или варианта, или из любого пептида или белка вируса бешенства, сконструированного синтетическим путем.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кодирующая область кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, или его фрагмент или вариант.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая область кодировала по меньшей мере один полноразмерный белок гликопротеин вируса бешенства или его вариант.

Термин "полноразмерный белок", используемый в данном документе, предпочтительно относится к полноразмерной последовательности белка, указанной в перечне последовательностей настоящего изобретения. Более предпочтительно, термин "полноразмерный белок" предпочтительно относится к аминокислотной последовательности, определенной под любым из SEQ ID NO, перечисленных в перечне последовательностей (SEQ ID NO: 30505-32012), или к аминокислотной последовательности, представленной в базе данных под соответствующим номером доступа в базе данных.

В данном контексте дополнительно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая последовательность последовательности мРНК согласно настоящему изобретению кодировала по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, где гликопротеин вируса бешенства выбран из белков гликопротеинов вируса бешенства, перечисленных в перечне последовательностей (см. SEQ ID NO: 1-32012, или SEQ ID NO: 224269, или SEQ ID NO: 224309 и пояснение в разделе "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"). В данном случае каждый гликопротеин вируса бешенства идентифицируется по номеру доступа соответствующего белка в базе данных (см. числовой идентификатор <223> в перечне последовательностей, который указывает на № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)). При дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующий SEQ ID NO, под которым показан указанный № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) с числовым идентификатором <223>, соответствует последовательности нуклеиновой кислоты мРНК дикого типа, кодирующей указанный белок. При продолжающемся дальнейшем поиске по соответствующему № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank) в перечне последовательностей следующие пять SEQ ID NO, под которыми показаны соответствующие № доступа белка или нуклеиновой кислоты с числовым идентификатором <223>, соответствуют пяти модифицированным/оптимизированным последовательностям нуклеиновой кислоты мРНК, описанным в данном документе, которые кодируют белок, предпочтительно имеющий соответствующую аминокислотную последовательность, указанную ранее (в первой записи, имеющей соответствующий № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank)).

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие последовательности гликопротеинов: SEQ ID NO: 31986, 31073, 31102.

Кроме того, в данном контексте кодирующая область, кодирующая по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, или его фрагмент, вариант или производное, может быть выбрана из любой последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую область, кодирующую гликопротеин, полученный из любого изолята вируса бешенства, или его фрагмент или вариант.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении, таким образом, представлена последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область, кодирующая гликопротеин вируса бешенства, содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей (см. пояснение выше, предпочтительно под SEQ ID NO: 62517-64024; 224270, 224274, 94529-96036, 224271-224273, 126541-128048, 158553-160060, 190565-192072, 222577-224084), или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержала по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гликопротеин, полученный из любого вируса бешенства, содержащую последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК, раскрытым в перечне последовательностей (см. пояснение выше; предпочтительно под SEQ ID NO: 62517-64024; 224270, 224274, 94529-96036, 224271-224273, 126541-128048, 158553-160060, 190565-192072, 222577-224084), или ее фрагмент или вариант.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гликопротеин вируса бешенства (RABV-G), содержащую последовательность РНК, выбранную из следующих последовательностей РНК:

мРНК, кодирующей гликопротеин вируса бешенства (пастеровского штамма), предпочтительно последовательностей мРНК в соответствии с SEQ ID NO: 63998, 96010, 128022, 160034, 192046, 224058.

Вирус Эбола.

Вирус Эбола. Эболавирусы и генетически родственные им марбургвирусы являются патогенами человека, которые вызывают тяжелые заболевания. Эболавирусы и марбургвирусы являются филовирусами, которые представляют собой оболочечные вирусы, содержащие геном в виде отрицательной нити РНК. Семейство Filoviridae включает три рода: Ebolavirus, Marburgvirus и Cuevavirus. Роды Cuevavirus, а также Marburgvirus включают только один вид, т.е. соответственно Lloviu cuevavirus (вирус Лловиу -

LLOV) и Marburg marburgvirus, который подразделяется на вирус Марбург (MARV) и вирус Равн (RAW). Род Ebolavirus включает пять известных видов, т.е. Bundibugyo ebolavirus (вирус Бундибуго - BDBV), Reston ebolavirus (вирус Рестон - RESTV), Sudan ebolavirus (суданский вирус - SUDV), Tai Forest ebolavirus (вирус леса Тай - TAFV) (=кот-д'ивуарский эболавирус) и Zaire ebolavirus (вирус Эбола - EBOV). Если кузавирусы были выделены из летучих мышей, и их потенциал в качестве патогенов людей остается неизвестным, то как эболавирусы, так и марбургвирусы являются патогенами человека, вызывающими соответственно эболавирусное заболевание (EVD) и марбургвирусное заболевание, характеризующиеся геморрагической лихорадкой и чрезвычайно высоким уровнем смертности. В контексте настоящего изобретения любой вирус, представитель вирусов, штамм вируса, тип вируса, подтип вируса, изолят вируса, вариант вируса, или серотип вируса, или генетический реассортант вируса, относящийся к вирусам из семейств и родов, перечисленных выше, или родственный им, или полученный из них, считается "вирусом Эбола".

В особенно предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина (GP), и/или белка матрикса 40 (VP40), и/или нуклеопротеина (NP) вируса рода Ebolavirus или Marburgvirus, или его фрагмент, вариант или производное.

В данном контексте аминокислотная последовательность по меньшей мере одного антигенного пептида или белка может быть выбрана из любого пептида или белка, полученного из гликопротеина (GP), и/или белка матрикса 40 (VP40), и/или нуклеопротеина (NP) вируса Эбола или их фрагмента или варианта, или из любого пептида или белка вируса Эбола, сконструированного синтетическим путем.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кодирующая область кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса Эбола, или его фрагмент или вариант. В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна кодирующая область кодировала по меньшей мере один полноразмерный белок гликопротеин вируса Эбола или его вариант.

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие аминокислотные последовательности гликопротеинов вируса Эбола: SEQ ID NO: 1-6 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В данном контексте SEQ ID NO: 1-6 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 1-6 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки.

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие аминокислотные последовательности VP40 вируса Эбола: SEQ ID NO: 7-12 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В данном контексте SEQ ID NO: 7-12 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 7-12 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки.

Особенно предпочтительными в данном контексте являются следующие аминокислотные последовательности NP вируса Эбола: SEQ ID NO: 13-18 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В данном контексте SEQ ID NO: 13-18 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 13-18 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении представлена последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область, кодирующая антигенный пептид или белок вируса Эбола, указанный в данном документе, содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 20-27 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагментов или вариантов этих последовательностей или состоит из них. В данном контексте SEQ ID NO: 20-27 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 20-27 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую гликопротеин вируса Эбола. В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую VP40 вируса Эбола. В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую NP вируса Эбола.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую антигенный пептид или белок вируса Эбола, содержащую последовательность РНК, выбранную из следующих последовательностей РНК:

мРНК, кодирующей белок GP вируса Эбола: SEQ ID NO: 37-39 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В данном контексте SEQ ID NO: 37-39 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 37-39 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки;

мРНК, кодирующей VP40 вируса Эбола: SEQ ID NO: 40-42 из заявки на патент WO 2016097065 или

фрагменты или варианты этих последовательностей. В данном контексте SEQ ID NO: 40-42 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 40-42 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки;

мРНК, кодирующей NP вируса Эбола: SEQ ID NO: 43-44 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагменты или варианты этих последовательностей. В данном контексте SEQ ID NO: 43-44 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 43-44 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки.

Особенно предпочтительной является последовательность мРНК, содержащая кодирующую последовательность, кодирующую GP в соответствии с SEQ ID NO: 224362.

Опухолевые антигены/

Предпочтительно по меньшей мере одна кодирующая последовательность соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, кодирует опухолевый антиген, предпочтительно определенный в данном документе, или его фрагмент или вариант, где опухолевый антиген предпочтительно выбран из группы, состоящей из

1A01 HLA-A/m; 1A02; 5T4; ACRBP; AFP; AKAP4; альфа-актина-4/m; альфа-метилацил-кофермент-А-рацемазы; ANDR; ART-4; ARTC1/m; AURKB; B2MG; B3GN5; B4GN1; B7H4; BAGE-1; BASI; BCL-2; bcr/abl; бета-катенина/m; BING-4; BIRC7; BRCA1/m; BY55; кальретикулина; CAMEL; CASP-8/m; CASPA; катепсина B; катепсина L; CD1A; CD1B; CD1C; CD1D; CD1E; CD20; CD22; CD276; CD33; CD3E; CD3Z; изоформы 1 CD44; изоформы 6 CD44; CD4; CD52; CD55; CD56; CD80; CD86; CD8A; CDC27/m; CDE30; CDK4/m; CDKN2A/m; CEA; CEAM6; CH3L2; CLCA2; CML28; CML66; COA-1/m; коактозиноподобного белка; коллагена XXIII типа; COX-2; CP1B1; CSAG2; CT45A1; CT55; CT-9/BRD6; изоформы LAGE-1A CTAG2; изоформы LAGE-1B CTAG2; CTCFL; Cten; циклина B1; циклина D1; сур-В; DAM-10; DEP1A; E7; EF1A2; EFTUD2/m; EGFR; EGLN3; ELF2/m; EMMPRIN; EpCam; EphA2; EphA3; ErbB3; ERBB4; ERG; ETV6; EWS; EZH2; FABP7; варианта 1 FCGR3A; варианта 2 FCGR3A; FGF5; FGFR2; фибронектина; FOS; FOXP3; FUT1; G250; GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE7b; GAGE-8 (GAGE-2D); GASR; GnT-V; GPC3; GPNMB/m; GRM3; HAGE; гепсина; Her2/neu; HLA-A2/m; белка гомеобокса NKX3.1; HOM-TES-85; HPG1; HS71A; HS71B; HST-2; hTPET; iCE; IF2B3; IL10; IL-13Ra2; IL2-RA; IL2-RB; IL2-RG; IL-5; IMP3; ITA5; ITB1; ITB6; калликреина-2; калликреина-4; KI20A; KIAA0205; KIF2C; KK-LC-1; LDLR; LGMN; LIRB2; LY6K; MAGA5; MAGA8; MAGAB; MAGA-A10; MAGA-A12; MAGA-A1; MAGA-A2; MAGA-A3; MAGA-A4; MAGA-A6; MAGA-A9; MAGA-B10; MAGA-B16; MAGA-B17; MAGA-B1; MAGA-B2; MAGA-B3; MAGA-B4; MAGA-B5; MAGA-B6; MAGA-C1; MAGA-C2; MAGA-C3; MAGA-D1; MAGA-D2; MAGA-D4; MAGA-E1; MAGA-E1 (MAGE1); MAGA-E2; MAGA-F1; MAGA-H1; MAGEL2; маммаглобина A; MART-1/мелана-A; MART-2; MC1R; M-CSF; мезотелина; MITF; MMP11; MMP7; MUC-1; MUM-1/m; MUM-2/m; MYCN; MYO1A; MYO1B; MYO1C; MYO1D; MYO1E; MYO1F; MYO1G; MYO1H; NA17; NA88-A; нео-PAP; NFYC/m; NGER; NPM; NRCAM; NSE; NUF2; NY-ESO-1; OA1; OGT; OS-9; остеокальцина; остеопонтина; p53; PAGE-4; PAI-1; PAI-2; PAP; PATE; PAX3; PAX5; PD1L1; PDCD1; PDEF; PECA1; PGCB; PGFRB; Pim-1-киназы; Pin-1; PLAC1; PMEL; PML; POTE; POTE; PRAME; PRDX5/m; PRM2; простеина; протеиназы-3; PSA; PSB9; PSCA; PSGR; PSM; PTPRC; RAB8A; RAGE-1; RARA; RASH; RASK; RASN; RGS5; RHAMM/CD168; RHOC; RSSA; RU1; RU2; RUNX1; S-100; SAGE; SART-1; SART-2; SART-3; SEPR; серпина B5; SIA7F; SIA8A; SIAT9; SIRT2/m; SOX10; SP17; SPNAX; SPXN3; SSX-1; SSX-2; SSX3; SSX-4; ST1A1; STAG2; STAMP-1; STEAP-1; сурвивина-2B; сурвивина; SYCP1; SYT-SSX-1; SYT-SSX-2; TARP; TCRg; TF2AA; TGFB1; TGFR2; TGM-4; TIE2; TKTL1; TPI/m; TRGV11; TRGV9; TRPC1; TRP-p8; TSG10; TSPY1; TVC (TRGV3); TX101; тирозиназы; TYRP1; TYRP2; UPA; VEGFR1; WT1 и XAGE1.

Дополнительные антигены, применимые в настоящем изобретении, показаны в данном документе ниже (за названиями генов следуют № доступа белков в круглых скобках):

1A01 HLA-A/m (UniProtKB: P30443); 1A02 (UniProtKB: P01892); 5T4 (UniProtKB: Q13641); ACRBP (UniProtKB: Q8NEB7); AFP (UniProtKB: P02771); AKAP4 (UniProtKB: Q5JQC9); альфа-актинин-4/m (UniProtKB: B4DSX0); альфа-актинин-4/m (UniProtKB: B4E337); альфа-актинин-4/m (UniProtKB: O43707); альфа-метилацил-кофермент-А-рацемаза (UniProtKB: A0A024RE16); альфа-метилацил-кофермент-А-рацемаза (UniProtKB: A8KAC3); ANDR (UniProtKB: P10275); ART-4 (UniProtKB: Q9ULX3); ARTC1/m (UniProtKB: P52961); AURKB (UniProtKB: Q96GD4); B2MG (UniProtKB: P61769); B3GN5 (UniProtKB: Q9BYG0); B4GN1 (UniProtKB: Q00973); B7H4 (UniProtKB: Q7Z7D3); BAGE-1 (UniProtKB: Q13072); BASI (UniProtKB: P35613); BCL-2 (UniProtKB: A9QXG9); bcr/abl (UniProtKB: A9UEZ4); bcr/abl (UniProtKB: A9UEZ7); bcr/abl (UniProtKB: A9UEZ8); bcr/abl (UniProtKB: A9UEZ9); bcr/abl (UniProtKB: A9UF00); bcr/abl (UniProtKB: A9UF01); bcr/abl (UniProtKB: A9UF03); bcr/abl (UniProtKB: A9UF04); bcr/abl (UniProtKB: A9UF05); bcr/abl (UniProtKB: A9UF06); bcr/abl (UniProtKB: A9UF08); бета-катенин/m (UniProtKB: P35222); бета-катенин/m (UniProtKB: Q8WYA6); BING-4 (UniProtKB: O15213); BIRC7 (UniProtKB: Q96CA5); BRCA1/m (UniProtKB: A0A024R1V0); BRCA1/m (UniProtKB: A0A024R1V7); BRCA1/m (UniProtKB: A0A024R1Z8); BRCA1/m (UniProtKB: A0A068BFX7); BRCA1/m (UniProtKB: C6YB45); BRCA1/m (UniProtKB: C6YB47); BRCA1/m (UniProtKB: G3XAC3); BY55 (UniProtKB: O95971); кальретикулин (UniProtKB: B4DHR1); кальретикулин (UniProtKB: B4E2Y9); кальретикулин (UniProtKB: P27797); кальретикулин (UniProtKB: Q96L12); CAMEL (UniProtKB: O95987); CASP-8/m (UniProtKB: Q14790); CASPA (UniProtKB: Q92851-4); катепсин В (UniProtKB: A0A024R374); катепсин В (UniProtKB: P07858); катепсин L (UniProtKB: A0A024R276); катепсин L (UniProtKB: P07711); катепсин L (UniProtKB: Q9HQB7); CD1A (UniProtKB: P06126); CD1B (UniProtKB: P29016); CD1C (UniProtKB: P29017); CD1D (UniProtKB: P15813); CD1E (UniProtKB: P15812); CD20 (UniProtKB: P11836); CD22 (UniProtKB: O60926); CD22 (UniProtKB: P20273); CD22 (UniProtKB: Q0EAF5); CD276 (UniProtKB: Q5ZPR3); CD33 (UniProtKB: B4DF51); CD33 (UniProtKB: P20138); CD33 (UniProtKB: Q546G0); CD3E (UniProtKB: P07766); CD3Z (UniProtKB: P20963); изоформа 1 CD44 (UniProtKB: P16070); изоформа 6 CD44 (UniProtKB: P16070-6); CD4 (UniProtKB: P01730); CD52 (UniProtKB: P31358); CD52 (UniProtKB: Q6IBD0); CD52 (UniProtKB: V9HWN9); CD55 (UniProtKB: B1AP15); CD55 (UniProtKB: D3DT85); CD55 (UniProtKB: D3DT86); CD55 (UniProtKB: P08174); CD56 (UniProtKB: P13591); CD80 (UniProtKB: A0N0P2); CD80 (UniProtKB: P33681); CD86 (UniProtKB: P42081); CD8A (UniProtKB: P01732); CDC27/m (UniProtKB: G5EA36); CDC27/m (UniProtKB: P30260); CDE30 (UniProtKB: P28908); CDK4/m (UniProtKB: A0A024RBB6); CDK4/m (UniProtKB: P11802); CDK4/m (UniProtKB: Q6LC83); CDK4/m (UniProtKB: Q96BE9); CDKN2A/m (UniProtKB: D1LYX3); CDKN2A/m (UniProtKB: G3XAG3); CDKN2A/m (UniProtKB: K7PML8); CDKN2A/m (UniProtKB: L8E941); CDKN2A/m (UniProtKB: Q8N726); CEA (RefSeq: NP_004354); CEAM6 (UniProtKB: P40199); CH3L2 (UniProtKB: Q15782); CLCA2 (UniProtKB: Q9UQC9); CML28 (UniProtKB: Q9NQT4); CML66 (UniProtKB: Q96RS6); COA-1/m (UniProtKB: Q5T124); коактозиноподобный белок (UniProtKB: Q14019); коллаген XXIII типа (UniProtKB: L8EAS4); коллаген XXIII типа (UniProtKB: Q86Y22); COX-2 (UniProtKB: Q6ZYK7);

CP1B1 (UniProtKB: Q16678); CSAG2 (UniProtKB: Q9Y5P2-2); CSAG2 (UniProtKB: Q9Y5P2); CT45A1 (UniProtKB: Q5HYN5); CT55 (UniProtKB: Q8WUE5); CT-9/BRD6 (UniProtKB: Q58F21); изоформа LAGE-1A CTAG2 (UniProtKB: O75638-2); изоформа LAGE-1B CTAG2 (UniProtKB: O75638); CTCFL (UniProtKB: Q8NI51); Cten (UniProtKB: Q8IZW8); циклин B1 (UniProtKB: P14635); циклин D1 (UniProtKB: P24385); cyp-B (UniProtKB: P23284); DAM-10 (UniProtKB: P43366); DEP1A (UniProtKB: Q5TB30); E7 (UniProtKB: P03129); E7 (UniProtKB: P06788); E7 (UniProtKB: P17387); E7 (UniProtKB: P06429); E7 (UniProtKB: P27230); E7 (UniProtKB: P24837); E7 (UniProtKB: P21736); E7 (UniProtKB: P26558); E7 (UniProtKB: P36831); E7 (UniProtKB: P36833); E7 (UniProtKB: Q9QCZ1); E7 (UniProtKB: Q81965); E7 (UniProtKB: Q80956); EF1A2 (UniProtKB: Q05639); EFTUD2/m (UniProtKB: Q15029); EGFR (UniProtKB: A0A0B4J1Y5); EGFR (UniProtKB: E7BSV0); EGFR (UniProtKB: L0R6G1); EGFR (UniProtKB: P00533-2); EGFR (UniProtKB: P00533); EGFR (UniProtKB: Q147T7); EGFR (UniProtKB: Q504U8); EGFR (UniProtKB: Q8NDU8); EGLN3 (UniProtKB: Q9H6Z9); ELF2/m (UniProtKB: B7Z720); EMMPRIN (UniProtKB: Q54A51); EpCam (UniProtKB: P16422); EphA2 (UniProtKB: P29317); EphA3 (UniProtKB: P29320); EphA3 (UniProtKB: Q6P4R6); ErbB3 (UniProtKB: B3KWG5); ErbB3 (UniProtKB: B4DGQ7); ERBB4 (UniProtKB: Q15303); ERG (UniProtKB: P11308); ETV6 (UniProtKB: P41212); EWS (UniProtKB: Q01844); EZH2 (UniProtKB: F2YMM1); EZH2 (UniProtKB: G3XAL2); EZH2 (UniProtKB: L0R855); EZH2 (UniProtKB: Q15910); EZH2 (UniProtKB: S4S3R8); FABP7 (UniProtKB: Q15540); вариант 1 FCGR3A (UniProtKB: P08637); вариант 2 FCGR3A (CCDS: CCDS1232.1); FGF5 (UniProtKB: P12034); FGF5 (UniProtKB: Q60518); FGFR2 (UniProtKB: P21802); фибронектин (UniProtKB: A0A024R5I6); фибронектин (UniProtKB: A0A024RB01); фибронектин (UniProtKB: A0A024RDT9); фибронектин (UniProtKB: A0A024RDV5); фибронектин (UniProtKB: A6NH44); фибронектин (UniProtKB: A8K6A5); фибронектин (UniProtKB: B2R627); фибронектин (UniProtKB: B3KXM5); фибронектин (UniProtKB: B4DIC5); фибронектин (UniProtKB: B4DN21); фибронектин (UniProtKB: B4DS98); фибронектин (UniProtKB: B4DTH2); фибронектин (UniProtKB: B4DTK1); фибронектин (UniProtKB: B4DU16); фибронектин (UniProtKB: B7Z3W5); фибронектин (UniProtKB: B7Z939); фибронектин (UniProtKB: G5E9X3); фибронектин (UniProtKB: Q9H382); FOS (UniProtKB: P01100); FOXP3 (UniProtKB: Q9BZS1); FUT1 (UniProtKB: P19526); G250 (UniProtKB: Q16790); GAGE-1 (Genbank: AAA82744); GAGE-2 (UniProtKB: Q6NT46); GAGE-3 (UniProtKB: Q13067); GAGE-4 (UniProtKB: Q13068); GAGE-5 (UniProtKB: Q13069); GAGE-6 (UniProtKB: Q13070); GAGE7b (UniProtKB: O76087); GAGE-8 (GAGE-2D) (UniProtKB: Q9UEU5); GASR (UniProtKB: P32239); GnT-V (UniProtKB: Q09328); GPC3 (UniProtKB: I6QTG3); GPC3 (UniProtKB: P51654); GPC3 (UniProtKB: Q8IYG2); GPNMB/m (UniProtKB: A0A024RA55); GPNMB/m (UniProtKB: Q14956); GPNMB/m (UniProtKB: Q8IXJ5); GPNMB/m (UniProtKB: Q96F58); GRM3 (UniProtKB: Q14832); HAGE (UniProtKB: Q9NXZ2); гепсин (UniProtKB: B2ZDQ2); гепсин (UniProtKB: P05981); Her2/neu (UniProtKB: B4DTR1); Her2/neu (UniProtKB: L8E8G2); Her2/neu (UniProtKB: P04626); Her2/neu (UniProtKB: Q9UK79); HLA-A2/m (UniProtKB: Q95387); HLA-A2/m (UniProtKB: Q9MYF8); белок гомеобокса NKX3.1 (UniProtKB: Q99801); HOM-TES-85 (UniProtKB: B2RBQ6); HOM-TES-85 (UniProtKB: Q9P127); HPG1 (PubMed: 12543784); HS71A (UniProtKB: P0DMV8); HS71B (UniProtKB: P0DMV9); HST-2 (UniProtKB: P10767); hTERT (UniProtKB: O94807); ICE (UniProtKB: O00748); IF2B3 (UniProtKB: O00425); IL10 (UniProtKB: P22301); IL-13Ra2 (UniProtKB: Q14627); IL2-RA (UniProtKB: P01589); IL2-RB (UniProtKB: P14784); IL2-RG (UniProtKB: P31785); IL-5 (UniProtKB: P05113); IMP3 (UniProtKB: Q9NV31); ITA5 (UniProtKB: P08648); ITB1 (UniProtKB: P05556); ITB6 (UniProtKB: P18564); калликреин-2 (UniProtKB: A0A024R4J4); калликреин-2 (UniProtKB: A0A024R4N3); калликреин-2 (UniProtKB: B0AZU9); калликреин-2 (UniProtKB: B4DU77); калликреин-2 (UniProtKB: P20151); калликреин-2 (UniProtKB: Q6T774); калликреин-2 (UniProtKB: Q6T775); калликреин-4 (UniProtKB: A0A0C4DFQ5); калликреин-4 (UniProtKB: Q5BQA0); калликреин-4 (UniProtKB: Q96PT0); калликреин-

4 (UniProtKB: Q96PT1); калликреин-4 (UniProtKB: Q9Y5K2); KI20A (UniProtKB: O95235); KIAA0205 (UniProtKB: Q92604); KIF2C (UniProtKB: Q99661); KK-LC-1 (UniProtKB: Q5H943); LDLR (UniProtKB: P01130); LGMN (UniProtKB: Q99538); LIRB2 (UniProtKB: Q8N423); LY6K (UniProtKB: Q17RY6); MAGA5 (UniProtKB: P43359); MAGA8 (UniProtKB: P43361); MAGAB (UniProtKB: P43364); MAGE-A10 (UniProtKB: A0A024RC14); MAGE-A12 (UniProtKB: P43365); MAGE-A1 (UniProtKB: P43355); MAGE-A2 (UniProtKB: P43356); MAGE-A3 (UniProtKB: P43357); MAGE-A4 (UniProtKB: A0A024RC12); MAGE-A4 (UniProtKB: P43358); MAGE-A4 (UniProtKB: Q1RN33); MAGE-A6 (UniProtKB: A8K072); MAGE-A6 (UniProtKB: P43360); MAGE-A6 (UniProtKB: Q6FHI5); MAGE-A9 (UniProtKB: P43362); MAGE-B10 (UniProtKB: Q96LZ2); MAGE-B16 (UniProtKB: A2A368); MAGE-B17 (UniProtKB: A8MXT2); MAGE-B1 (UniProtKB: Q96TG1); MAGE-B2 (UniProtKB: O15479); MAGE-B3 (UniProtKB: O15480); MAGE-B4 (UniProtKB: O15481); MAGE-B5 (UniProtKB: Q9BZ81); MAGE-B6 (UniProtKB: Q8N7X4); MAGE-C1 (UniProtKB: O60732); MAGE-C2 (UniProtKB: Q9UBF1); MAGE-C3 (UniProtKB: Q8TD91); MAGE-D1 (UniProtKB: Q9Y5V3); MAGE-D2 (UniProtKB: Q9UNF1); MAGE-D4 (UniProtKB: Q96JG8); MAGE-E1 (UniProtKB: Q6IAI7); MAGE-E1 (MAGE1) (UniProtKB: Q9HCI5); MAGE-E2 (UniProtKB: Q8TD90); MAGE-F1 (UniProtKB: Q9HAY2); MAGE-H1 (UniProtKB: Q9H213); MAGEL2 (UniProtKB: Q9UJ55); маммаглобин А (UniProtKB: Q13296); маммаглобин А (UniProtKB: Q6NX70); MART-1/мелан-А (UniProtKB: Q16655); MART-2 (UniProtKB: Q5VTY9); MC1R (UniProtKB: Q01726); MC1R (UniProtKB: Q1JUL4); MC1R (UniProtKB: Q1JUL6); MC1R (UniProtKB: Q1JUL8); MC1R (UniProtKB: Q1JUL9); MC1R (UniProtKB: Q1JUM0); MC1R (UniProtKB: Q1JUM2); MC1R (UniProtKB: Q1JUM3); MC1R (UniProtKB: Q1JUM4); MC1R (UniProtKB: Q1JUM5); MC1R (UniProtKB: Q6UR92); MC1R (UniProtKB: Q6UR94); MC1R (UniProtKB: Q6UR95); MC1R (UniProtKB: Q6UR96); MC1R (UniProtKB: Q6UR97); MC1R (UniProtKB: Q6UR98); MC1R (UniProtKB: Q6UR99); MC1R (UniProtKB: Q6URA0); MC1R (UniProtKB: Q86YW1); MC1R (UniProtKB: V9Q552); MC1R (UniProtKB: V9Q671); MC1R (UniProtKB: V9Q783); MC1R (UniProtKB: V9Q7F1); MC1R (UniProtKB: V9Q8N1); MC1R (UniProtKB: V9Q977); MC1R (UniProtKB: V9Q9P5); MC1R (UniProtKB: V9Q9R8); MC1R (UniProtKB: V9QAE0); MC1R (UniProtKB: V9QAR2); MC1R (UniProtKB: V9QAW3); MC1R (UniProtKB: V9QB02); MC1R (UniProtKB: V9QB58); MC1R (UniProtKB: V9QBY6); MC1R (UniProtKB: V9QC17); MC1R (UniProtKB: V9QC66); MC1R (UniProtKB: V9QCQ4); MC1R (UniProtKB: V9QDF4); MC1R (UniProtKB: V9QDN7); MC1R (UniProtKB: V9QDQ6); M-CSF (UniProtKB: P09603); мезотелин (UniProtKB: Q13421); MITF (UniProtKB: O75030-8); MITF (UniProtKB: O75030-9); MITF (UniProtKB: O75030); MMP11 (UniProtKB: B3KQ58); MMP7 (UniProtKB: P09237); MUC-1 (Genbank: AAA60019); MUM-1/m (RefSeq: NP_116242); MUM-2/m (UniProtKB: Q9Y5R8); MYCN (UniProtKB: P04198); MYO1A (UniProtKB: Q9UBC5); MYO1B (UniProtKB: O43795); MYO1C (UniProtKB: O00159); MYO1D (UniProtKB: O94832); MYO1E (UniProtKB: Q12965); MYO1F (UniProtKB: O00160); MYO1G (UniProtKB: B0I1T2); MYO1H (RefSeq: NP_001094891); NA17 (UniProtKB: Q3V5L5); NA88-A (PubMed: 10790436); neo-PAP (UniProtKB: Q9BWT3); NFYC/m (UniProtKB: Q13952); NGEP (UniProtKB: Q6IWH7); NPM (UniProtKB: P06748); NRCAM (UniProtKB: Q92823); NSE (UniProtKB: P09104); NUF2 (UniProtKB: Q9BZD4); NY-ESO-1 (UniProtKB: P78358); OA1 (UniProtKB: P51810); OGT (UniProtKB: O15294); OS-9 (UniProtKB: B4DH11); OS-9 (UniProtKB: B4E321); OS-9 (UniProtKB: B7Z8E7); OS-9 (UniProtKB: Q13438); остеокальцин (UniProtKB: P02818); остеоопонтин (UniProtKB: A0A024RDE2); остеоопонтин (UniProtKB: A0A024RDE6); остеоопонтин (UniProtKB: A0A024RDJ0); остеоопонтин (UniProtKB: B7Z351); остеоопонтин (UniProtKB: F2YQ21); остеоопонтин (UniProtKB: P10451); p53 (UniProtKB: P04637); PAGE-4 (UniProtKB: O60829); PAI-1 (UniProtKB: P05121); PAI-2 (UniProtKB: P05120); PAP (UniProtKB: Q06141); PAP (UniProtKB: Q53S56); PATE (UniProtKB: Q8WXA2); PAX3 (UniProtKB: P23760); PAX5 (UniProtKB: Q02548); PD1L1 (UniProtKB: Q9NZQ7); PDCD1 (UniProtKB: Q15116); PDEF (UniProtKB: O95238); PECA1 (UniProtKB: P16284); PGCB (UniProtKB: Q96GW7); PGFRB (UniProtKB: P09619); Pim-1-киназа (UniProtKB:

A0A024RD25); Pin-1 (UniProtKB: O15428); Pin-1 (UniProtKB: Q13526); Pin-1 (UniProtKB: Q49AR7); PLAC1 (UniProtKB: Q9HBJ0); PMEL (UniProtKB: P40967); PML (UniProtKB: P29590); POTE (UniProtKB: A5A3E0); POTE (UniProtKB: Q86YR6); PRAME (UniProtKB: A0A024R1E6); PRAME (UniProtKB: P78395); PRDX5/m (UniProtKB: P30044); PRM2 (UniProtKB: P04554); протеин (UniProtKB: Q96JT2); протеиназа-3 (UniProtKB: D6CHE9); протеиназа-3 (UniProtKB: P24158); PSA (UniProtKB: P55786); PSB9 (UniProtKB: P28065); PSCA (UniProtKB: D3DWI6); PSCA (UniProtKB: O43653); PSGR (UniProtKB: Q9H255); PSM (UniProtKB: Q04609); PTPRC (RefSeq: NP_002829); RAB8A (UniProtKB: P61006); RAGE-1 (UniProtKB: Q9UQ07); RARA (UniProtKB: P10276); RASH (UniProtKB: P01112); RASK (UniProtKB: P01116); RASN (UniProtKB: P01111); RGS5 (UniProtKB: O15539); RHAMM/CD168 (UniProtKB: O75330); RHOC (UniProtKB: P08134); RSSA (UniProtKB: P08865); RU1 (UniProtKB: Q9UJH3); RU2 (UniProtKB: Q9UHG0); RUNX1 (UniProtKB: Q01196); S-100 (UniProtKB: V9HW39); SAGE (UniProtKB: Q9NXZ1); SART-1 (UniProtKB: O43290); SART-2 (UniProtKB: Q9UL01); SART-3 (UniProtKB: Q15020); SEPR (UniProtKB: Q12884); сепин B5 (UniProtKB: P36952); SIA7F (UniProtKB: Q969X2); SIA8A (UniProtKB: Q92185); SIAT9 (UniProtKB: Q9UNP4); SIRT2/m (UniProtKB: A0A024R0G8); SIRT2/m (UniProtKB: Q8IXJ6); SOX10 (UniProtKB: P56693); SP17 (UniProtKB: Q15506); SPNXA (UniProtKB: Q9NS26); SPXN3 (UniProtKB: Q5MJ09); SSX-1 (UniProtKB: Q16384); SSX-2 (UniProtKB: Q16385); SSX3 (UniProtKB: Q99909); SSX-4 (UniProtKB: O60224); ST1A1 (UniProtKB: P50225); STAG2 (UniProtKB: Q8N3U4-2); STAMP-1 (UniProtKB: Q8NFT2); STEAP-1 (UniProtKB: A0A024RA63); STEAP-1 (UniProtKB: Q9UHE8); сурвивин-2B (UniProtKB: O15392-2); сурвивин (UniProtKB: O15392); SYCP1 (UniProtKB: A0A024R0I2); SYCP1 (UniProtKB: B7ZLS9); SYCP1 (UniProtKB: Q15431); SYCP1 (UniProtKB: Q3MHC4); SYT-SSX-1 (UniProtKB: A4PIV7); SYT-SSX-1 (UniProtKB: A4PIV8); SYT-SSX-2 (UniProtKB: A4PIV9); SYT-SSX-2 (UniProtKB: A4PIW0); TARP (UniProtKB: Q0VGM3); TCRg (UniProtKB: A2JGV3); TF2AA (UniProtKB: P52655); TGFBI (UniProtKB: P01137); TGFR2 (UniProtKB: P37173); TGM-4 (UniProtKB: B2R7D1); TIE2 (UniProtKB: Q02763); TKTL1 (UniProtKB: P51854); TPI/m (UniProtKB: P60174); TRGV11 (UniProtKB: Q99601); TRGV9 (UniProtKB: A4D1X2); TRGV9 (UniProtKB: Q99603); TRGV9 (UniProtKB: Q99604); TRPC1 (UniProtKB: P48995); TRP-p8 (UniProtKB: Q7Z2W7); TSG10 (UniProtKB: Q9BZW7); TSPY1 (UniProtKB: Q01534); TVC (TRGV3) (Genbank: M13231.1); TX101 (UniProtKB: Q9BY14-2); тирозиназа (UniProtKB: A0A024DBG7); тирозиназа (UniProtKB: L8B082); тирозиназа (UniProtKB: L8B086); тирозиназа (UniProtKB: L8B0B9); тирозиназа (UniProtKB: O75767); тирозиназа (UniProtKB: P14679); тирозиназа (UniProtKB: U3M8N0); тирозиназа (UniProtKB: U3M9D5); тирозиназа (UniProtKB: U3M9J2); TYRP1 (UniProtKB: P17643); TYRP2 (UniProtKB: P40126); UPA (UniProtKB: Q96NZ9); VEGFR1 (UniProtKB: B5A924); WT1 (UniProtKB: A0A0H5AU00); WT1 (UniProtKB: P19544); WT1 (UniProtKB: Q06250); XAGE1 (UniProtKB: Q9ND64).

Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа.

Были обнаружены Т-клеточные поверхностные молекулы-отрицательные регуляторы, экспрессия которых повышается в активированных Т-клетках с целью ослабления их активности, что таким образом снижает эффективность уничтожения указанными активированными Т-клетками опухолевых клеток. Эти ингибирующие молекулы были названы молекулами-отрицательными костимуляторами ввиду их гомологии с Т-клеточной костимулирующей молекулой CD28. Эти белки, также называемые белками-контрольными точками иммунного ответа, функционируют несколькими путями, в том числе посредством ослабления ранних активационных сигналов, конкуренции за положительную костимуляцию и прямого ингибирования антигенпрезентирующих клеток (Bour-Jordan et al., 2011. Immunol. Rev. 241(1):180-205).

В контексте настоящего изобретения модулятор контрольных точек иммунного ответа, как правило, представляет собой молекулу, такую как белок (например, антитело), рецептор с доминантно-негативной мутацией, рецептор-ловушка или лиганд, или ее фрагмент или вариант, которые модулируют функцию белка-контрольной точки иммунного ответа, например они ингибируют или снижают активность ингибируемых контрольных точек иммунного ответа (или являются молекулами, ингибирующими контрольные точки иммунного ответа) или стимулируют или усиливают активность стимулируемых контрольных точек иммунного ответа (или являются молекулами, стимулирующими контрольные точки иммунного ответа). Следовательно, модуляторы контрольных точек иммунного ответа, определенные в данном документе, влияют на активность молекул-контрольных точек иммунного ответа.

В данном контексте молекулы, ингибирующие контрольные точки иммунного ответа, определены как ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, и эти понятия могут использоваться синонимично. Кроме того, молекулы, стимулирующие контрольные точки иммунного ответа, определены как стимуляторы контрольных точек иммунного ответа, и эти понятия могут использоваться синонимично.

Модулятор контрольных точек иммунного ответа предпочтительно выбран из агонистических антител, антагонистических антител, лигандов, рецепторов с доминантно-негативными мутациями и рецепторов-ловушек или их комбинаций.

Способы получения и применения антител, кодируемых мРНК, известны из уровня техники (например, WO 2008/083949 или PCT/EP2017/060226).

Предпочтительными в контексте настоящего изобретения ингибируемыми молекулами-контрольными точками иммунного ответа, которые могут ингибироваться модулятором контрольных точек иммунного ответа, являются PD-1, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, LAG3, TIM3/HAVERCR2, 2B4, A2aR, B7H3, B7H4, BTLA, CD30, CD160, CD155, GAL9, HVEM, IDO1, IDO2, KIR, LAIR1 и VISTA.

Предпочтительными в контексте настоящего изобретения стимулируемыми молекулами-контрольными точками иммунного ответа, которые могут стимулироваться модулятором контрольных точек иммунного ответа, являются CD2, CD27, CD28, CD40, CD137, CD226, CD276, GITR, ICOS, OX40 и CD70.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления фармацевтическая композиция или вакцина, содержащая РНК согласно настоящему изобретению, предназначена для применения, описанного в данном документе, где применение предусматривает в качестве дополнительного фармацевтически активного ингредиента модулятор контрольных точек иммунного ответа, выбранный из группы, состоящей из ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1, ингибитора PD-L2, ингибитора CTLA-4, ингибитора LAG3, ингибитора TIM3, ингибитора TIGIT, стимулятора OX40, стимулятора 4-1BB, стимулятора CD40L, стимулятора CD28 и стимулятора GITR.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления модулятор контрольных точек иммунного ответа, применяемый в данном документе, нацеливается на элемент сигнального пути PD-1. Элементы сигнального пути PD-1, как правило, представляют собой белки, ассоциированные с передачей сигнала от PD-1. С одной стороны, данная группа включает белки, которые индуцируют передачу сигнала от PD-1, действуя в восходящем направлении от PD-1, как, например, лиганды для PD-1, PD-L1 и PD-L2, а также рецептор PD-1, передающий сигнал. С другой стороны, данная группа включает белки, передающие сигнал, действующие в нисходящем направлении от рецептора PD-1. Особенно предпочтительными в качестве элементов сигнального пути PD-1 в контексте настоящего изобретения являются PD-1, PD-L1 и PD-L2.

В контексте настоящего изобретения антагонист сигнального пути PD-1 (или ингибитор PD-1) предпочтительно определен в данном документе как соединение, способное ухудшать передачу сигнала по сигнальному пути PD-1, предпочтительно передачу сигнала, опосредованную рецептором PD-1. Следовательно, антагонистом сигнального пути PD-1 может являться любой антагонист, направленный против любого элемента сигнального пути PD-1, способный оказывать антагонистическое воздействие на передачу сигнала по сигнальному пути PD-1.

В предпочтительном варианте осуществления модулятор контрольных точек иммунного ответа, применяемый в данном документе, представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1, где ингибитор PD-1 предпочтительно представляет собой антагонистическое антитело, направленное против PD-1, а ингибитор PD-L1 предпочтительно представляет собой антагонистическое антитело, направленное против PD-L1.

В данном контексте антагонист может представлять собой антагонистическое антитело, определенное в данном документе, нацеливающееся на любой элемент сигнального пути PD-1, предпочтительно антагонистическое антитело, направленное против рецептора PD-1, PD-L1 или PD-L2. Такое антагонистическое антитело также может кодироваться нуклеиновой кислотой. Антагонист сигнального пути PD-1 также может представлять собой фрагмент рецептора PD-1, блокирующего активность лигандов для PD1. B7-1 или его фрагменты также могут выступать в качестве лигандов, оказывающих антагонистическое воздействие на PD1. Дополнительно, антагонист сигнального пути PD-1 может представлять собой белок, содержащий (или нуклеиновую кислоту, кодирующую) аминокислотную последовательность, способную связываться с PD-1, но предотвращающую передачу сигнала от PD-1, например, посредством ингибирования взаимодействия между PD-1 и B7-H1 или B7-DL (WO 2014/127917; WO 2012062218).

Особенно предпочтительными являются антитела к PD1 ниволумаб (MDX-1106/BMS-936558/ONO-4538) (Brahmer et al., 2010. J. Clin. Oncol. 28(19):3167-75; PMID: 20516446); пидилизумаб (CT-011) (Berger et al., 2008. Clin. Cancer Res. 14(10):3044-51; PMID: 18483370); пембролизумаб (MK-3475, SCH 900475); AMP-224 и MEDI0680 (AMP-514).

Особенно предпочтительными также являются антитела к PD-L1 MDX-1105/BMS-936559 (Brahmer et al., 2012. N. Engl. J. Med. 366(26):2455-65; PMID: 22658128); атезолизумаб (MPDL3280A/RG7446); дурвалумаб (MEDI4736) и авелумаб (MSB0010718).

В соответствии с другим вариантом осуществления модулятор контрольных точек иммунного ответа, применяемый в данном документе, представляет собой стимулятор OX40. OX40 является представителем суперсемейства TNFR-рецепторов и экспрессируется на поверхности активированных антигеном CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов млекопитающих. Лиганд для OX40 (OX40L, также известный как gp34, ACT-4-L и CD252) представляет собой белок, специфично взаимодействующий с рецептором OX40.

Термин "OX40L" включает целый лиганд для OX40, растворимый лиганд для OX40, а также слитые белки, содержащие функционально активную часть лиганда для OX40, ковалентно связанную со вторым компонентом, например, доменом белка. В определение OX40L также включены варианты, которые отличаются по аминокислотной последовательности от встречающегося в природе OX40L, но сохраняют способность к специфичному связыванию с рецептором OX40. В определение OX40L дополнительно включены его варианты, которые усиливают биологическую активность OX40. Агонист OX40 представляет собой молекулу, которая индуцирует или усиливает биологическую активность OX40, например, передачу сигнала, опосредованную OX40. Агонист OX40 предпочтительно определен в данном документе как связывающая молекула, способная специфично связываться с OX40. Следовательно, агонистом OX40 может являться любой агонист, связывающийся с OX40 и способный стимулировать передачу сигнала от OX40. В данном контексте агонист OX40 может представлять собой агонистическое антитело, связывающееся с OX40.

Агонисты OX40 и моноклональные антитела к OX40 описаны в WO 1995/021251, WO 1995/012673 и WO 1995/21915. Особенно предпочтительным является антитело 9B12 к OX40, моноклональное антитело мыши к OX40, направленное против внеклеточного домена OX40 человека (Weinberg et al., 2006. J. Immunother. 29(6):575-585).

В другом варианте осуществления модулятор контрольных точек иммунного ответа, применяемый в данном документе, представляет собой антагонистическое антитело, выбранное из группы, состоящей из антитела к CTLA4, антитела к PD1, антитела к PD-L1, антитела к VISTA, антитела к TIM-3, антитела к TIGIT, антитела к LAG-3 и антитела к BTLA.

Антитело к CTLA4, которое может применяться в качестве модулятора контрольных точек иммунного ответа, предпочтительно направлено против антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4). CTLA-4 экспрессируется главным образом во внутриклеточном компартменте Т-клеток. После сильного или длительного воздействия стимула на "необученную" Т-клетку посредством Т-клеточного рецептора (TCR) CTLA-4 транспортируется к клеточной поверхности и концентрируется в иммунном синапсе. CTLA-4 затем конкурирует с CD28 за связывание с CD80/CD86 и модулирует передачу сигнала от TCR, ослабляя ее, посредством оказания эффектов на передачу сигнала с помощью Akt. Таким образом, с физиологической точки зрения CTLA-4 функционирует в качестве гасителя сигнала (Weber, J. 2010. Semin. Oncol. 37(5):430-9).

В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция или вакцина, содержащая РНК согласно настоящему изобретению, предназначена для применения, описанного в данном документе, где применение предусматривает в качестве дополнительного фармацевтически активного ингредиента антагонист CTLA4, который предпочтительно представляет собой антагонистическое антитело, направленное против CTLA4 (антитело к CTLA4). Термин "антагонист CTLA4", используемый в данном документе, включает любое соединение, такое как антитело, которое оказывает антагонистическое воздействие на физиологическую функцию CTLA4. В контексте настоящего изобретения термин "антитело к CTLA4" может относиться к антагонистическому антителу, направленному против CTLA4 (или к функциональному фрагменту или варианту указанного антитела), или к нуклеиновой кислоте, предпочтительно РНК, кодирующей указанное антагонистическое антитело (или его функциональный фрагмент). Функциональный фрагмент или вариант антитела к CTLA4 предпочтительно выступает в качестве антагониста CTLA4. Термин "антитело к CTLA4" более предпочтительно относится к моноклональному антителу, направленному против CTLA4 (или функциональному фрагменту или варианту такого антитела), или к нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело, направленное против CTLA4 (или функциональный фрагмент или вариант такого антитела). Термин "антитело к CTLA4", используемый в данном документе, может относиться соответственно к тяжелой или легкой цепи антитела или также относится к обеим цепям антитела (тяжелой и легкой цепям) или к фрагменту или варианту любой из этих цепей. Фрагмент или вариант антитела к CTLA4, применяемый в данном документе, предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент или вариант, предпочтительно описанный в данном документе.

Особенно предпочтительными являются антитела к CTLA-4 ипилимумаб (Yervoy®), тремелимуаb и AGEN-1884. Дополнительные предпочтительные антитела к CTLA4, применяемые в данном документе, включают BMS 734016; BMS-734016; BMS734016; MDX 010; MDX 101; MDX-010; MDX-101; MDX-CTLA-4; MDX-CTLA4; MDX010; Winglore и Yervoy или функциональный фрагмент или вариант любого из этих антител.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления модулятор контрольных точек иммунного ответа, применяемый в данном документе, представляет собой по меньшей мере одно антитело, описанное в табл. 1, или его фрагмент или вариант.

Таблица 1. Антитела, направленные против молекул-контрольных точек иммунного ответа

Название	Мишень
Урелумаб	4-1BB/CD137
PF-05082566	4-1BB/CD137
8H9	B7-H3
Эноблитузумаб	B7-H3
Ипилимумаб	CD152/CTLA-4
Тицилимумаб (= тремелиумаб)	CD152/CTLA-4
Тремелиумаб	CD152/CTLA-4
Варлиумаб	CD27
Тенеликсимаб	CD40
Ворсетузумаб-мафодотин	CD70
Лирилумаб	KIR2D
GSK-3174998	OX40
MEDI-6469	OX40
MEDI-6383	OX40
MEDI-0562	OX40
PF-04518600	OX40
RG-7888	OX40
PF-06801591	PD-1
BGBA-317	PD-1
MEDI-0680	PD-1
МК-3475	PD-1
Ниволумаб	PD-1
PDR-001	PD-1
Пембролизумаб	PD-1
Пидилизумаб	PD-1
REGN-2810	PD-1
SHR-1210	PD-1
TSR-042	PD-1
MDX-1106	PD-1
Merck 3745	PD-1
CT-011	PD-1
MEDI-0680	PD-1
PDR001	PD-1
REGN2810	PD-1
BGB-108	PD-1
BGB-A317	PD-1
AMP-224	PD-1
Атезолизумаб	PD-L1 (CD274)
Авелумаб	PD-L1 (CD274)
BMS-936559	PD-L1 (CD274)
Дурвалумаб	PD-L1 (CD274)
MEDI-4736	PD-L1 (CD274)
MPDL33280A	PD-L1 (CD274)
YW243.55.S70	PD-L1 (CD274)
MDX-1105	PD-L1 (CD274)
MSB0010718C	PD-L1 (CD274)

Стандартная терапия.

Субъект, получающий фармацевтическую композицию или вакцину, содержащую РНК согласно настоящему изобретению, их комбинацию или фармацевтическую композицию или вакцину, содержащую указанную(указанные) РНК, более предпочтительно является пациентом, страдающим от опухолевого или ракового заболевания, описанного в данном документе, и получавшим или получающим хи-

миотерапию (например, химиотерапию первой линии или второй линии), лучевую терапию, химиолучевую терапию (комбинацию химиотерапии и лучевой терапии), ингибиторы киназ, терапию антителами и/или модуляторы контрольных точек иммунного ответа (например, ингибиторы CTLA4, ингибиторы сигнального пути PD1), или пациентом, у которого были достигнуты частичный ответ или стабилизация заболевания после получения одного или нескольких видов лечения, указанных выше. Субъект более предпочтительно является пациентом, страдающим от опухолевого или ракового заболевания, описанного в данном документе, который получал или получает соединение, традиционно применяемое при любом из этих заболеваний, описанных в данном документе, более предпочтительно пациентом, который получает или получал модулятор контрольных точек иммунного ответа.

Следующие соединения являются предпочтительными соединениями, которые предпочтительно применяются в видах стандартной терапии и могут применяться в комбинации с фармацевтическими композициями или вакцинами, содержащими РНК согласно настоящему изобретению: цетуксимаб (эритукс), паклитаксел, стабилизированный альбумином (абраксан), (гимерацил+отерацил+тегафур) (TS-1), доцетаксел (доцетаксел, доксел, таксотер, доцетаксел Ап, доцел, наноксел М, таутакс, доцетаксел-AS, доцетаксел-М, квидадотакс, релидоце, таксело, онкодоцел, доксотел, паканцер, доцетруст, додотакс, додабур, сулакцин, такседол, доцефим, доцетаксел, рибодоцел, критидок, азодок, хемодок, доцелиббс, доценат, динцилезан, дострадиксинол, доцефрез, камитотик, онкотаксел, соматиксел, белотаксел, квидадотакс, таксцел, цетадокур, доцетаксел СТ, тевакстер, доцирена, эуротер, акстер, целотакс, таксанит, дробанос, цетадо, доксокад, таксцел, эгидокс, тедокад, доцекад, доцелекс, доцетакс, доцетаксел, доцетере, дотакс, таксуба, монотаксел, тацеедо, детаксел, доцет, доцетаксел, фердотакс, винтаксел), (тегафур+урацил) (Uft, Uft E, тефудекс, унитарал, лупорал, таграцил), фторурацил (5-FU), (гимерацил+отерацил+тегафур) ODT (комбинированный TS-1 OD), сульфат блеомицина (текломицина, циналео, блеомицин, блоицин-С, бонар, блеоцин, сульфат блеомицина, блео, блеоцел, блеотекс, онкоблео, блеонок, блеосол, лиобле, сульфат блеомицина, бленамакс, блеомицин, бленоксан, блеомицина, блеомицин беллон, блеоприм), карбоплатин (карбоплатин, платамин CS, карбаккорд, карбоплатина, карбоплатино, пароплатин, карбозин, текнокарб, карбомерк, паракт, карбоплатин CTRS, карбоплатин Intsel Chimos, карбоплатин, карбокем, карботинол, фаулдкарбо, эвокарб, цитоплатина, платин), ципрофлоксацин (гипофлоркс, уфексил), гидрохлорид ципрофлоксацина (ципрофлоксацин фарма, продин, ципроксин), цисплатин (цисплатин, стритин, ифапла, аккоцит, унистин, канцертин, цисплан, цитоплак, нуоксин, плацис, цисплатино, диспланор, ранда, циспла, фаулддиспла, бриплатин, платинекс, платинол, платинекс, рибоплатин, цисплатин, платистин CS, платозин, аккоцит, цисплатино), циклофосфамид (эндоксан, циклофосфамид), доксифлуридин (доксифлуридин, May Vladimir), доксорубин (гидрохлорид доксорубина, адриамицин RDF, доксорубин, доксорубин PFS), гидрохлорид эпирубина (бреса, гидрохлорид эпирубина, эпирубин, фарморубина, нуоводокс, аднекса, 4-эппедо, фавицин), фторурацил (агил, фторурацил, фаулдфтор, онкоурцил, флоцил, 5-флуцел), фолиевая кислота+метотрексат (труксофол), аденовирус человека 5 типа (рекомбинантный) (онкорин), гидроксимочевина (оксиреа, дуреа, миелостат, рибореа, унидреа, ондреа, гидран, лейкоцел, гидроксимочевина, гидреа), ифосфамид (голоксан, ифосфамид EG), левамизол (цирзол), метотрексат (тратобен, метотрексат, фрезексат, неомето, фаулдметро, метотрексат натрия, метоцел, гитас, метаккорд, метофилл, метотрексато, траксакорд, пластомет, тевакстер, метрекс, кадитрекс, кардитрекс, вибзи, имутрекс, биотрексат, меторекс, мексат, неотрексат, онкотрекс, ремтрекс, триксилем, хайтрекс, меторекс, трекс, унитрексат, эбетрексат, фаулдексато, лантарел, макстрекс, миантрекс CS, ревматрекс, фолекс, фолекс PFS, абитрексат, тевамето, трексалл, эмтексат, абитрексат, мидоу), митомицин (митомицин С, митомицин, митонко, лиомит), недаплатин (джибайшу, ауксианда, акупла), нимесулид (нимулид), нимотузумаб (биомаб EGFR, ледемаб), нитрофурантоин (фурацилин), офлоксацин (энтоф), паклитаксел (паклитаксел, таксол), сульфат пепломицина (пеплео), пицибанил (пицибанил), пирарубин (гидрохлорид пирарубина, терарубин, пинорубин), глицидидазол натрия (CMNa), тегафур (утефос, икарус, фторафур, тегафур, гимерацил и отерацил калия), темопорфин (фоскан), гидрохлорид топотекана (топотекан), убенимекс (убенимекс), сульфат винбластин (винбластин, V-бластин), сульфат винкристина (винкристин, сульфат винкристина, винкристины, сутивин), сульфат виндизина (элдизин), карбоплатин (карбоплатин Qualimed, карбоплатин, карбоплатино, карбоплатина), цисплатин (цисплатин), доцетаксел (камдокон, налтоксатер, доцетаксел), фторурацил (фторурацил, флуороурацил, фторурацилы), метотрексат (метотрексат натрия, мексат, мексат AQ, биометрокс, медсатрексат, отаксем), сульфат винкристина (онковин), фторурацил, малат сунитиниба, ацитретин, фибриновый клей, цетуксимаб, цетуксимаб, эрлотиниб, цисплатин; доцетаксел; фторурацил, нераскрытое противораковое лекарственное средство, гефитиниб, правастатин натрия, сиролimus, нераскрытое химиотерапевтическое средство, цисплатин; доцетаксел; фторурацил, сиролimus, фторурацил; нераскрытый таксан, гидрохлорид метиламинолевулината, цисплатин; доцетаксел; фторурацил, гидрохлорид эрлотиниба, цетуксимаб, имиквимод, нераскрытое средство китайской фитотерапии, аспирин; малеат эналаприла, нераскрытое химиотерапевтическое средство, цетуксимаб, (гимерацил+отерацил+тегафур); карбоплатин; цисплатин, цисплатин; фторурацил; нимотузумаб, карбоплатин; паклитаксел, стабилизированный альбумином, цисплатин; недаплатин, блеомицин, недаплатин, цисплатин; паклитаксел, паклитаксел, стабилизированный альбумином, (гимерацил+отерацил+тегафур), блеомицин; нераскрытое хи-

миотерапевтическое средство, апатиниб; доцетаксел, нераскрытая иммуномодулирующая добавка, ВСМ-95, гидрохлорид аминоклевулиновой кислоты, недаплатин, цисплатин; палифермин, цетуксимаб, gefitinib, бевацизумаб, белагепуматуцел-L, цисплатин; тирапазамин, цисплатин; тирапазамин, цисплатин; гемцитабин; паклитаксел; топотекан; винорельбин, цисплатин; фторурацил, панитумумаб, карбоплатин; доцетаксел; гидрохлорид гемцитабина; тартрата винорельбина, амифостин; фторурацил, цисплатин; фторурацил, карбоплатин; паклитаксел, тирапазамин, цисплатин; эпоэтин-альфа, фигитумумаб, мелфалан; фактор некроза опухоли-альфа, цисплатин, цисплатин; фторурацил, цисплатин; нераскрытое химиотерапевтическое средство, доцетаксел, контусуген ладеновек, цисплатин; фторурацил; паклитаксел, доцетаксел, (бивалентная) вакцина на основе вируса папилломы человека [серотипов 16, 18], изотретиноин, цисплатин; фторурацил, мизонидазол, паклитаксел, палифермин, эндостатин, пилокарпин, цисплатин; доцетаксел; филграстим; фторурацил; паклитаксел, цисплатин; доцетаксел; филграстим; фторурацил; паклитаксел, цисплатин; гидрохлорид иринотекана, цисплатин; гемцитабин, цисплатин; эпирубицин; фторурацил; нераскрытое химиотерапевтическое средство, гидрохлорид метиламиноклевулината, карбоплатин; паклитаксел, карбоген; диоксид углерода; ниацинамид, цисплатин; фторурацил, талимоген лагерпареп-век, эпоэтин-альфа, цисплатин; фторурацил; панитумумаб, цисплатин; фторурацил, цисплатин; фторурацил, алдеслейкин, цисплатин; фторурацил, цисплатин; паклитаксел, цисплатин; фторурацил, фторурацил; лейковорин; лобаплатин, цисплатин, цисплатин; этилмеркаптан; ифосфамид; месна; митолактол, доксорубицин; левамизол, (тегафур+урацил), цисплатин; фторурацил, цисплатин; винорельбин, карбоплатин; цисплатин; гидрохлорид гемцитабина, *Corynebacterium parvum*; доксорубицин, капецитабин; цисплатин; фторурацил; паклитаксел, фторурацил; лейковорин; метотрексат, rAd-p53, цетуксимаб; цисплатин; доцетаксел, PV-10, гидрохлорид метиламиноклевулината, цисплатин; фторурацил, паклитаксел; гидрохлорид топотекана, карбоплатин; цисплатин; паклитаксел, цисплатин; гидрохлорид топотекана, цисплатин; этопозид, доцетаксел; фторурацил, аспирин, цисплатин; гемцитабин, *Lactobacillus brevis* CD2, цисплатин; доцетаксел, трометамин фосбретабулина, панитумумаб, фторурацил, паклитаксел, карбоплатин; цисплатин; доцетаксел; фторурацил, фторурацил, гидрохлорид эрлотиниба, цисплатин; нераскрытое химиотерапевтическое средство; винорельбин, (гимерацил+отерацил+тегафур); карбоплатин, цетуксимаб, контусуген ладеновек, цетуксимаб, гидрохлорид метиламиноклевулината, циклофосфамид, (гимерацил+отерацил+тегафур); цисплатин, паклитаксел, стабилизированный альбумином, карбоплатин; паклитаксел, цисплатин; гемцитабин, капецитабин; цисплатин, доцетаксел, Z-100, цисплатин; ифосфамид; паклитаксел, нимотузумаб, гидрохлорид иринотекана, целекоксиб; метотрексат, нутризон, карбоплатин; цисплатин; фторурацил; паклитаксел, цисплатин; паклитаксел, цисплатин; доцетаксел; винорельбин, паклитаксел, (гимерацил+отерацил+тегафур); цисплатин, карбоплатин; паклитаксел, гидрохлорид метиламиноклевулината, айбин, цисплатин; фторурацил, порфимер натрия, карбоплатин; цисплатин; токотриенол; винорельбин, (гимерацил+отерацил+тегафур); цисплатин; паклитаксел, доцетаксел, ипилимумаб, цисплатин, VB-4847, целекоксиб; талидомид, цисплатин; эпирубицин; фторурацил, цисплатин; фторурацил, фторурацил, карбоплатин; паклитаксел, цетуксимаб; цисплатин; доцетаксел, цитокини-индуцированные аутологичные клетки-киллеры, цисплатин; доцетаксел; фторурацил, цисплатин; эпирубицин; фторурацил, тергенпуматуцел-L, цетуксимаб; цисплатин; доцетаксел, элентал, цисплатин; нимотузумаб; паклитаксел, эйкозапентаеновая кислота; нераскрытая пищевая добавка, палбоциклиб, пембролизумаб (кейтруда), нимотузумаб, апаторсен и дакомитиниб.

Опухолевые показания.

Используемые в данном документе термины "опухоль", "рак" или "раковое заболевание" относятся к злокачественному заболеванию, которое предпочтительно выбрано из группы, состоящей из аденокистозной карциномы (аденоидно-кистозной карциномы), аденокортикальной карциномы, форм рака, связанных с AIDS, лимфомы, связанной с AIDS, рака анального канала, рака аппендикса, астроцитомы, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, опухоли головного мозга, астроцитомы мозжечка, церебральной астроцитомы/злокачественной глиомы, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, глиомы зрительного пути и гипоталамуса, рака молочной железы, форм аденомы/карциноидных опухолей бронхов, лимфомы Беркитта, детской карциноидной опухоли, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, карциномы неизвестной первичной локализации, первичной лимфомы центральной нервной системы, детской астроцитомы мозжечка, детской церебральной астроцитомы/злокачественной глиомы, рака шейки матки, форм детского рака, хронического лимфоцитарного лейкоза, рака толстой кишки, кожной Т-клеточной лимфомы, в том числе грибовидного микоза и синдрома Сезари, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга из семейства опухолей типа саркомы Юинга, детской экстракраниальной герминогенной опухоли, экстрагональной герминогенной опухоли, рака внепеченочного желчного протока, интраокулярной меланомы, ретинобластомы, рака желчного пузыря, гастрального рака (рака желудка), карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), экстракраниальной, экстрагональной герминогенной опухоли или герминогенной опухоли яичника, гестационной трофобластической опухоли, глиомы ствола головного мозга, детской церебральной астроцитомы, детской глиомы зрительного

пути и гипоталамуса, карциноидной опухоли желудка, волосатоклеточного лейкоза, рака головы и шеи, рака сердца, гепатоцеллюлярного рака (рака печени), лимфомы Ходжкина, рака, связанного с вирусом папилломы человека (HPV), гипотарингеального рака, детской глиомы гипоталамуса и зрительного пути, интраокулярной меланомы, карциномы из островковых клеток (эндокринной части поджелудочной железы), саркомы Капоши, рака почки (почечноклеточного рака), рака гортани, рака губы и полости рта, липосаркомы, рака печени, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, форм лимфом, лимфомы, связанной с AIDS, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, форм неходжкинской лимфомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости/остеосаркомы, детской медуллобластомы, меланомы, интраокулярной меланомы (меланомы глаза), карциномы из клеток Меркеля, злокачественной мезотелиомы взрослых, детской мезотелиомы, рака головы и шеи, рака ротовой полости, детского синдрома множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы/плазмноклеточного новообразования, множественной миеломы (рака костного мозга), рака полости носа и придаточных пазух, назофарингеальной карциномы, нейробластомы, рака полости рта, рака ротоглотки, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы кости, рака яичника, эпителиального рака яичника (поверхностной эпителиально-стромальной опухоли), герминогенной опухоли яичника, опухоли яичника с низким злокачественным потенциалом, рака поджелудочной железы, рака поджелудочной железы из островковых клеток, рака придаточных пазух и полости носа, рака паращитовидной железы, рака полового члена, фарингеального рака, феохромоцитомы, астроцитомы шишковидного тела, герминомы шишковидного тела, детской пинеобластомы и супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, аденомы гипофиза, плазмноклеточного новообразования/плазмцитомы/множественной миеломы, плеврорегочной бластомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, рака предстательной железы, рака прямой кишки, почечноклеточной карциномы (рака почки), рака почечной лоханки и мочеточника, ретинобластомы, детской рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы из семейства опухолей типа саркомы Юинга, саркомы Капоши, саркомы мягких тканей, саркомы матки, рака кожи (отличного от меланомы), рака кожи (меланомы), карциномы кожи из клеток Меркеля, рака тонкой кишки, плоскоклеточной карциномы, метастатического плоскоклеточного рака шеи неизвестной первичной локализации, саркомы мягких тканей (STS), детской супратенториальной примитивной нейроэктодермальной опухоли, рака яичка (семиномы и рака, отличного от семиномы), рака горла, детской тимомы, тимомы и карциномы вилочковой железы, рака щитовидной железы, детского рака щитовидной железы, переходноклеточного рака почечной лоханки и мочеточника, гестационной трофобластической опухоли, рака уретры, рака эндометрия матки, саркомы матки, рака влагалища, детской глиомы зрительного пути и гипоталамуса, рака вульвы и детской опухоли Вильмса (рака почки).

Аллергенные антигены.

Антигены, ассоциированные с аллергией или аллергическим заболеванием (аллергены или аллергенные антигены), предпочтительно получены из источника, выбранного из перечня, состоящего из

видов *Acarus* (Aca s 1, Aca s 10, Aca s 10.0101, Aca s 13, Aca s 13.0101, Aca s 2, Aca s 3, Aca s 7, Aca s 8), видов *Acanthocybium* (Aca so 1), видов *Acanthocheilonema* (Aca v 3, Aca v 3.0101), видов *Acetes* (Ace ja 1), видов *Actinidia* (Act a 1, Act c 1, Act c 10, Act c 10.0101, Act c 2, Act c 4, Act c 5, Act c 5.0101, Act c 8, Act c 8.0101, хитиназа Act c, Act d 1, Act d 1.0101, Act d 10, Act d 10.0101, Act d 10.0201, Act d 11, Act d 11.0101, Act d 2, Act d 2.0101, Act d 3, Act d 3.0101, Act d 3.02, Act d 4, Act d 4.0101, Act d 5, Act d 5.0101, Act d 6, Act d 6.0101, Act d 7, Act d 7.0101, Act d 8, Act d 8.0101, Act d 9, Act d 9.0101, хитиназа Act d, Act e 1, Act e 5), видов *Acyrtosiphon* (Асу pi 7, Асу pi 7.0101, Асу pi 7.0102), видов *Adenia* (RIP Ade v), видов *Aedes* (Aed a 1, Aed a 1.0101, Aed a 2, Aed a 2.0101, Aed a 3, Aed a 3.0101, Aed a 4, Aed a 7, Aed a 7.0101, Aed a 7.0102, Aed a 7.0103, Aed a 7.0104, Aed a 7.0105, Aed a 7.0106, Aed a 7.0107, Aed a 7.0108, Aed a 7.0109, Aed a 7.0110, Aed a 7.0111, Aed al 1, Aed al 3, Aed al размером 37 кДа, Aed v размером 37 кДа, Aed v размером 63 кДа), видов *Aegilops* (Aeg ta 28, альфа-глиадин Aeg ta, Aeg um 28, Aeg un 28), видов *Aethaloperca* (Aet ro 1), видов *Agropyron* (Agr c 7), видов *Agrostis* (Agr ca 1, Agr ca 5, Agr g 1, Agr g 4, Agr s 5), видов *Agrobacterium* (CP4-EPSPS Agr sp), видов *Ailuropoda* (фосвитин Ail me, ТСТР Ail me), видов *Aix* (Aix ga 1, Aix sp 1), видов *Aleuroglyphus* (Ale o 1, Ale o 10, Ale o 10.0101, Ale o 10.0102, Ale o 13, Ale o 14, Ale o 2, Ale o 20, Ale o 3, Ale o 5, Ale o 7, Ale o 8, Ale o 9), видов *Allium* (All a 3, аллиинлиаза All a, All c 3, All c размером 30 кДа, All c 4, аллиинлиаза All c, аллиинлиаза All p, аллиинлиаза All s), видов *Alnus* (Aln g 1, Aln g 1.0101, TPC7 Aln g 1/Bet v 1/Cor a 1, TPC9 Aln g 1/Bet v 1/Cor a 1, Aln g 2, Aln g 4, Aln g 4.0101), видов *Alopochen* (Alo ae 1), видов *Alopecurus* (Alo p 1, Alo p 5), видов *Alternaria* (Alt a 1, Alt a 1.0101, Alt a 1.0102, Alt a 10, Alt a 10.0101, Alt a 12, Alt a 12.0101, Alt a 13, Alt a 13.0101, Alt a 2, Alt a 3, Alt a 3.0101, Alt a 4, Alt a 4.0101, Alt a 5, Alt a 5.0101, Alt a 6, Alt a 6.0101, Alt a 7, Alt a 7.0101, Alt a размером 70 кДа, Alt a 8, Alt a 8.0101, Alt a 9, MnSOD Alt a, NTF2 Alt a, ТСТР Alt a, Alt ar 1, Alt arg 1, Alt b 1, Alt bl 1, Alt br 1, Alt c 1, Alt ca 1, Alt ce 1, Alt ch 1, Alt ci 1, Alt co 1, Alt cr 1, Alt ct 1, Alt cu 1, Alt cy 1, Alt d 1, Alt du 1, Alt e 1, Alt et 1, Alt eu 1, Alt ga 1, Alt gr 1, Alt j 1, Alt l 1, Alt lo 1, Alt m 1, Alt me 1, Alt mi 1, Alt mo 1, Alt o 1, Alt p 1, Alt ph 1, Alt po 1, Alt ps 1, Alt r 1, Alt s 1, Alt se 1, Alt sm 1, Alt so 1, Alt su 1, Alt t 1, Alt te 1, Alt to 1), видов *Amaranthus* (Ama r 2, Ama r 2.0101, Ama v 2, Ama v 2.0101, Ama v 2.0201), видов *Ambrosia* (Amb a 1, Amb a 1.0101, Amb a 1.0201, Amb a 1.0202, Amb a 1.0301, Amb a 1.0302, Amb a 1.0303, Amb a 1.0304, Amb a 1.0305, Amb a 1.0401, Amb a 1.0402, Amb a 1.0501, Amb a 1.0502, Amb a 10, Amb a 10.0101, Amb a 3, Amb a 3.0101,

Amb a 4, Amb a 4.0101, Amb a 5, Amb a 5.0101, Amb a 6, Amb a 6.0101, Amb a 7, Amb a 7.0101, Amb a 8, Amb a 8.0101, Amb a 8.0102, Amb a 9, Amb a 9.0101, Amb a 9.0102, CPI Amb a, Amb p 1, Amb p 5, Amb p 5.0101, Amb p 5.0201, Amb t 5, Amb t 5.0101, Amb t 8), видов Ammonothea (Amm h 7, Amm h 7.0101), видов Anadara (Ana br 1), видов Ananas (Ana c 1, Ana c 1.0101, Ana c 2, Ana c 2.0101, Ana c 2.0101 (MUXF3)), видов Anas (Ana ca 1), видов Anarhichas (Ana l 1), видов Anacardium (Ana o 1, Ana o 1.0101, Ana o 1.0102, Ana o 2, Ana o 2.0101, Ana o 3, Ana o 3.0101), видов Anas (Ana p 1, Ana p 2, Ana p 3), видов Anguilla (Ang a 1, Ang j 1), видов Anisakis (Ani s 1, Ani s 1.0101, Ani s 10, Ani s 10.0101, Ani s 11, Ani s 11.0101, Ani s 12, Ani s 12.0101, Ani s 2, Ani s 2.0101, Ani s размером 24 кДа, Ani s 3, Ani s 3.0101, Ani s 4, Ani s 4.0101, Ani s 5, Ani s 5.0101, Ani s 6, Ani s 6.0101, Ani s 7, Ani s 7.0101, Ani s 8, Ani s 8.0101, Ani s 9, Ani s 9.0101, CCOS3 Ani s, цитохром B Ani s, FBPP Ani s, NADHDS4L Ani s, NARaS Ani s, PEPB Ani s, тропонин Ani s), видов Annona (хитиназа Ann c), видов Anopheles (Ano da 17, Ano da 17.0101, Ano da 27, Ano da 27.0101, Ano da 7, Ano da 7.0101, Ano g 7, Ano g 7.0101), видов Anser (Ans a 1, Ans a 2, Ans a 3, Ans in 1), видов Anthoxanthum (Ant o 1, Ant o 1.0101, Ant o 12, Ant o 13, Ant o 2, Ant o 4, Ant o 5, Ant o 6, Ant o 7), видов Apis (Api c 1, Api c 1.0101, Api c 10, Api c 2, Api c 4, Api d 1, Api d 1.0101, Api d 4, Api fl 4), видов Apium (Api g 1, Api g 1.0101, Api g 1.0201, Api g 2, Api g 2.0101, Api g 3, Api g 3.0101, Api g 4, Api g 4.0101, Api g 5, Api g 5.0101, Api g 6, Api g 6.0101), видов Apis (Api m 1, Api m 1.0101, Api m 10, Api m 10.0101, Api m 11, Api m 11.0101, Api m 11.0201, Api m размером 13 кДа, Api m 2, Api m 2.0101, Api m 3, Api m 3.0101, Api m 4, Api m 4.0101, Api m 5, Api m 5.0101, Api m 6, Api m 6.0101, Api m 7, Api m 7.0101, Api m 8, Api m 8.0101, Api m 9, Api m 9.0101, A1-A2 Api m, A1-A2-A3 Api m, апальбумин 1 Api m, апальбумин 2 Api m, Api me 1, Api me 4), видов Arachis (Ara d 2, Ara d 6, Ara f 3, Ara f 4, Ara h 1, Ara h 1.0101, Ara h 10, Ara h 10.0101, Ara h 10.0102, Ara h 11, Ara h 11.0101, Ara h 2, Ara h 2.0101, Ara h 2.0102, Ara h 2.0201, Ara h 2.0202, Ara h 3, Ara h 3.0101, Ara h 4, Ara h 4.0101, Ara h 5, Ara h 5.0101, Ara h 6, Ara h 6.0101, Ara h 7, Ara h 7.0101, Ara h 7.0201, Ara h 7.0202, Ara h 8, Ara h 8.0101, Ara h 8.0201, Ara h 9, Ara h 9.0101, Ara h 9.0201, агглютинин Ara h, леозин Ara h размером 18 кДа, Ara i 2, Ara i 6), видов Arabidopsis (Ara t 3, Ara t 8, GLP Ara t), видов Archosargus (Arc pr 1), видов Archaeopotamobius (Arc s 8, Arc s 8.0101), видов Aequipecten (Arg i 1), видов Argas (Arg r 1, Arg r 1.0101), видов Ariopsis (Ari fe 1), видов Armoracia (HRP Arm r), видов Arrhenatherum (Arr e 1, Arr e 5), видов Artemisia (Art a 1, Art ap 1), видов Artemia (Art fr 1, Art fr 1.0101, Art fr 5, Art fr 5.0101), видов Arthrobacter (CO Art gl), видов Achorion (Art gy 7), видов Artocarpus (Art h размером 17 кДа, Art h 4), видов Arthrospira (бета-фикоцианин Art pl), видов Artemisia (Art v 1, Art v 1.0101, Art v 1.0102, Art v 1.0103, Art v 1.0104, Art v 1.0105, Art v 1.0106, Art v 1.0107, Art v 2, Art v 2.0101, Art v 3, Art v 3.0101, Art v 3.0201, Art v 3.0202, Art v 3.0301, Art v 4, Art v 4.0101, Art v 4.0201, Art v размером 47 кДа, Art v 5, Art v 5.0101, Art v 6, Art v 6.0101, Art v размером 60 кДа), видов Arthroderma (Art va 4), видов Ascaris (Asc l 3, Asc l 3.0101, Asc l 3.0102, Asc l размером 34 кДа, Asc s 1, Asc s 1.0101, Asc s 3, Asc s 3.0101, GST Asc s), видов Aspergillus (глюкоамилаза Asp aw, Asp c 22, Asp f 1, Asp f 1.0101, Asp f 10, Asp f 10.0101, Asp f 11, Asp f 11.0101, Asp f 12, Asp f 12.0101, Asp f 13, Asp f 13.0101, Asp f 15, Asp f 15.0101, Asp f 16, Asp f 16.0101, Asp f 17, Asp f 17.0101, Asp f 18, Asp f 18.0101, Asp f 2, Asp f 2.0101, Asp f 22, Asp f 22.0101, Asp f 23, Asp f 23.0101, Asp f 27, Asp f 27.0101, Asp f 28, Asp f 28.0101, Asp f 29, Asp f 29.0101, Asp f 3, Asp f 3.0101, Asp f 34, Asp f 34.0101, Asp f 4, Asp f 4.0101, Asp f 5, Asp f 5.0101, Asp f размером 56 кДа, Asp f 6, Asp f 6.0101, Asp f 7, Asp f 7.0101, Asp f 8, Asp f 8.0101, Asp f 9, Asp f 9.0101, AfCalAp Asp f, AT_V Asp f, каталаза Asp f, хитозаназа Asp f, CP Asp f, DPPV Asp f, FDH Asp f, гамма-актин Asp f, глюкозидаза Asp f, GPI Asp f, GST Asp f, GT Asp f, IAO Asp f, IPMI Asp f, LPL1 Asp f, LPL3 Asp f, маннозидаза Asp f, MDH Asp f, PL Asp f, PUP Asp f, RPS3 Asp f, SXR Asp f, Asp fl 13, Asp fl 13.0101, Asp fl 18, Asp fl 2, Asp fl 21, Asp fl 3, Asp fl 4,

Asp fl 7, Asp fl 8, Asp fl 9, сеапроза Asp ме, Asp n 14, Asp n 14.0101, Asp n 18, Asp n 18.0101, Asp n 25, Asp n 25.0101, Asp n 30, глюкоамилаза Asp n, гемицеллюлаза Asp n, пектиназа Asp n, Asp o 13, Asp o 13.0101, Asp o 21, Asp o 21.0101, Asp o 3, Asp o 4, Asp o 7, Asp o 8, лактаза Asp o, липаза Asp o, Asp oc 13, Asp r 1, AP Asp sa, глюкоамилаза Asp sp, глюкозооксидаза Asp sp, PL Asp sp, PME Asp sp, Asp sy 13, Asp v 13, Asp v 13.0101, каталаза A Asp v, енолаза Asp v, GAPDH Asp v, MDH Asp v, SXR Asp v), видов Asparagus (Aspa o 1, Aspa o 1.01, Aspa o 1.02, Aspa o размером 17 кДа, Aspa o 4), видов Aspergillus (Aspe ni 2, Aspe ni 3, Aspe ni 4, Aspe ni 7, Aspe ni 8, Aspe ni 9), видов Avena (Ave s 1, Ave s 12, Ave s 13, Ave s 2, Ave s 4, Ave s 5, Ave s 7), видов Babylonia (Bab ja 1), видов Bacillus (субтилизин Bac al, субтилизин Bac cl, субтилизин Bac l, аА Bac li, субтилизин Bac li), видов Bactrocera (Bac ol 27, Bac ol 27.0101), видов Bacillus (аА1 Bac sp, аА3 Bac sp, декарбоксилаза Bac sp, атуМ Bac st, субтилизин Bac su, Cry1Ab Bac t, Cry1Fa Bac t, Cry3Bb1 Bac t, Cry9c Bac t), видов Bagre (Bag ма 1), видов Balistes (Bal ca 1), видов Balanus (Bal r 1, Bal r 1.0101), видов Beauveria (Ald Bea b, Enol Bea b, f2 Bea b, Hex Bea b), видов Bertholletia (Ber e 1, Ber e 1.0101, Ber e 2, Ber e 2.0101), видов Beryx (Ber sp 1), видов Betula (Bet ab 1, Bet al 1, Bet ch 1, Bet co 1, Bet da 1, Bet gr 1, Bet hu 1, Bet le 1, Bet me 1, Bet n 1, Bet p 1, Bet pa 1, Bet po 1, Bet pu 1, Bet pu 2, Bet pu 4, Bet pu 6, Bet pu 7, Bet sc 1, Bet ut 1, Bet v 1, B1-B1-B1 Bet v 1, fv Mal 4x Bet v 1, Bet v 1.0101, Bet v 1.0102, Bet v 1.0103, Bet v 1.0201, Bet v 1.0301, Bet v 1.0401, Bet v 1.0402, Bet v 1.0501, Bet v 1.0601, Bet v 1.0602, Bet v 1.0701, Bet v 1.0801, Bet v 1.0901, Bet v 1.1001, Bet v 1.1101, Bet v 1.1201, Bet v 1.1301, Bet v 1.1401, Bet v 1.1402, Bet v 1.1501, Bet v 1.1502, Bet v 1.1601, Bet v 1.1701, Bet v 1.1801, Bet v 1.1901, Bet v 1.2001, Bet v 1.2101, Bet v 1.2201, Bet v 1.2301, Bet v 1.2401, Bet v 1.2501, Bet v 1.2601, Bet v 1.2701, Bet v 1.2801, Bet v 1.2901, Bet v 1.3001, Bet v 1.3101, Bet v 2, Bet v 2.0101, Bet v 3, Bet v 3.0101, Bet v 4, Bet v 4.0101, Bet v 6, Bet v 6.0101, Bet v 6.0102, Bet v 7, Bet v 7.0101, Bet v 8, глюканаза Bet v), видов Beta (Beta v 1, Beta v 1.0101, Beta v 2, Beta v 2.0101), видов Blattella (Bla g 1, Bla g 1.0101, Bla g 1.0102, Bla g 1.0103, Bla g 1.0201, Bla g 1.0202, Bla g 2, Bla g 2.0101, Bla g 2.0201, Bla g размером 36 кДа, Bla g 4, Bla g 4.0101, Bla g 4.0201, Bla g 5, Bla g 5.0101, Bla g 5.0201, Bla g 6, Bla g 6.0101, Bla g 6.0201, Bla g 6.0301, Bla g 7, Bla g 7.0101, Bla g 8, Bla g 8.0101, Bla g 9, енолаза Bla g, GSTD1 Bla g, RACK1 Bla g, TPI Bla g, трипсин Bla g, вителлогенин Bla g), видов Blatta (Bla o 1, Bla o 7), видов Blomia (Blo t 1, Blo t 1.0101, Blo t 1.0201, Blo t 10, Blo t 10.0101, Blo t 10.0102, Blo t 11, Blo t 11.0101, Blo t 12, Blo t 12.0101, Blo t 12.0102, Blo t 13, Blo t 13.0101, Blo t 14, Blo t 15, Blo t 18, Blo t 19, Blo t 19.0101, Blo t 2, Blo t 2.0101, Blo t 2.0102, Blo t 2.0103, Blo t 20, Blo t 21, Blo t 21.0101, Blo t 3, Blo t 3.0101, Blo t 4, Blo t 4.0101, Blo t 5, Blo t 5.0101, Blo t 6, Blo t 6.0101, Blo t 7, Blo t 8, Blo t 9, HSP70 Blo t), видов Bombyx (Bom ar 4, Bom hy 4, Bom p 1, Bom p 1.0101, Bom p 2, Bom p 3, Bom p 4, Bom p 4.0101, Bom t 1, Bom t 1.0101, Bom t 4, Bom t 4.0101), видов Bombyx (Bomb m 1, Bomb m 1.0101, Bomb m 7, Bomb m 7.0101, Bomb m 7.0102, Bomb m 7.0103, Bomb m 7.0104, Bomb m 7.0105, Bomb m 7.0106), видов Boophilus (Boo m 1, Boo m 7, Boo m 7.0101), видов Bos (Bos d 2, Bos d 2.0101, Bos d 2.0102, Bos d 2.0103, Bos d 3, Bos d 3.0101, Bos d 4, Bos d 4.0101, Bos d 5, Bos d 5.0101, Bos d 5.0102, Bos d 6, Bos d 6 (MDA), Bos d 6.0101, Bos d 7, Bos d 7.0101, Bos d 8, альфа-S1 Bos d 8, альфа-S2 Bos d 8, бета Bos d 8, каппа Bos d 8, альфа-2I Bos d, альфа-2I.0101 Bos d, химозин Bos d, фибрин Bos d, желатин Bos d, HG Bos d, инсулин Bos d, лактоферрин Bos d, лактопероксидаза Bos d, миоглобин Bos d, OBP Bos d, OSCP Bos d, фосвитин Bos d, PLA2 Bos d, PRVB Bos d, тромбин Bos d, TI Bos d, ALA Bos gr, миоглобин Bos gr), видов Bothrops (Bot as 1, Bot at 1), видов Bouteloua (Bou g 1), видов кусающих насекомых (Bov ov 1), видов Brama (Bra du 1), видов Brassica (Bra j 1, Bra j 1.0101, Bra n 1, Bra n 1.0101, Bra n 4, Bra n 7, Bra n 8, PG Bra n, Bra ni 8, Bra o 3, Bra o 3.0101, Bra r 1, Bra r 1.0101, Bra r 2, Bra r 2.0101, Bra r 3, Bra r 4, Bra r 7), видов Bromus (Bro a 1, Bro a 4), видов Brosme (Bro br 1), видов

Bromus (Bro i 1, Bro i 5, Bro i 7), видов Brugia (Bru m 3, Bru m 3.0101, Bru m Bm33), видов Bubalus (ALA Bub b, BLG Bub b, казеин Bub b, альфа-S1-казеин Bub b, альфа-S2-казеин Bub b, бета-казеин Bub b, каппа-казеин Bub b), видов Caenorhabditis (Cae b 3, Cae b 3.0101, Cae br 3, Cae br 3.0101, Cae e 3, Cae e 3.0101, Cae e 3.0102, Cae re 13, Cae re 13.0101), видов Cajanus (Caj c 1), видов Caligus (Cal cl 1, Cal cl 1.0101, Cal cl 1.0102), видов Calamus (Cal le 1), видов Callinectes (Cal s 2), видов Camelus (ALA Cam d, казеин Cam d, альфа-S1-казеин Cam d, альфа-S2-казеин Cam d, бета-казеин Cam d, каппа-казеин Cam d), видов Camponotus (Cam fl 7, Cam fl 7.0101), видов Canis (Can f 1, Can f 1.0101, Can f 2, Can f 2.0101, Can f 3, Can f 3.0101, Can f 4, Can f 4.0101, Can f 5, Can f 5.0101, Can f 6, Can f 6.0101, Feld1-подобный белок Can f, Homs2-подобный белок Can f, фосвитин Can f, TCTP Can f), видов Canthidermis (Can ma 1), видов Cancer (Can mg 2, Can p 1), видов Cannabis (Can s 3), видов Candida (Cand a 1, Cand a 1.0101, Cand a 3, Cand a 3.0101, CAAP Cand a, CyP Cand a, енолаза Cand a, FPA Cand a, MnSOD Cand a, PGK Cand a, Cand b 2, Cand b 2.0101, FDH Cand b, липаза Cand r), видов Capsicum (Cap a 1, Cap a 1.0101, Cap a размером 17 кДа, Cap a 2, Cap a 2.0101, Cap a размером 30 кДа, глюканаза Cap a, Cap ch размером 17 кДа), видов Caprella (Cap e 1), видов Capra (ALA Cap h, BLG Cap h, казеин Cap h, альфа-S1-казеин Cap h, альфа-S2-казеин Cap h, бета-казеин Cap h, каппа-казеин Cap h, GSA Cap h), видов Capitulum (Cap m 1), видов Carassius (Car au 1), видов Carpinus (Car b 1, Car b 1.0101, Car b 1.0102, Car b 1.0103, Car b 1.0104, Car b 1.0105, Car b 1.0106, Car b 1.0107, Car b 1.0108, Car b 1.0109, Car b 1.0110, Car b 1.0111, Car b 1.0112, Car b 1.0113, Car b 1.0201, Car b 1.0301, Car b 1.0302, Car b 2, Car b 4), видов Caranx (Car cr 1), видов Carya (Car i 1, Car i 1.0101, Car i 2, Car i 4, Car i 4.0101), видов Carcinus (Car ma 2), видов Caryota (Car mi 2), видов Carica (Car p 1, хитиназа Car p, химопапаин Car p, эндопротеиназа Car p), видов Castanea (Cas c размером 24 кДа, Cas s 1, Cas s 1.0101, Cas s 1.0102, Cas s 1.0103, Cas s 2, Cas s 5, Cas s 5.0101, Cas s 8, Cas s 8.0101, Cas s 9, Cas s 9.0101), видов Catharanthus (Cat r 1, Cat r 1.0101, Cat r размером 17 кДа, Cat r 2), видов Caulolatilus (Cau ch 1), видов Cavia (Cav p 1, Cav p 1.0101, Cav p 2, Cav p 2.0101, Cav p 3, Cav p 3.0101, желатин Cav p, GSA Cav p), видов Centropristis (Cen s 1), видов Cephalopholis (Cep so 1), видов Charybdis (Cha f 1, Cha f 1.0101), видов Chaetodipterus (Cha fa 1), видов Chamaecyparis (Cha o 1, Cha o 1.0101, Cha o 2, Cha o 2.0101), видов Chenopodium (Che a 1, Che a 1.0101, Che a 2, Che a 2.0101, Che a 3, Che a 3.0101), видов Chironomus (Chi k 1, Chi k 10, Chi k 10.0101), видов Chinchilla (Chi l размером 21 кДа, а, Chi l размером 21 кДа, b), видов Chionoecetes (Chi o 1, Chi o 1.0101, Chi o 2, Chi o 4, Chi o 6, альфа-актин Chi o, SERCA Chi o), видов Chironomus (Chi t 1, Chi t 1.0101, Chi t 1.0201, Chi t 2, Chi t 2.0101, Chi t 2.0102, Chi t 3, Chi t 3.0101, Chi t 4, Chi t 4.0101, Chi t 5, Chi t 5.0101, Chi t 6, Chi t 6.0101, Chi t 6.0201, Chi t 7, Chi t 7.0101, Chi t 8, Chi t 8.0101, Chi t 9, Chi t 9.0101), видов Chlamys (Chl n 1), видов Chloephaga (Chl pi 1), видов Chortoglyphus (Cho a 10), видов Chrysomela (Chr tr 7, Chr tr 7.0101), видов Cicer (2S-альбумин Cic a, альбумин Cic a), видов Cichorium (Cic i 1), видов Cimex (нитрофорин Cim l), видов Citrus (Cit l 1, Cit l 3, Cit l 3.0101), видов Citrullus (Cit la 2, MDH Cit la, TPI Cit la), видов Citrus (Cit r 3, Cit r 3.0101, Cit s 1, Cit s 1.0101, Cit s 2, Cit s 2.0101, Cit s 3, Cit s 3.0101, Cit s 3.0102, IFR Cit s), видов Cladosporium (Cla c 14, Cla c 14.0101, Cla c 9, Cla c 9.0101, Cla h 1, Cla h 10, Cla h 10.0101, Cla h 12, Cla h 12.0101, Cla h 2, Cla h 2.0101, Cla h размером 42 кДа, Cla h 5, Cla h 5.0101, Cla h 6, Cla h 6.0101, Cla h 7, Cla h 7.0101, Cla h 8, CSP Cla h 8, Cla h 8.0101, Cla h 9, Cla h 9.0101, abH Cla h, GST Cla h, HCh1 Cla h, HSP70 Cla h, NTF2 Cla h, TCTP Cla h), видов Clostridium (коллагеназа Clo hi, токсин Clo t), видов Clupea (Clu h 1, Clu h 1.0101, Clu h 1.0201, Clu h 1.0301), видов Cocos (Coc n 2, Coc n 4, Coc n 5), видов Coccidioides (Coc po 8), видов Coffea (Cof a 1, Cof a 1.0101), видов Columba (PSA Col l), видов Coprinus (Cop c 1, Cop c 1.0101, Cop c 2, Cop c 2.0101, Cop c 3, Cop c 3.0101, Cop c 4, Cop c 5, Cop c 5.0101, Cop c 6, Cop c 7, Cop c

7.0101), видов *Corylus* (Cor a 1, Cor a 1.0101, Cor a 1.0102, Cor a 1.0103, Cor a 1.0104, Cor a 1.0201, Cor a 1.0301, Cor a 1.0401, Cor a 1.0402, Cor a 1.0403, Cor a 1.0404, Cor a 10, Cor a 10.0101, Cor a 11, Cor a 11.0101, Cor a 12, Cor a 12.0101, Cor a 13, Cor a 13.0101, Cor a 14, Cor a 14.0101, Cor a 2, Cor a 2.0101, Cor a 2.0102, Cor a 8, Cor a 8.0101, Cor a 9, Cor a 9.0101), видов *Corynebacterium* (токсоид Cor d), видов *Corylus* (Cor he 1), видов *Coryphaena* (Cor hi 1), видов *Coriandrum* (Cor s 1, Cor s размером 11 кДа, Cor s 2), видов *Cotoneaster* (Cot l 3), видов *Crangon* (Cra c 1, Cra c 1.0101, Cra c 2, Cra c 2.0101, Cra c 4, Cra c 4.0101, Cra c 5, Cra c 5.0101, Cra c 6, Cra c 6.0101, Cra c 8, Cra c 8.0101), видов *Crassostrea* (Cra g 1), видов *Cricetus* (HSA Cri c), видов *Crivellia* (Cri pa 1), видов *Crocus* (Cro s 1, Cro s 1.0101, Cro s 2, Cro s 2.0101, Cro s 3, Cro s 3.01, Cro s 3.02), видов *Cryptomeria* (Cry j 1, Cry j 1.0101, Cry j 1.0102, Cry j 1.0103, Cry j 2, Cry j 2.0101, Cry j 2.0102, Cry j 3, Cry j 3.1, Cry j 3.2, Cry j 3.3, Cry j 3.4, Cry j 3.5, Cry j 3.6, Cry j 3.7, Cry j 3.8, Cry j 4, AP Cry j, хитиназа Cry j, CPA9 Cry j, IFR Cry j, LTP Cry j, P1-P2 Cry j), видов *Cryphonectria* (AP Cry p), видов *Ctenocephalides* (Cte f 1, Cte f 1.0101, Cte f 2, Cte f 2.0101, Cte f 3, Cte f 3.0101), видов *Ctenopharyngodon* (Cte id 1), видов *Cucumis* (Cuc m 1, Cuc m 1.0101, Cuc m 2, Cuc m 2.0101, Cuc m 3, Cuc m 3.0101, Lec17 Cuc m, MDH Cuc m), видов *Cucurbita* (Cuc ma размером 18 кДа, Cuc ma 2, Cuc p 2, AscO Cuc p), видов *Cucumis* (Cuc s 2), видов *Culicoides* (Cul n 1, Cul n 10, Cul n 11, Cul n 2, Cul n 3, Cul n 4, Cul n 5, Cul n 6, Cul n 7, Cul n 8, Cul n 9, HSP70 Cul n), видов *Culex* (Cul q размером 28 кДа, Cul q размером 35 кДа, Cul q 7, Cul q 7.0101, Cul q 7.0102), видов *Culicoides* (Cul so 1), видов *Cuminum* (Cum c 1, Cum c 2), видов *Cupressus* (Cup a 1, Cup a 1.0101, Cup a 1.02, Cup a 2, Cup a 3, Cup a 4, Cup a 4.0101, Cup s 1, Cup s 1.0101, Cup s 1.0102, Cup s 1.0103, Cup s 1.0104, Cup s 1.0105, Cup s 3, Cup s 3.0101, Cup s 3.0102, Cup s 3.0103, Cup s 8), видов *Cochliobolus* (Cur l 1, Cur l 1.0101, Cur l 2, Cur l 2.0101, Cur l 3, Cur l 3.0101, Cur l 4, Cur l 4.0101, ADH Cur l, GST Cur l, MnSOD Cur l, оризин Cur l, Trx Cur l, ZPS1 Cur l), видов *Cyanochen* (Cya cy 1), видов *Cynoscion* (Cyn ar 1), видов *Cynosurus* (Cyn cr 1, Cyn cr 5), видов *Cynodon* (Cyn d 1, Cyn d 1.0101, Cyn d 1.0102, Cyn d 1.0103, Cyn d 1.0104, Cyn d 1.0105, Cyn d 1.0106, Cyn d 1.0107, Cyn d 1.0201, Cyn d 1.0202, Cyn d 1.0203, Cyn d 1.0204, Cyn d 10, Cyn d 11, Cyn d 12, Cyn d 12.0101, Cyn d 13, Cyn d 15, Cyn d 15.0101, Cyn d 2, Cyn d 22, Cyn d 22.0101, Cyn d 23, Cyn d 23.0101, Cyn d 24, Cyn d 24.0101, Cyn d 4, Cyn d 5, Cyn d 6, Cyn d 7, Cyn d 7.0101), видов *Cynoscion* (Cyn ne 1), видов *Cynomys* (липокалин Cyn sp), видов *Cyprinus* (Cyp c 1, Cyp c 1.01, Cyp c 1.02), видов *Daboia* (Dab ru 1), видов *Dactylis* (Dac g 1, Dac g 1.01, Dac g 1.0101, Dac g 1.02, Dac g 12, Dac g 13, Dac g 2, Dac g 2.0101, Dac g 3, Dac g 3.0101, Dac g 4, Dac g 4.0101, Dac g 5, Dac g 5.0101, Dac g 7), видов *Dama* (CSA Dam d), видов *Danio* (Dan re 1, Dan re 2, альфа-2I Dan re, CK Dan re), видов *Dasyatis* (Das ak 1, Das am 1, Das sa 1), видов *Daucus* (Dau c 1, Dau c 1.0101, Dau c 1.0102, Dau c 1.0103, Dau c 1.0104, Dau c 1.0105, Dau c 1.0201, Dau c 1.0301, Dau c 3, Dau c 4, Dau c 4.0101, CyP Dau c), видов *Decapterus* (Dec ru 1), видов *Dendronephthya* (Den n 1, Den n 1.0101), видов *Dermatophagoides* (Der f 1, Der f 1.0101, Der f 1.0102, Der f 1.0103, Der f 1.0104, Der f 1.0105, Der f 1.0106, Der f 1.0107, Der f 1.0108, Der f 1.0109, Der f 1.0110, Der f 10, Der f 10.0101, Der f 10.0102, Der f 11, Der f 11.0101, Der f 13, Der f 13.0101, Der f 14, Der f 14.0101, Der f 15, Der f 15.0101, Der f 16, Der f 16.0101, Der f 17, Der f 17.0101, Der f 18, Der f 18.0101, Der f 2, Der f 2.0101, Der f 2.0102, Der f 2.0103, Der f 2.0104, Der f 2.0105, Der f 2.0106, Der f 2.0107, Der f 2.0108, Der f 2.0109, Der f 2.0110, Der f 2.0111, Der f 2.0112, Der f 2.0113, Der f 2.0114, Der f 2.0115, Der f 2.0116, Der f 2.0117, Der f 20, Der f 21, Der f 22, Der f 22.0101, Der f 3, Der f 3.0101, Der f 4, Der f 5, Der f 6, Der f 6.0101, Der f 7, Der f 7.0101, Der f 8, Der f 9, HSP70 Der f), видов *Dermanyssus* (Der g 10, Der g 10.0101), видов *Dermatophagoides* (Der m 1, Der m 1.0101, Der p 1, Der p 1.0101, Der p 1.0102, Der p 1.0103, Der p 1.0104, Der p 1.0105, Der p 1.0106, Der p 1.0107, Der p 1.0108, Der p 1.0109, Der p 1.0110, Der p 1.0111, Der p 1.0112, Der p 1.0113, Der p 1.0114, Der p

1.0115, Der p 1.0116, Der p 1.0117, Der p 1.0118, Der p 1.0119, Der p 1.0120, Der p 1.0121, Der p 1.0122, Der p 1.0123, Der p 1.0124, Der p 10, Der p 10.0101, Der p 10.0102, Der p 10.0103, Der p 11, Der p 11.0101, Der p 13, Der p 14, Der p 14.0101, Der p 15, Der p 18, Der p 2, Der p 2.0101, Der p 2.0102, Der p 2.0103, Der p 2.0104, Der p 2.0105, Der p 2.0106, Der p 2.0107, Der p 2.0108, Der p 2.0109, Der p 2.0110, Der p 2.0111, Der p 2.0112, Der p 2.0113, Der p 2.0114, Der p 2.0115, Der p 20, Der p 20.0101, Der p 21, Der p 21.0101, Der p 23, Der p 23.0101, Der p 3, Der p 3.0101, Der p 4, Der p 4.0101, Der p 5, Der p 5.0101, Der p 5.0102, Der p 6, Der p 6.0101, Der p 7, Der p 7.0101, Der p 8, Der p 8.0101, Der p 9, Der p 9.0101, Der p 9.0102, P1-P2 Der p, P2-P1 Der p, Der s 1, Der s 2, Der s 3), видов *Dianthus* (RIP Dia c), видов *Dicranopteris* (2S-альбумин Dic l), видов *Diospyros* (Dio k размером 17 кДа, Dio k 4, IFR Dio k), видов *Dioscorea* (TSP Dio p), видов *Diplodus* (Dip ho 1), видов *Distichlis* (Dis s 1, Dis s 7), видов *Ditrema* (Dit te 1), видов *Dolichovespula* (Dol a 1, Dol a 2, Dol a 5, Dol a 5.0101), видов *Dolichos* (агглютинин Dol b), видов *Dolichovespula* (Dol m 1, Dol m 1.0101, Dol m 1.02, Dol m 2, Dol m 2.0101, Dol m 5, Dol m 5.0101, Dol m 5.02), видов *Drosophila* (Dro an 7, Dro an 7.0101, Dro er 7, Dro er 7.0101, Dro er 7.0102, Dro gr 7, Dro gr 7.0101, Dro gr 7.0102, Dro m 7, Dro m 7.0101, Dro m 7.0102, Dro m 7.0103, Dro m 7.0104, Dro m 7.0105, Dro m 7.0106, Dro m 7.0107, Dro m 7.0108, Dro m 7.0109, Dro m 7.0110, Dro m 7.0111, Dro m 7.0112, Dro m 7.0113, Dro m 9, MnSOD Dro m, Dro mo 7, Dro mo 7.0101, Dro pp 7, Dro pp 7.0101, Dro se 7, Dro se 7.0101, Dro si 7, Dro si 7.0101, Dro si 7.0102, Dro vi 7, Dro vi 7.0101, Dro wi 7, Dro wi 7.0101, Dro y 7, Dro y 7.0101, Dro y 7.0102, Dro y 7.0103), видов *Echium* (цитохром C Ech p), видов *Elaeis* (Ela g 2, Ela g Bd размером 31 кДа), видов *Elops* (Elo sa 1), видов *Embellisia* (Emb a 1, Emb i 1, Emb nz 1, Emb t 1), видов *Engraulis* (Eng e 1), видов *Enteractopus* (Ent d 1), видов *Epinephelus* (Epi bl 1, Epi co 1, Epi fl 1, Epi mc 1, Epi mo 1), видов *Epicoccutum* (Epi p 1, Epi p 1.0101, Epi p размером 12 кДа, GST Epi p), видов *Epinephelus* (Epi po 1, Epi un 1), видов *Equisetum* (Equ a размером 17 кДа), видов *Equus* (Equ as 4, DSA Equ as, Equ bu 4, Equ c 1, Equ c 1.0101, Equ c 2, Equ c 2.0101, Equ c 2.0102, Equ c 3, Equ c 3.0101, Equ c 4, Equ c 4.0101, Equ c 5, Equ c 5.0101, ALA Equ c, BLG Equ c, казеин Equ c, бета-казеин Equ c, каппа-казеин Equ c, PRVB Equ c, Equ he 4, ZSA Equ z), видов *Erimacrus* (Eri i 1, Eri i 1.0101, Eri i 1.0102), видов *Eriocheir* (Eri s 1, Eri s 1.0101, Eri s 2), видов *Erwinia* (аспарагиназа Erw ch), видов *Escherichia* (аспарагиназа Esc c, бета-GAL Esc c), видов *Esox* (Eso l 1), видов *Euphausia* (Eup p 1, Eup p 1.0101), видов *Euphasia* (Eup s 1, Eup s 1.0101), видов *Euroglyphus* (Eur m 1, Eur m 1.0101, Eur m 1.0102, Eur m 1.0103, Eur m 10, Eur m 14, Eur m 14.0101, Eur m 2, Eur m 2.0101, Eur m 2.0102, Eur m 3, Eur m 3.0101, Eur m 4, Eur m 4.0101), видов *Evynnis* (Evy j 1), видов *Fagopyrum* (Fag e 1, Fag e 1.0101, Fag e размером 10 кДа, Fag e размером 19 кДа, Fag e 2, Fag e 2.0101, TI Fag e), видов *Fagus* (Fag s 1, Fag s 1.0101, Fag s 2, Fag s 4), видов *Fagopyrum* (Fag t 1, Fag t размером 10 кДа, Fag t 2, Fag t 2.0101), видов *Felis* (Fel d 1, Fel d 1.0101, Fel d 2, Fel d 2.0101, Fel d 3, Fel d 3.0101, Fel d 4, Fel d 4.0101, Fel d 5, Fel d 5.0101, Fel d 6, Fel d 6.0101, Fel d 7, Fel d 7.0101, Fel d 8, Fel d 8.0101, IgG Fel d), видов *Fenneropenaeus* (Fen c 1, Fen c 2, Fen me 1, Fen me 1.0101), видов *Festuca* (Fes e 1, Fes e 13, Fes e 4, Fes e 5, Fes e 7, Fes p 1, Fes p 13, Fes p 4, Fes p 4.0101, Fes p 5, Fes r 1, Fes r 5), видов *Ficus* (Fic c размером 17 кДа, Fic c 4, фицин Fic c), видов *Foeniculum* (Foe v 1, Foe v 2), видов *Forsythia* (For s 1), видов *Forcipomyia* (For t 1, For t 1.0101, For t 2, For t 2.0101, For t 7, FPA For t, миозин For t, TPI For t), видов *Fragaria* (Fra a 1, Fra a 1.0101, Fra a 3, Fra a 3.0101, Fra a 3.0102, Fra a 3.0201, Fra a 3.0202, Fra a 3.0203, Fra a 3.0204, Fra a 3.0301, Fra a 4, Fra a 4.0101, Fra c 1), видов *Fraxinus* (Fra e 1, Fra e 1.0101, Fra e 1.0102, Fra e 1.0201, Fra e 12, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 9), видов *Fragaria* (Fra v 1), видов *Fusarium* (Fus c 1, Fus c 1.0101, Fus c 2, Fus c 2.0101, Fus c 3, Fus s 1, Fus s размером 45 кДа, липаза Fus sp), видов *Gadus* (Gad c 1, Gad c 1.0101, APDH Gad c, Gad m 1, Gad m 1.0101, Gad m 1.0102, Gad m 1.0201, Gad m 1.0202, Gad m размером 45 кДа,

желатин Gad m, Gad ma 1), видов Gallus (Gal d 1, Gal d 1.0101, Gal d 2, Gal d 2.0101, Gal d 3, Gal d 3.0101, Gal d 4, Gal d 4.0101, Gal d 5, Gal d 5.0101, Gal d 6, Gal d 6.0101, Apo I Gal d, Apo VI Gal d, GPI Gal d, HG Gal d, IgY Gal d, L-PGDS Gal d, овомуцин Gal d, фосвитин Gal d, PRVB Gal d, Gal la 4), видов Galleria (Gal m размером 18 кДа, Gal m размером 24 кДа), видов Gallus (Gal so 4), видов Gammarus (TM Gam s), видов Gelonium (RIP Gel m), видов Geothelphusa (Geo de 1), видов Glossina (Glo m 5, Glo m 5.0101, Glo m 7, Glo m 7.0101, Glo m 7.0102, Glo m 7.0103), видов Glycine (Bd30K Gly a, Bd30K Gly ar, Bd30K Gly ca, Bd30K Gly cl, Bd30K Gly cu, Bd30K Gly cy), видов Glycyphagus (Gly d 10, Gly d 10.0101, Gly d 13, Gly d 2, Gly d 2.0101, Gly d 2.0201, Gly d 2.03, L1 Gly d 2/Lep d 2, L2 Gly d 2/Lep d 2, L3 Gly d 2/Lep d 2, L4 Gly d 2/Lep d 2, R1 Gly d 2/Lep d 2, R2 Gly d 2/Lep d 2, R3 Gly d 2/Lep d 2, R4 Gly d 2/Lep d 2, R5 Gly d 2/Lep d 2, Gly d 20, Gly d 3, Gly d 5, Gly d 5.01, Gly d 5.02, Gly d 7, Gly d 8), видов Glycine (Bd30K Gly f, Bd30K Gly l, Gly m 1, Gly m 1.0101, Gly m 1.0102, Gly m 2, Gly m 2.0101, 2S-альбумин Gly m, Gly m 3, Gly m 3.0101, Gly m 3.0102, Gly m размером 39 кДа, Gly m 4, Gly m 4.0101, Gly m 5, Gly m 5.0101, Gly m 5.0201, Gly m 5.0301, Gly m 5.0302, Gly m размером 50 кДа, Gly m 6, Gly m 6.0101, Gly m 6.0201, Gly m 6.0301, Gly m 6.0401, Gly m 6.0501, Gly m размером 68 кДа, агглютинин Gly m, Bd28K Gly m, Bd30K Gly m, Bd60K Gly m, CPI Gly m, EAP Gly m, TI Gly m, Bd30K Gly mi, Bd30K Gly s, Bd30K Gly t, Bd30K Gly to), видов Gossypium (вицилин Gos h), видов Haemophilus (P6 Hae in), видов Haemaphysalis (Hae l 7, Hae l 7.0101, Hae q 7, Hae q 7.0101), видов Haliotis (Hal a 1, Hal d 1, Hal di 1, PM Hal di, Hal m 1, Hal m 1.0101, Hal r 1, Hal r размером 49 кДа, Hal ru 1), видов Harmonia (Har a 1, Har a 1.0101, Har a 2, Har a 2.0101), видов Harpegnaethos (Har sa 7, Har sa 7.0101, Har sa 7.0102), видов Helianthus (Hel a 1, Hel a 1.0101, Hel a 2, Hel a 2.0101, 2S-альбумин Hel a, Hel a 3, Hel a 3.0101, Hel a 4), видов Helix (Hel ap 1, Hel as 1, Hel as 1.0101), видов Heligmosomoides (Hel p 3, Hel p 3.0101), видов Helianthus (Hel tu 1), видов Hemanthias (Hem le 1), видов Hemifusus (Hem t 1), видов Heterodera (Het g 3, Het g 3.0101), видов Nevea (Hev b 1, Hev b 1.0101, Hev b 10, Hev b 10.0101, Hev b 10.0102, Hev b 10.0103, Hev b 11, Hev b 11.0101, Hev b 11.0102, Hev b 12, Hev b 12.0101, Hev b 13, Hev b 13.0101, Hev b 14, Hev b 14.0101, Hev b 2, Hev b 2.0101, Hev b 3, Hev b 3.0101, Hev b 4, Hev b 4.0101, Hev b 5, Hev b 5.0101, Hev b 6, Hev b 6.01, Hev b 6.02, Hev b 6.0202, Hev b 6.03, Hev b 7, Hev b 7.01, Hev b 7.02, Hev b 7.D2, Hev b 7.S2, Hev b 8, Hev b 8.0101, Hev b 8.0102, Hev b 8.0201, Hev b 8.0202, Hev b 8.0203, Hev b 8.0204, Hev b 9, Hev b 9.0101, цитратсвязывающий белок Hev b, GAPDH Hev b, HSP80 Hev b, IFR Hev b, субъединица протеасомы Hev b, ротамаза Hev b, SPI Hev b, Trx Hev b, UDPGP Hev b), видов Hexagrammos (Hex ot 1), видов Hippoglossus (Hip h 1), видов Hippoglossoides (Hip pl 1), видов Hippoglossus (Hip st 1), видов Hirudo (гирудин Hir me), видов Holcus (Hol l 1, Hol l 1.0101, Hol l 1.0102, Hol l 2, Hol l 4, Hol l 5, Hol l 5.0101, Hol l 5.0201), видов Holocnemus (Hol pl 9, гемоцианин Hol pl), видов Homarus (Hom a 1, Hom a 1.0101, Hom a 1.0102, Hom a 1.0103, Hom a 3, Hom a 3.0101, Hom a 4, Hom a 6, Hom a 6.0101, Hom g 1, Hom g 2), видов Homo (Hom s 1, Hom s 1.0101, Hom s 2, Hom s 2.0101, Hom s 3, Hom s 3.0101, Hom s 4, Hom s 4.0101, Hom s 5, Hom s 5.0101, AAT Hom s, АСТН Hom s, Hom s адалимумаб, ALA Hom s, альфа-актин Hom s, альфа-галактозидаза Hom s, APDH Hom s, арилсульфатаза B Hom s, казеин Hom s, CyP A Hom s, CyP B Hom s, CyP C Hom s, DSF70 Hom s, DSG3 Hom s, eIF6 Hom s, этанерцепт Hom s, фактор свертывания крови IX Hom s, фактор свертывания крови VII Hom s, фактор свертывания крови VIII Hom s, G-CSF Hom s, глюкоцереброзидаза Hom s, глюкозидаза Hom s, HLA-DR-альфа Hom s, HSA Hom s, идуронидаза Hom s, идурсульфаз Hom s, IgA Hom s, инсулин Hom s, лактоферрин Hom s, ламинин гамма-2 Hom s, MnSOD Hom s, окситоцин Hom s, P2 Hom s, фосвитин Hom s, профилин Hom s, PSA Hom s, RP1 Hom s, ТСТР Hom s, TL Hom s, TPA Hom s, TPO Hom s, трансальдолаза Hom s, Trx Hom s, альфа-тубулин Hom s, базиликсимаб Hom s/Mus m, цетуксимаб Hom s/Mus

m, цетуксимаб Hom s/Mus m (Gal-Gal), инфликсимаб Hom s/Mus m, натализумаб Hom s/Mus m, омализумаб Hom s/Mus m, паливизумаб Hom s/Mus m, ритуксимаб Hom s/Mus m, тоцилизумаб Hom s/Mus m, трастузумаб Hom s/Mus m), видов Hoplostethus (Hop a 1), видов Hordeum (Hor v 1, Hor v 12, Hor v 12.0101, Hor v 13, Hor v 14, Hor v 15, Hor v 15.0101, Hor v 16, Hor v 16.0101, Hor v 17, Hor v 17.0101, Hor v размером 18 кДа, Hor v 2, Hor v 21, Hor v 21.0101, Hor v 28, Hor v 33, Hor v 4, Hor v 5, Hor v 5.0101, BDAI Hor v, BTI Hor v), видов Humicola (целлюлаза Hum in), видов Humulus (Hum j 1, Hum j 1.0101, Hum j размером 10 кДа, Hum j 2), видов Huso (Hus h 1), видов Hylocereus (LTP Hyl un), видов Hymenoccephalus (Hym st 1), видов Hyperoglyphe (Hyp by 1), видов Hypophthalmichthys (Hyp mo 1), видов Hypophthalmichthys (Hyp no 1), видов Ictalurus (Ict fu 1, Ict p 1), видов Imperata (Imp c 4, Imp c 5, VIIIe1 Imp c), видов Ixodes (Ixo r 2, Ixo sc 7, Ixo sc 7.0101), видов Jasus (Jas la 1, Jas la 1.0101, Jas la 1.0102), видов Juglans (Jug ca 1, Jug ca 2, Jug ci 1, Jug ci 2, Jug n 1, Jug n 1.0101, Jug n 2, Jug n 2.0101, Jug r 1, Jug r 1.0101, Jug r 2, Jug r 2.0101, Jug r 3, Jug r 3.0101, Jug r 4, Jug r 4.0101, Jug r 5), видов Juniperus (Jun a 1, Jun a 1.0101, Jun a 1.0102, Jun a 2, Jun a 2.0101, Jun a 3, Jun a 3.0101, Jun c 1, Jun o 1, Jun o 4, Jun o 4.0101, Jun r 3, Jun r 3.1, Jun r 3.2, Jun v 1, Jun v 1.0101, Jun v 1.0102, Jun v 3, Jun v 3.0101, Jun v 3.0102, Jun v 4), видов Katsuwonus (Kat p 1), видов Kyphosus (Kyp se 1), видов Lachnolaimus (Lac ma 1), видов Lachesis (Lac mu 1), видов Lactuca (Lac s 1, Lac s 1.0101), видов Lagocephalus (Lag la 1), видов Larus (Lar a 1, Lar a 2, Lar a 3), видов Larimichthys (Lar po 1), видов Lates (Lat c 1), видов Lateolabrax (Lat ja 1), видов Lathyrus (агглютинин Lat oc), видов Leiostomus (Lei xa 1), видов Lens (Len c 1, Len c 1.0101, Len c 1.0102, Len c 1.0103, Len c 2, Len c 2.0101, Len c 3, Len c 3.0101, агглютинин Len c), видов Leopardus (Leo p 1), видов Lepidoglyphus (Lep d 10, Lep d 10.0101, Lep d 12, Lep d 13, Lep d 13.0101, Lep d 2, Lep d 2.0101, Lep d 2.0102, Lep d 2.0201, Lep d 2.0202, Lep d 3, Lep d размером 39 кДа, Lep d 5, Lep d 5.0101, Lep d 5.0102, Lep d 5.0103, Lep d 7, Lep d 7.0101, Lep d 8, альфа-тубулин Lep d), видов Lepomis (Lep gi 1), видов Leptomelanosome (Lep i 1), видов Lepomis (Lep ma 1), видов Lepisma (Lep s 1, Lep s 1.0101, Lep s 1.0102), видов Lepeophtherius (Lep sa 1, Lep sa 1.0101, Lep sa 1.0102, Lep sa 1.0103), видов Leptailurus (Lep se 1), видов Lepidorhombus (Lep w 1, Lep w 1.0101), видов Lethocerus (Let in 7, Let in 7.0101, Let in 7.0102), видов Leuciscus (Leu ce 1), видов Lewia (Lew in 1), видов Ligustrum (Lig v 1, Lig v 1.0101, Lig v 1.0102, Lig v 2), видов Lilium (Lil l 2, PG Lil l), видов Limanda (Lim fe 1), видов Limnionectes (Lim m 1), видов Limulus (Lim p 1, Lim p 1.0101, Lim p 2, LPA Lim p), видов Liposcelis (Lip b 1, Lip b 1.0101), видов Litchi (Lit c 1, Lit c 1.0101, IFR Lit c, TPI Lit c), видов Lithobates (Lit ca 1), видов Litopenaeus (Lit se 1, Lit v 1, Lit v 1.0101, Lit v 2, Lit v 2.0101, Lit v 3, Lit v 3.0101, Lit v 4, Lit v 4.0101), видов Filiaria (Loa lo 3, Loa lo 3.0101), видов Lobotes (Lob su 1), видов Locusta (Loc m 7, Loc m 7.0101), видов Loligo (Lol b 1, Lol e 1), видов Lolium (Lol m 2, Lol m 5, Lol p 1, Lol p 1.0101, Lol p 1.0102, Lol p 1.0103, Lol p 10, Lol p 11, Lol p 11.0101, Lol p 12, Lol p 13, Lol p 2, Lol p 2.0101, Lol p 3, Lol p 3.0101, Lol p 4, Lol p 4.0101, Lol p 5, Lol p 5.0101, Lol p 5.0102, Lol p 7, CyP Lol p, FT Lol p, леугмин Lol p), видов Lonomia (Lon o 7, Lon o 7.0101), видов Lophodytes (Lop cu 1), видов Lophonetta (Lop sp 1), видов Lupinus (Lup a 1, альфа-конглютин Lup a, дельта-конглютин Lup a, гамма-конглютин Lup a, Lup an 1, Lup an 1.0101, альфа-конглютин Lup an, дельта-конглютин Lup an, гамма-конглютин Lup an, Lup l размером 17 кДа), видов Lutjanus (Lut a 1, Lut c 1, Lut cy 1, Lut gr 1, Lut gu 1, Lut jo 1), видов Lutraria (Lut p 1), видов Lutjanus (Lut pu 1, Lut sy 1), видов Lycopersicon (Lyc e 1, Lyc e 1.0101, 11S-глобулин Lyc e, Lyc e 2, Lyc e 2.0101, Lyc e 2.0102, Lyc e 3, Lyc e 3.0101, Lyc e 4, Lyc e 4.0101, ARP60S Lyc e, хитиназа Lyc e, глюканаза Lyc e, пероксидаза Lyc e, PME Lyc e, PR23 Lyc e, вицилин Lyc e), видов Maconellicoccus (Mac h 7, Mac h 7.0101), видов Macruronus (Mac ma 1, Mac n 1), видов Maclura (Mac po размером 17 кДа), видов Macrobrachium (Mac ro 1, Mac ro 1.0101, гемоцианин Mac ro), видов

Macropus (желатин Macr s), видов Malus (Mal d 1, Mal d 1.0101, Mal d 1.0102, Mal d 1.0103, Mal d 1.0104, Mal d 1.0105, Mal d 1.0106, Mal d 1.0107, Mal d 1.0108, Mal d 1.0109, Mal d 1.0201, Mal d 1.0202, Mal d 1.0203, Mal d 1.0204, Mal d 1.0205, Mal d 1.0206, Mal d 1.0207, Mal d 1.0208, Mal d 1.0301, Mal d 1.0302, Mal d 1.0303, Mal d 1.0304, Mal d 1.0401, Mal d 1.0402, Mal d 1.0403, Mal d 2, Mal d 2.0101, Mal d 3, Mal d 3.0101, Mal d 3.0102, Mal d 3.0201, Mal d 3.0202, Mal d 3.0203, Mal d 4, Mal d 4.0101, Mal d 4.0102, Mal d 4.0201, Mal d 4.0202, Mal d 4.0301, Mal d 4.0302), видов Malpighia (Mal g 4, геwein Mal g), видов Malus (Mal p 1), видов Malassezia (Mala f 2, Mala f 2.0101, Mala f 3, Mala f 3.0101, Mala f 4, Mala f 4.0101, Mala g 10, Mala s 1, Mala s 1.0101, Mala s 10, Mala s 10.0101, Mala s 11, Mala s 11.0101, Mala s 12, Mala s 12.0101, Mala s 13, Mala s 13.0101, Mala s 5, Mala s 5.0101, Mala s 6, Mala s 6.0101, Mala s 7, Mala s 7.0101, Mala s 8, Mala s 8.0101, Mala s 9, Mala s 9.0101), видов Manihot (Man e 5, Man e 5.0101, FPA Man e, GAPDH Man e), видов Mangifera (Man i 1, Man i размером 14 кДа, Man i 2, Man i 3, Man i 3.01, Man i 3.02, хитиназа Man i), видов Marsupenaeus (Mar j 1, Mar j 1.0101, Mar j 2, Mar j 4), видов Matricaria (Mat c размером 17 кДа), видов Mecopoda (Mec e 7), видов Megalobrama (Meg am 2, CK Meg am), видов Megathura (гемоцианин Meg c), видов Megalops (Meg sp 1), видов Melanogrammus (Mel a 1), видов Meleagris (Mel g 1, Mel g 2, Mel g 3, PRVB Mel g, TSA Mel g), видов Melicertus (Mel l 1), видов Menticirrhus (Men am 1), видов Mercurialis (Mer a 1, Mer a 1.0101), видов Merluccius (Mer ap 1, Mer au 1, Mer bi 1, Mer ca 1, Mer ga 1, Mer hu 1), видов Merlangius (Mer me 1), видов Merluccius (Mer mr 1, Mer pa 1, Mer po 1, Mer pr 1, Mer se 1), видов Meriones (Mer un размером 23 кДа), видов Metarhizium (Met a 30), видов Metapenaeopsis (Met ba 1), видов Metapenaeus (Met e 1, Met e 1.0101, Met e 2), видов Metasequoia (Met gl 2), видов Metapenaeus (Met j 1, Met j 2), видов Metanephrops (Met ja 1), видов Metapenaeopsis (Met la 1), видов Metanephrops (Met t 2), видов Micromesistius (Mic po 1), видов Micropogonias (Mic un 1), видов Mimachlamys (Mim n 1), видов Momordica (RIP Mom c), видов Morus (Mor a размером 17 кДа, Mor a 4), видов Morone (Mor am 1), видов Morus (Mor n 3, Mor n 3.0101), видов Morone (Mor sa 1, Mor sc 1), видов Mugil (Mug c 1), видов Muraenolepis (Mur mi 1), видов Musa (Mus a 1, Mus a 1.0101, Mus a 2, Mus a 2.0101, Mus a 3, Mus a 3.0101, Mus a 4, Mus a 4.0101, Mus a 5, Mus a 5.0101, Mus a 5.0102), видов Mus (Mus m 1, Mus m 1.0101, Mus m 1.0102, Mus m 2, желатин Mus m, IgG Mus m, MSA Mus m, муромонаб Mus m, фосвитин Mus m), видов Mustela (Mus p размером 17 кДа), видов Musa (Mus xp 1, Mus xp 2, Mus xp 5), видов Mycteroperca (Myc bo 1, Myc mi 1, Myc ph 1), видов Myceliophthora (лакказа Myc sp), видов Myrmecia (Myr p 1, Myr p 1.0101, Myr p 2, Myr p 2.0101, Myr p 2.0102, Myr p 3, Myr p 3.0101), видов Mytilus (Myt e 1, Myt g 1, PM Myt g), видов Myzus (Myz p 7, Myz p 7.0101), видов Nemorhedus (Hya Nae go), видов Necator (кальретикулин Nec a), видов Nemiapterus (Nem vi 1), видов Neosartorya (Neo fi 1, Neo fi 22), видов Neochen (Neo ju 1), видов Neoscona (Neo n 7, Neo n 7.0101), видов Nephelium (GAPDH Nep l), видов Nephrops (Nep n 1, DF9 Nep n), видов Neptunea (Nep po 1, Nep po 1.0101), видов Nicotiana (Nic t 8, осмотин Nic t, виллин Nic t), видов Nimbya (Nim c 1, Nim s 1), видов Nippostrongylus (Ag1 Nip b), видов Nycticebus (Nys c 1), видов Octopus (Oct f 1, Oct l 1, Oct v 1, Oct v 1.0101, PM Oct v), видов Ocyurus (Ocy ch 1), видов Olea (Ole e 1, Ole e 1.0101, Ole e 1.0102, Ole e 1.0103, Ole e 1.0104, Ole e 1.0105, Ole e 1.0106, Ole e 1.0107, Ole e 10, Ole e 10.0101, Ole e 11, Ole e 11.0101, Ole e 11.0102, Ole e 12, Ole e 13, Ole e 2, Ole e 2.0101, Ole e 3, Ole e 3.0101, Ole e размером 36 кДа, Ole e 4, Ole e 4.0101, Ole e 5, Ole e 5.0101, Ole e 6, Ole e 6.0101, Ole e 7, Ole e 7.0101, Ole e 8, Ole e 8.0101, Ole e 9, Ole e 9.0101), видов Ommastrephes (Omm b 1, Omm b 1.0101), видов Oncorhynchus (Onc ke 1, Onc ke размером 18 кДа, альфа-2I Onc ke, вителлогенин Onc ke, Onc m 1, Onc m 1.0101, Onc m 1.0201, альфа-2I Onc m, протамин Onc m, вителлогенин Onc m, Onc ma 1, FPA Onc ma, FSA Onc ma, TPI Onc ma, Onc n 1), видов Onchocerca (Onc o 3, Onc o 3.0101), видов Oncorhynchus (Onc ts 1), видов

Onchocerca (Onc v 3, Onc v 3.0101), видов Oratosquilla (Ora o 1, Ora o 1.0101), видов Oreochromis (Ore a 1, Ore mo 1, Ore mo 2, FPA Ore mo, SCAF7145 Ore mo, Ore ni 1, Ore ni размером 18 кДа, Ore ni размером 45 кДа), видов Ornithonyssus (Orn sy 10, Orn sy 10.0101, Orn sy 10.0102), видов Oryctolagus (Ory c 1, Ory c 1.0101, Ory c 2, казеин Ory c, фосвитин Ory c, RSA Ory c), видов Oryza (Ory s 1, Ory s 1.0101, Ory s 11, Ory s 12, Ory s 12.0101, Ory s 13, Ory s 14, Ory s размером 17 кДа, Ory s размером 19 кДа, Ory s 2, Ory s 23, Ory s 3, Ory s 7, аА_ТI Ory s, GLP52 Ory s, GLP63 Ory s, глиоксалаза I Ory s, NRA Ory s), видов Ostrya (Ost c 1, Ost c 1.0101), видов Ovis (ALA Ovi a, BLG Ovi a, казеин Ovi a, альфа-S1-казеин Ovi a, альфа-S2-казеин Ovi a, бета-казеин Ovi a, каппа-казеин Ovi a, фосвитин Ovi a, SSA Ovi a), видов Pachycondyla (Pac c 3), видов Pagrus (Pag m 1, Pag pa 1), видов Pampus (Pam ar 1, Pam c 1), видов Pandalus (Pan b 1, Pan b 1.0101), видов Pangasius (Pan bo 1), видов Pandalus (Pan e 1, Pan e 1.0101, Pan e 4), видов Panulirus (Pan h 1, Pan hy 1), видов Pangasius (Pan hy размером 18 кДа, Pan hy размером 45 кДа), видов Panulirus (Pan j 1), видов Panthera (Pan l 1, Pan o 1, Pan p 1), видов Panulirus (Pan s 1, Pan s 1.0101), видов Panthera (Pan t 1), видов Pan (TCTP Pan tr), видов Papaver (Pap s размером 17 кДа, Pap s 2, Pap s размером 34 кДа), видов Papilio (Pap xu 7, Pap xu 7.0101, Pap xu 7.0102), видов Paralichthys (Par a 1), видов Parasilurus (Par as 1, Par c 1), видов Paralithodes (Par c 1.0101, Par c 1.0102, Par f 1), видов Parthenium (Par h 1), видов Parietaria (Par j 1, Par j 1.0101, Par j 1.0102, Par j 1.0103, Par j 1.0201, Par j 2, Par j 2.0101, Par j 2.0102, Par j 3, Par j 3.0101, Par j 3.0102, Par j 4, Par j 4.0101, J1-J2 Par j), видов Paralichthys (Par le 1), видов Parietaria (Par m 1, Par o 1, Par o 1.0101), видов Paralichthys (Par ol 1, альфа-2I Par ol), видов Parahucho (вителлогенин Par pe), видов Passiflora (хитиназа Pas e, геветин Pas e), видов Paspalum (Pas n 1, Pas n 1.0101, Pas n 13), видов Patinopecten (Pat y 1), видов Pediculus (Ped h 7, Ped h 7.0101), видов Penaeus (Pen a 1, Pen a 1.0101, Pen a 1.0102, Pen a 1.0102 (103-117), Pen a 1.0102 (109-123), Pen a 1.0102 (1-15), Pen a 1.0102 (115-129), Pen a 1.0102 (121-135), Pen a 1.0102 (127-141), Pen a 1.0102 (13-27), Pen a 1.0102 (133-147), Pen a 1.0102 (139-153), Pen a 1.0102 (145-159)), видов Farfantepenaeus (Pen a 1.0102 (151-165)), видов Penaeus (Pen a 1.0102 (157-171), Pen a 1.0102 (163-177), Pen a 1.0102 (169-183), Pen a 1.0102 (175-189), Pen a 1.0102 (181-195), Pen a 1.0102 (187-201), Pen a 1.0102 (193-207), Pen a 1.0102 (19-33), Pen a 1.0102 (199-213), Pen a 1.0102 (205-219), Pen a 1.0102 (211-225), Pen a 1.0102 (217-231), Pen a 1.0102 (223-237), Pen a 1.0102 (229-243)), видов Farfantepenaeus (Pen a 1.0102 (235-249)), видов Penaeus (Pen a 1.0102 (241-255), Pen a 1.0102 (247-261), Pen a 1.0102 (253-267), Pen a 1.0102 (25-39), Pen a 1.0102 (259-273), Pen a 1.0102 (265-279), Pen a 1.0102 (270-284), Pen a 1.0102 (31-45), Pen a 1.0102 (37-51), Pen a 1.0102 (43-57), Pen a 1.0102 (49-63)), видов Farfantepenaeus (Pen a 1.0102 (55-69)), видов Penaeus (Pen a 1.0102 (61-75), Pen a 1.0102 (67-81), Pen a 1.0102 (7-21), Pen a 1.0102 (73-87), Pen a 1.0102 (79-93), Pen a 1.0102 (85-99), Pen a 1.0102 (91-105), Pen a 1.0102 (97-111), Pen a 1.0103), видов Penicillium (Pen b 13, Pen b 13.0101, Pen b 26, Pen b 26.0101, Pen c 1, Pen c 13, Pen c 13.0101, Pen c 18, Pen c 19, Pen c 19.0101, Pen c 2, Pen c 22, Pen c 22.0101, Pen c 24, Pen c 24.0101, Pen c 3, Pen c 3.0101, Pen c 30, Pen c 30.0101, Pen c 32, Pen c 32.0101, MnSOD Pen c, Pen ch 13, Pen ch 13.0101, Pen ch 18, Pen ch 18.0101, Pen ch 20, Pen ch 20.0101, Pen ch 31, Pen ch 31.0101, Pen ch 33, Pen ch 33.0101, Pen ch 35, Pen ch 35.0101, MnSOD Pen ch), видов Penaeus (Pen i 1, Pen i 1.0101, Pen m 1, Pen m 1.0101, Pen m 1.0102, Pen m 2, Pen m 2.0101, Pen m 3, Pen m 3.0101, Pen m 4, Pen m 4.0101, Pen m 6, Pen m 6.0101), видов Penicillium (Pen o 18, Pen o 18.0101), видов Penaeus (Pena o 1, Pena o 1.0101), видов Periplaneta (Per a 1, Per a 1.0101, Per a 1.0102, Per a 1.0103, Per a 1.0104, Per a 1.0105, Per a 1.0201, Per a 10, Per a 10.0101, Per a 2, Per a 3, Per a 3.0101, Per a 3.0201, Per a 3.0202, Per a 3.0203, Per a 4, Per a 5, Per a 6, Per a 6.0101, Per a 7, Per a 7.0101, Per a 7.0102, Per a 7.0103, Per a 9, Per a 9.0101, катепсин Per a, FABP Per a, трипсин Per a, Per f 1, Per f

7, Per f 7.0101), видов Perna (Per v 1), видов Persea (Pers a 1, Pers a 1.0101, Pers a 4), видов Petroselinum (Pet c 1, Pet c 2, Pet c 3), видов Phalaris (Pha a 1, Pha a 1.0101, Pha a 5, Pha a 5.0101, Pha a 5.02, Pha a 5.03, Pha a 5.04), видов Phaseolus (Pha v 3, Pha v 3.0101, Pha v 3.0201, aAI Pha v, aAI.0101 Pha v, хитиназа Pha v, PHA Pha v, фазеолин Pha v), видов Phleum (Phl p 1, Phl p 1.0101, Phl p 1.0102, Phl p 11, Phl p 11.0101, Phl p 12, Phl p 12.0101, Phl p 12.0102, Phl p 12.0103, Phl p 13, Phl p 13.0101, Phl p 2, Phl p 2.0101, Phl p 3, Phl p 3.0101, Phl p 3.0102, Phl p 4, Phl p 4.0101, Phl p 4.0102, Phl p 4.0201, Phl p 4.0202, Phl p 4.0203, Phl p 4.0204, Phl p 5, Phl p 5.0101, Phl p 5.0102, Phl p 5.0103, Phl p 5.0104, Phl p 5.0105, Phl p 5.0106, Phl p 5.0107, Phl p 5.0108, Phl p 5.0109, Phl p 5.0201, Phl p 5.0202, Phl p 5.0203, Phl p 5.0204, Phl p 5.0205, Phl p 5.0206, Phl p 5.0207, Phl p 6, Phl p 6.0101, Phl p 6.0102, Phl p 7, Phl p 7.0101, P1-P2-P5-P6 Phl p, P2-P6 Phl p, P5-P1 Phl p, P6-P2 Phl p), видов Phoenix (Pho d 2, Pho d 2.0101, Pho d размером 40 кДа, Pho d размером 90 кДа), видов Phodopus (Pho s размером 21 кДа), видов Phoma (Pho t 1), видов Phragmites (Phr a 1, Phr a 12, Phr a 13, Phr a 4, Phr a 5), видов Phytolacca (RIP Phy a), видов Pimpinella (Pim a 1, Pim a 2), видов Pinna (Pin a 1), видов Piper (Pip n размером 14 кДа, Pip n размером 28 кДа), видов Pisum (Pis s 1, Pis s 1.0101, Pis s 1.0102, Pis s 2, Pis s 2.0101, Pis s 5, агглютинин Pis s, альбумин Pis s), видов Pistacia (Pis v 1, Pis v 1.0101, Pis v 2, Pis v 2.0101, Pis v 2.0201, Pis v 3, Pis v 3.0101, Pis v 4, Pis v 4.0101, Pis v 5, Pis v 5.0101), видов Platanus (Pla a 1, Pla a 1.0101, Pla a 2, Pla a 2.0101, Pla a 3, Pla a 3.0101, Pla a 8), видов Platicthys (Pla f 1), видов Plantago (Pla l 1, Pla l 1.0101, Pla l 1.0102, Pla l 1.0103, цитохром C Pla l), видов Platanus (Pla oc 1, Pla or 1, Pla or 1.0101, Pla or 2, Pla or 2.0101, Pla or 3, Pla or 3.0101, Pla or 4, CyP Pla or, Pla r 1), видов Plectropomus (Ple ar 1), видов Pleospora (Ple h 1), видов Plectropomus (Ple le 1), видов Plodia (Plo i 1, Plo i 1.0101, Plo i 2, Plo i 2.0101), видов Poa (Poa p 1, Poa p 1.0101, Poa p 10, Poa p 12, Poa p 13, Poa p 2, Poa p 4, Poa p 5, Poa p 5.0101, Poa p 6, Poa p 7), видов Polistes (Pol a 1, Pol a 1.0101, Pol a 2, Pol a 2.0101, Pol a 5, Pol a 5.0101, Pol d 1, Pol d 1.0101, Pol d 1.0102, Pol d 1.0103, Pol d 1.0104, Pol d 4, Pol d 4.0101, Pol d 5, Pol d 5.0101, Pol e 1, Pol e 1.0101, Pol e 2, Pol e 4, Pol e 4.0101, Pol e 5, Pol e 5.0101, Pol f 5, Pol f 5.0101, Pol g 1, Pol g 1.0101, Pol g 2, Pol g 4, Pol g 5, Pol g 5.0101, MLT Pol he, Pol m 5, Pol m 5.0101), видов Polypedium (Pol n 1), видов Pollicipes (Pol po 1), видов Pollachius (Pol vi 1), видов Polybia (Poly p 1, Poly p 1.0101, Poly p 2, Poly p 5, Poly s 5, Poly s 5.0101), видов Pomatomus (Pom sa 1), видов Pongo (HSA Pon ab), видов Pontastacus (Pon l 4, Pon l 4.0101, Pon l 7, Pon l 7.0101), видов Portunus (Por s 1, Por s 1.0101, Por s 1.0102, Por tr 1, Por tr 1.0101), видов Protortonia (Pro са размером 38 кДа), видов Procumbarus (Pro cl 1, Pro cl 1.0101, Pro cl размером 21 кДа), видов Prosopis (Pro j размером 20 кДа), видов Prunus (Pru ar 1, Pru ar 1.0101, Pru ar 3, Pru ar 3.0101, Pru av 1, Pru av 1.0101, Pru av 1.0201, Pru av 1.0202, Pru av 1.0203, Pru av 2, Pru av 2.0101, Pru av 3, Pru av 3.0101, Pru av 4, Pru av 4.0101, Pru c 1, Pru d 1, Pru d 2, Pru d 3, Pru d 3.0101, Pru d 4, Pru du 1, Pru du 2, 2S-альбумин Pru du, Pru du 3, Pru du 3.0101, Pru du 4, Pru du 4.0101, Pru du 4.0102, Pru du 5, Pru du 5.0101, Pru du 6, Pru du 6.0101, Pru du 6.0201, конглютин Pru du, Pru p 1, Pru p 1.0101, Pru p 2, Pru p 2.0101, Pru p 2.0201, Pru p 2.0301, Pru p 3, Pru p 3.0101, Pru p 3.0102, Pru p 4, Pru p 4.0101, Pru p 4.0201, Pru sa 3), видов Psilocybe (Psi c 1, Psi c 1.0101, Psi c 2, Psi c 2.0101), видов Psoroptes (Pso o 1, Pso o 10, Pso o 10.0101, Pso o 11, Pso o 13, Pso o 14, Pso o 2, Pso o 21, Pso o 3, Pso o 5, Pso o 7), видов Puma (Pum c 1), видов Punica (Pun g 3), видов Pyrus (Pyr c 1, Pyr c 1.0101, Pyr c 3, Pyr c 3.0101, Pyr c 4, Pyr c 4.0101, Pyr c 5, Pyr c 5.0101, Pyr py 2), видов Quercus (Que a 1, Que a 1.0101, Que a 1.0201, Que a 1.0301, Que a 1.0401, Que a 2, Que a 4), видов Rachycentron (Rac ca 1), видов Rana (Ran e 1, Ran e 1.0101, Ran e 2, Ran e 2.0101), видов Ranina (Ran ra 1), видов Rangifer (BLG Ran t), видов Rattus (Rat n 1, Rat n 1.0101, казеин Rat n, желатин Rat n, IgG Rat n, фосвитин Rat n, RSA Rat n, трансферрин Rat n), видов Rhizomucor (AP Rhi m), видов Rhizopus (липаза Rhi nv, липаза Rhi o), видов

Rhomboplites (Rho au 1), видов Rhodotorula (Rho m 1, Rho m 1.0101, Rho m 2, Rho m 2.0101), видов Ricinus (Ric c 1, Ric c 1.0101, Ric c 2, Ric c 3, Ric c 8, RIP Ric c), видов Rivulus (Riv ma 1), видов Robinia (Rob p 2, Rob p 4, глюканаза Rob p), видов Rosa (Ros r 3), видов Roystonea (Roy e 2), видов Rubus (Rub i 1, Rub i 1.0101, Rub i 3, Rub i 3.0101, хитиназа Rub i, CyP Rub i), видов Saccharomyces (карбоксипептидаза Y Sac c, CyP Sac c, енолаза Sac c, глюкозидаза Sac c, инвертаза Sac c, MnSOD Sac c, P2 Sac c, профилин Sac c), видов Salvelinus (Sal f 1), видов Salsola (Sal k 1, Sal k 1.0101, Sal k 1.0201, Sal k 1.0301, Sal k 1.0302, Sal k 2, Sal k 2.0101, Sal k 3, Sal k 3.0101, Sal k 4, Sal k 4.0101, Sal k 4.0201, Sal k 5, Sal k 5.0101), видов Salvelinus (вителлогенин Sal le), видов Salmo (Sal s 1, Sal s 1.0101, Sal s 1.0201, Sal s 2, Sal s 2.0101, желатин Sal s), видов Sambucus (Sam n 1), видов Sander (San lu 1), видов Saponaria (RIP Sap o), видов Sardinops (Sar m 1), видов Sarkidiornis (Sar ml 1), видов Sardina (Sar p 1), видов Sarcoptes (Sar s 1, Sar s 14, Sar s 3, GST Sar s, PM Sar s), видов Sardinops (Sar sa 1, Sar sa 1.0101), видов Schistosoma (GST Sch j, PM Sch j, Sj22 Sch j, Sj67 Sch j, Sm20 Sch ma, Sm21 Sch ma, Sm22 Sch ma, Sm31 Sch ma), видов Sciaenops (Sci oc 1), видов Scomber (Sco a 1), видов Scomberomorus (Sco ca 1), видов Scomberomorus (Sco g 1), видов Scomber (Sco j 1, Sco ma 1, Sco s 1), видов Scolopendra (Sco y 7, Sco y 7.0101), видов Scylla (Scy o 1, Scy o 1.0101, Scy o 2, Scy pa 1, Scy pa 2, Scy s 1, Scy s 1.0101, Scy s 2), видов Sebastes (Seb fa 1, Seb in 1, Seb m 1, Seb m 1.0101, Seb m 1.0201), видов Secale (Sec c 1, Sec c 12, Sec c 13, Sec c 2, Sec c 20, Sec c 20.0101, Sec c 20.0201, Sec c 28, Sec c 3, Sec c 4, Sec c 4.0101, Sec c 4.0201, Sec c 5, Sec c 5.0101, aA_TI Sec c, aA_TI.0101 Sec c), видов Senecio (MDH Sen j, PL Sen j), видов Sepia (Sep e 1, Sep e 1.0101), видов Sepioteuthis (Sep l 1, Sep l 1.0101), видов Sepia (Sep m 1), видов Seriola (Ser d 1, Ser la 1), видов Sergestes (Ser lu 1), видов Seriola (Ser q 1, Ser ri 1), видов Sesamum (Ses i 1, Ses i 1.0101, Ses i 2, Ses i 2.0101, Ses i 3, Ses i 3.0101, Ses i 4, Ses i 4.0101, Ses i 5, Ses i 5.0101, Ses i 6, Ses i 6.0101, Ses i 7, Ses i 7.0101, Ses i 8), видов Shigella (GST Shi bo, GST Shi dy), видов Simulia (Sim vi 1, Sim vi 2, Sim vi 3, Sim vi 4, Sim vi размером 70 кДа), видов Sinapis (Sin a 1, Sin a 1.0101, Sin a 1.0104, Sin a 1.0105, Sin a 1.0106, Sin a 1.0107, Sin a 1.0108, Sin a 2, Sin a 2.0101, Sin a 3, Sin a 3.0101, Sin a 4, Sin a 4.0101), видов Sinonovacula (Sin c 1, Sin c 1.0101), видов Solenopsis (Sol g 2, Sol g 2.0101, Sol g 3, Sol g 3.0101, Sol g 4, Sol g 4.0101, Sol g 4.0201, Sol i 1, Sol i 1.0101, Sol i 2, Sol i 2.0101, Sol i 3, Sol i 3.0101, Sol i 4, Sol i 4.0101), видов Solenocera (Sol me 1), видов Solenopsis (Sol r 1, Sol r 2, Sol r 2.0101, Sol r 3, Sol r 3.0101, Sol s 2, Sol s 2.0101, Sol s 3, Sol s 3.0101, Sol s 4), видов Solea (Sol so 1, TPI Sol so), видов Solanum (Sola t 1, Sola t 1.0101, Sola t 2, Sola t 2.0101, Sola t 3, Sola t 3.0101, Sola t 3.0102, Sola t 4, Sola t 4.0101, Sola t 8, глюканаза Sola t), видов Sorghum (Sor b 1, Sor h 1, Sor h 1.0101, Sor h 12, Sor h 7), видов Sparus (Spa a 1), видов Sphyrna (Sph ti 1), видов Spirulina (бета-фикоцианин Spi mx), видов Spinacia (Spi o 2, RuBisCO Spi o), видов Squilla (Squ ac 1, Squ ac 1.0101, Squ o 1, Squ o 1.0101), видов Staphylococcus (FBP Sta a, SEA Sta a, SEB Sta a, SEC Sta a, SED Sta a, CM Sta a, TSST Sta a), видов Stachybotrys (Sta c 3, Sta c 3.0101, целлюлаза Sta c, гемолизин Sta c, SchS34 Sta c, стахираза A Sta c), видов Stemphylium (Ste b 1, Ste c 1, Ste v 1), видов Stolephorus (Sto i 1), видов Struthio (Str c 1, Str c 2, Str c 3), видов Streptococcus (стрептокиназа Str dy), видов Streptomyces (проназа Str g), видов Streptococcus (PspC Str pn), видов Strongylocentrotus (Str pu размером 18 кДа, вителлогенин Str pu), видов Streptococcus (SPEA Str py, SPEC Str py, стрептокиназа Str py), видов Strongyloides (Str st размером 45 кДа), видов Streptomyces (PAT Str v), видов Styela (Sty p 1), видов Suidasia (Sui m 1, Sui m 13, Sui m 2, Sui m 3, Sui m 5, Sui m 5.01, Sui m 5.02, Sui m 5.03, Sui m 6, Sui m 7, Sui m 8, Sui m 9), видов Sus (ACTH Sus s, ALA Sus s, амилаза Sus s, BLG Sus s, казеин Sus s, альфа-S1-казеин Sus s, альфа-S2-казеин Sus s, бета-казеин Sus s, каппа-казеин Sus s, желатин Sus s, HG Sus s, инсулин Sus s, липаза Sus s, пепсин Sus s, фосвитин Sus s, PRVB Sus s, PSA Sus s, TCTP Sus s), видов Syntelopodeuma (Syn y 7, Syn y

7.0101), видов *Syringa* (Syr v 1, Syr v 1.0101, Syr v 1.0102, Syr v 1.0103, Syr v 2, Syr v 3, Syr v 3.0101), видов *Tabanus* (Tab y 1, Tab y 1.0101, Tab y 2, Tab y 2.0101, Tab y 5, Tab y 5.0101), видов *Tadorna* (Tad ra 1), видов *Talaromyces* (Tal st 22, Tal st 3, Tal st 8), видов *Taraxacum* (Tar o размером 18 кДа), видов *Taxodium* (Tax d 2), видов *Tegenaria* (гемоцианин Teg d), видов *Teladorsagia* (Tel ci 3), видов *Thaumatococcus* (Tha p 1, Tha p 1.0101, Tha p 2, Tha p 2.0101), видов *Theragra* (The c 1), видов *Thermomyces* (липаза The l, липаза The sp, ксиланаза The sp), видов *Thunnus* (Thu a 1, Thu a 1.0101, коллаген Thu a, Thu al 1, Thu at 1, Thu o 1, коллаген Thu o), видов *Thuja* (Thu oc 3, Thu p 1), видов *Thunnus* (Thu t 1, Thu to 1), видов *Thyrsites* (Thy at 1), видов *Thyrophagus* (Thy y 7, Thy y 7.0101), видов *Todarodes* (Tod p 1, Tod p 1.0101, Tod p 1.0102), видов *Toxoptera* (Tox c 7, Tox c 7.0101), видов *Toxocara* (Tox ca TES120, Tox ca TES26, Tox ca TES30), видов *Toxoplasma* (HSP70 Tox g), видов *Trachypneus* (Tra c 1), видов *Trachinotus* (Tra ca 1), видов *Trachurus* (Tra j 1, желатин Tra j, желатин Tra tr), видов *Triticum* (Tri a 1, Tri a размером 10 кДа, Tri a 12, Tri a 12.0101, Tri a 12.0102, Tri a 12.0103, Tri a 12.0104, Tri a 13, Tri a 14, Tri a 14.0101, Tri a 14.0201, Tri a 15, Tri a 15.0101, Tri a 18, Tri a 18.0101, Tri a 19, Tri a 19.0101, Tri a 2, Tri a 21, Tri a 21.0101, Tri a размером 23 кДа, Tri a 25, Tri a 25.0101, Tri a 26, Tri a 26.0101, Tri a 27, Tri a 27.0101, Tri a 28, Tri a 28.0101, Tri a 29, Tri a 29.0101, Tri a 29.0201, Tri a 3, Tri a 30, Tri a 30.0101, Tri a 31, Tri a 31.0101, Tri a 32, Tri a 32.0101, Tri a 33, Tri a 33.0101, Tri a 34, Tri a 34.0101, Tri a 35, Tri a 35.0101, Tri a 36, Tri a 36.0101, Tri a 37, Tri a 37.0101, Tri a 4, Tri a 4.0101, Tri a 4.0201, Tri a 5, Tri a 7, aA_SI Tri a, альфа-глиадин Tri a, bA Tri a, Bd36K Tri a, бета-глиадин Tri a, хитиназа Tri a, CM16 Tri a, DH Tri a, эндохитиназа Tri a, гамма-глиадин Tri a, гермин Tri a, глиадин Tri a, GST Tri a, LMW Glu Tri a, LMW-GS B16 Tri a, LMW-GS P42 Tri a, LMW-GS P73 Tri a, LTP2 Tri a, омега-2-глиадин Tri a, пероксидаза Tri a, пероксидаза 1 Tri a, SPI Tri a, TLP Tri a, тритин Tri a, XI Tri a), видов *Tritirachium* (протеиназа K Tri al), видов *Tribolium* (Tri ca 17, Tri ca 17.0101, Tri ca 7, Tri ca 7.0101), видов *Trichostrongylus* (Tri co 3, Tri co 3.0101), видов *Trichophyton* (Tri eq 4), видов *Trigonella* (Tri fg 1, Tri fg 2, Tri fg 3, Tri fg 4), видов *Trichosanthes* (RIP Tri k), видов *Trichiurus* (Tri le 1), видов *Triticum* (пероксидаза Tri m), видов *Trichophyton* (Tri me 2, Tri me 4), видов *Trisetum* (Tri p 1, Tri p 5), видов *Trichinella* (Tri ps 3, Tri ps 3.0101), видов *Trichophyton* (Tri r 2, Tri r 2.0101, Tri r 4, Tri r 4.0101), видов *Trichoderma* (целлюлаза Tri rs), видов *Triticum* (Tri s 14), видов *Trichophyton* (Tri sc 2, Tri sc 4, Tri so 2), видов *Trichinella* (Tri sp 3, Tri sp 3.0101, Tri sp 3.0102, Tri sp 3.0103, Tri sp 3.0104, Tri sp 3.0105, Tri sp 3.0106), видов *Trichophyton* (Tri t 1, Tri t 1.0101, Tri t 4, Tri t 4.0101), видов *Triticum* (Tri td 14, aA_TI Tri td), видов *Trichoderma* (целлюлаза Tri v), видов *Trichophyton* (Tri ve 4), видов *Triatoma* (Tria p 1, Tria p 1.0101), видов *Triplochiton* (Trips 1), видов *Turbo* (Tur c 1, PM Tur c), видов *Tyrophagus* (Tyr p 1, Tyr p 10, Tyr p 10.0101, Tyr p 10.0102, Tyr p 13, Tyr p 13.0101, Tyr p 2, Tyr p 2.0101, Tyr p 24, Tyr p 24.0101, Tyr p 3, Tyr p 3.0101, Tyr p 4, Tyr p 5, Tyr p 5.01, Tyr p 5.02, Tyr p 5.03, Tyr p 7, альфа-тубулин Tyr p), видов *Ulocladium* (Ulo a 1, Ulo at 1, Ulo b 1, Ulo c 1, Ulo co 1, Ulo cu 1, Ulo mu 1, Ulo ob 1, Ulo se 1, Ulo su 1, Ulo tu 1), видов *Uncia* (Unc u 1), видов *Urophycis* (Uro te 1), видов *Vaccinium* (Vac m 3), видов *Varroa* (Var j размером 13 кДа), видов *Venerupis* (Ven ph 1, Ven ph 1.0101), видов *Vespula* (Ves f 1, Ves f 2, Ves f 5, Ves f 5.0101, Ves g 1, Ves g 2, Ves g 5, Ves g 5.0101, Ves m 1, Ves m 1.0101, Ves m 2, Ves m 2.0101, Ves m 5, Ves m 5.0101, MLT Ves m, Ves p 1, Ves p 2, Ves p 5, Ves p 5.0101, Ves s 1, Ves s 1.0101, Ves s 2, Ves s 5, Ves s 5.0101, Ves v 1, Ves v 1.0101, Ves v 2, Ves v 2.0101, Ves v 2.0201, Ves v 3, Ves v 3.0101, Ves v 5, Ves v 5.0101, Ves v5-Pol a 5, Ves vi 5, Ves vi 5.0101), видов *Vespa* (Vesp c 1, Vesp c 1.0101, Vesp c 2, Vesp c 5, Vesp c 5.0101, Vesp c 5.0102, Vesp m 1, Vesp m 1.0101, Vesp m 5, Vesp m 5.0101, Vesp ma 1, Vesp ma 2, Vesp ma 5, MLT Vesp ma, MLT Vesp v), видов *Vigna* (Vig r 1, Vig r 1.0101, Vig r размером 17 кДа, Vig r 5, 8S-глобулин Vig r, альбумин Vig r, бета-конглианин Vig r), видов *Vitis* (Vit v 1, Vit v 1.0101, Vit v 4, Vit v 5, глюканаза Vit v, TLP Vit v), видов *Xiphias* (Xip g 1, Xip g 1.0101, Xip g размером 25 кДа), видов *Zea* (Zea m 1, Zea m 1.0101, Zea m 11, Zea m 12, Zea m 12.0101, Zea m 12.0102, Zea m 12.0103, Zea m 12.0104, Zea m 12.0105, Zea m 13, Zea m 14, Zea m 14.0101, Zea m 14.0102, Zea m 2, 20S-субъединица Zea m, Zea m 22, Zea m 25, Zea m 25.0101, зеин Zea m размером 27 кДа, Zea m 3, Zea m 4, Zea m 5, зеин Zea m размером 50 кДа, Zea m 7, хитиназа Zea m, G1 Zea m, G2 Zea m, PAO Zea m, Zm13 Zea m), видов *Zeus* (Zeu fa 1), видов *Ziziphus* (Ziz m 1, Ziz m 1.0101), видов *Zoarcis* (ISP III Zo a), видов *Zygorhynchus* (Zyg f 2).

В данном контексте термины в круглых скобках указывают на конкретные предпочтительные аллергенные антигены (аллергены) из конкретного источника.

Наиболее предпочтительно, аллергенный антиген предпочтительно получен из источника (например, растения (например, травянистого или древесного растения), натурального продукта (например, молока, орехов и т.д.), грибного источника (например, *Aspergillus*), или бактериального источника, или животного источника, или яда животного (например, кошки, собаки, пчелиного яда и т.д.)), предпочтительно выбранного из перечня, состоящего из пыльцы злаковых трав (например, пыльцы ржи), пыльцы

древесных растений (например, пыльцы лещины, березы, ольхи, ясеня), цветочной пыльцы, травяной пыльцы (например, пыльцы полыни обыкновенной), пылевого клеща (например, Der f 1, Der p 1, Eur m 1, Der m 1, Der f 2, Der p 2, Eur m 2, Tug p 2, Lep d 2), плесневых грибов (например, аллергены *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* или *Alternaria*), животных (например, Fel d1, Fel d2, Fel d3 или Fel d4 кошек), пищевых продуктов (например, аллергены рыбы (например, окуня, трески, камбалы), морепродуктов (например, краба, омара, креветок), яиц, пшеницы, орехов (например, арахисовых орехов, миндальных орехов, орехов кешью, грецких орехов), сои, молока и т.д.) или яда насекомых (например, аллергены яда ос, пчел, шершней, муравьев, комаров или иксодовых клещей).

Собственные аутоантигены.

Собственные аутоантигены, т.е. антигены, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием, или аутологичные антигены, могут быть ассоциированы с аутоиммунным заболеванием, поражающим по меньшей мере одну или несколько следующих систем органов: систему кровообращения, пищеварительную систему, эндокринную систему, выделительную систему, иммунную систему, покровную систему, мышечную систему, нервную систему, репродуктивную систему, дыхательную систему, скелетную систему, предпочтительно сердечно-сосудистую систему, нейроэндокринную систему, скелетно-мышечную систему или желудочно-кишечный тракт. В данном контексте система кровообращения представляет собой систему органов, которая обеспечивает прокачивание крови и направление ее по каналам к телу и легким и от них с помощью сердца, крови и кровеносных сосудов. Пищеварительная система обеспечивает переваривание и обработку пищи с помощью слюнных желез, пищевода, желудка, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы, кишечника, ободочной кишки, прямой кишки и анального отверстия. Эндокринная система обеспечивает коммуникацию в организме с помощью гормонов, вырабатываемых эндокринными железами, такими как гипоталамус, гипофиз или питуитарная железа, шишковидное тело или эпифиз, щитовидная железа, паращитовидная железа и надпочечники. Выделительная система включает почки, мочеточники, мочевой пузырь и мочеиспускательный канал и участвует в обеспечении жидкостного баланса, электролитного баланса и выделении мочи. Иммунная система включает структуры, участвующие в переносе лимфы между тканями и кровотоком, лимфу и лимфатические узлы, а также сосуды, которые могут отвечать за транспорт клеточных и гуморальных компонентов иммунной системы. Она отвечает за защиту от болезнетворных агентов и включает, среди прочего, лейкоциты, миндалевидные железы, аденоиды, вилочковую железу и селезенку. Покровная система включает кожу, волосы и ногти. Мышечная система обеспечивает движение с помощью мышц совместно со скелетной системой, которая включает кости, хрящи, связки и сухожилия и обеспечивает структурную опору. Нервная система отвечает за сбор, передачу и обработку информации и включает головной мозг, спинной мозг и нервы. Репродуктивная система включает половые органы, такие как яичники, фаллопиевы трубы, матка, влагалище, молочные железы, яички, семявыносящий проток, семенные пузырьки, предстательная железа и половой член. Дыхательная система включает органы, используемые для дыхания, глотку, гортань, трахею, бронхи, легкие и диафрагму и функционирует совместно с системой кровообращения.

Собственные аутоантигены (антигены, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием, или аутологичные антигены) выбраны из аутологичных антигенов, ассоциированных с аутоиммунными заболеваниями, выбранными из болезни Аддисона (аутоиммунного адреналита, гипокортицизма), гнездной алопеции, анемии Аддисона (болезни Аддисона-Бирмера), аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА) холодового типа (болезни Холодовых гемагглютининов, холодовой аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА) (болезни Холодовых агглютининов), (CHAD)), аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА) теплового типа (тепловой АИНА, тепловой аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА)), аутоиммунной гемолитической анемии с гемолизинами Доната-Ландштейнера (пароксизмальной холодовой гемоглобинурии), антифосфолипидного синдрома (APS), атеросклероза, аутоиммунного артрита, височного артериита, артериита Такаясу (болезни Такаясу, заболевания дуги аорты), височного артериита/гигантоклеточного артериита, аутоиммунного хронического гастрита, аутоиммунного бесплодия, аутоиммунного заболевания внутреннего уха (AIED), базедовой болезни (диффузного токсического зоба), болезни Бехтерева (болезни Штрюмпелля-Бехтерева-Мари, анкилозирующего спондилоартрита, анкилозирующего спондилита), синдрома Бехчета (болезни Бехчета), заболевания кишечника, в том числе аутоиммунного воспалительного заболевания кишечника (в том числе язвенного колита (болезни Крона, гранулематозного энтерита)), кардиомиопатии, в частности аутоиммунной кардиомиопатии, идиопатической дилатационной кардиомиопатии (DCM), целиакии спру, проявляющейся в форме дерматита (глутеновой энтеропатии), синдрома хронической усталости и иммунной дисфункции (CFIDS), хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), хронического полиартрита, синдрома Черджа-Стросс, рубцующегося пемфигоида, синдрома Когана, CREST-синдрома (синдрома, проявляющегося в виде кальциноза кожи, феномена Рейно, нарушений моторики пищевода, склеродактилии и телеангиэктазии), болезни Крона (гранулематозного энтерита, язвенного колита), герпетического дерматита Дюринга, дерматологических аутоиммунных заболеваний, дерматомиозита, диабета, сахарного диабета I типа (диабета I типа, инсулинозависимого сахарного диабета), сахарного диабета 2 типа (диабета II типа), эссенциальной смешанной криоглобулинемии,

эссенциальной смешанной криоглобулинемии, фибромиалгии, фибромиозита, синдрома Гудпасчера (гломерулонефрита, опосредованного антителами к GBM), реакции "трансплантат против хозяина", синдрома Гийена-Барре (GBM, полирадикулоневрита), гематологических аутоиммунных заболеваний, тиреоидита Хашимото, гемофилии, приобретенной гемофилии, гепатита, аутоиммунного гепатита, в частности аутоиммунных форм хронического гепатита, идиопатического легочного фиброза (IPF), идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, иммунной тромбоцитопенической пурпуры (болезни Верльгофа; ГТП), IgA-нефропатии, бесплодия, аутоиммунного бесплодия, ювенильного ревматоидного артрита (болезни Стилла, синдрома Стилла), синдрома Ламберта-Итона, красного плоского лишая, склероатрофического лишая, красной волчанки, системной красной волчанки (SLE), красной волчанки (дискоидной формы), артрита Лайма (болезни Лайма, боррелиозного артрита), болезни Меньера (лабиринтной дисфункции); смешанного заболевания соединительной ткани (MCTD), рассеянного склероза (MS, диссеминированного энцефаломиелимита, болезни Шарко), тяжелой миастении (миастении, MG), форм миозита, форм полимиозита, неврологических аутоиммунных заболеваний, нейродермита, вульгарной пузырчатки, буллезного пемфигоида, рубцующегося пемфигоида; узелкового полиартериита (узелкового периартериита), полихондрита (панхондрита), полигландулярного (аутоиммунного) синдрома (PGA-синдрома, синдрома Шмидта), ревматической полимиалгии, первичной агаммаглобулинемии, первичного билиарного цирроза печени PBC, первичного аутоиммунного холангита), прогрессирующего системного склероза (PSS), псориаза, вульгарного псориаза, феномена Рейно, синдрома Рейтера (болезни Рейтера, уретрокулосиновиального синдрома)), ревматоидного артрита (RA, хронического полиартрита, ревматического заболевания суставов, острой ревматической лихорадки), саркоидоза (болезни Бека, болезни Бенье-Бека-Шаумана), синдрома мышечной скованности, склеродермии, склеродермы, синдрома Шегрена, симпатической офтальмии; временной непереносимости глютена, отторжения трансплантированного органа, увеита, аутоиммунного увеита, васкулита, витилиго (лейкодермы, пегой кожи) и болезни Вегенера (гранулематоза с полиангиитом, гранулематоза Вегенера).

Эти и другие белки, выступающие в качестве собственных аутоантигенов, понимают как терапевтические, поскольку они предназначены для лечения субъекта, в частности млекопитающего, более конкретно человека, путем вакцинации собственным антигеном, который экспрессируется самим млекопитающим, например, человеком, и который запускает нежелательный иммунный ответ, не индуцируемый у здорового субъекта. Соответственно, такие белки, выступающие в качестве собственных антигенов, как правило, происходят из млекопитающего, в частности человека.

Особенно предпочтительными в данном контексте являются собственные аутоантигены (аутологичные антигены), выбранные из

основного белка миелина (МБР), протеолипидного белка (PLP) и миелин-олигодендроцитарного гликопротеина (MOG), в каждом случае ассоциированных с рассеянным склерозом (MS);

CD44, препроинсулина, проинсулина, инсулина, декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD65), тирозинфосфатазоподобного антигена инсулиномы 2 (IA2), транспортера цинка (ZnT8) и белка теплового шока 60 (HSP60), в каждом случае ассоциированных с сахарным диабетом I типа;

межфоторецепторного ретинолсвязывающего белка (IRBP), ассоциированного с аутоиммунным увеитом;

ацетилхолинового рецептора AchR и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), в каждом случае ассоциированных с тяжелой миастенией;

M-белка бета-гемолитических стрептококков (псевдоаутологичного антигена), ассоциированного с острой ревматической лихорадкой;

фактора ингибирования миграции макрофагов, ассоциированного с артритом;

RNP-комплекса Ro/La, альфа- и бета-фодрина, аутологичного антигена островковых клеток, поли(ADP)рибозополимеразы (PARP), аутологичных антигенов NuMA, NOR-90, R06O и антигена p27, в каждом случае ассоциированных с синдромом Шегрена;

аутологичного антигена Ro60, липопротеинов низкой плотности, антигенов Sm комплекса малых ядерных рибонуклеопротеинов U-1 (B/B', D1, D2, D3, E, F, G) и RNP-рибонуклеопротеинов, в каждом случае ассоциированных с красной волчанкой;

oxLDL, бета(2)-GPI, HSP60/65 и oxLDL/бета(2)-GPI, в каждом случае ассоциированных с атеросклерозом;

бета(1)-адренергического рецептора сердца, ассоциированного с идиопатической дилатационной кардиомиопатией (DCM);

гистидил-тРНК-синтетазы (HisRS), ассоциированной с миозитом;

топоизомеразы I, ассоциированной со склеродермией.

Кроме того, в других вариантах осуществления указанный собственный аутоантиген ассоциирован с соответствующим аутоиммунным заболеванием, как, например, IL-17, белки теплового шока и/или любой Т-клеточный или хемокиновый рецептор с патогенным идиотипом, который экспрессируется иммунными клетками, участвующими в аутоиммунном ответе при указанном аутоиммунном заболевании (таком как любые аутоиммунные заболевания, описанные в данном документе).

Предпочтительно по меньшей мере одна кодирующая область соединения мРНК, содержащего по-

последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или больше последовательностей нуклеиновых кислот, идентичных или характеризующихся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей (или соответственно в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843), или фрагмент или вариант любой из указанных последовательностей нуклеиновых кислот.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, определенную в данном документе, как правило, предпочтительно имеет длину от приблизительно 50 до приблизительно 20000 или от 100 до приблизительно 20000 нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 250 до приблизительно 20000 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 500 до приблизительно 10000, еще более предпочтительно от приблизительно 500 до приблизительно 5000.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением представляет собой искусственную последовательность мРНК, определенную в данном документе.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой модифицированную последовательность мРНК, предпочтительно модифицированную последовательность мРНК, описанную в данном документе. В данном контексте модификация, определенная в данном документе, предпочтительно приводит к стабилизации последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением. Более предпочтительно, в настоящем изобретении, таким образом, представлена стабилизированная последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, определенную в данном документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, может, таким образом, быть представлено в виде "стабилизированной последовательности мРНК", иными словами, в виде мРНК, которая является по сути устойчивой к разрушению *in vivo* (например, под действием экзо- или эндонуклеазы). Такая стабилизация может обеспечиваться, например, модифицированным фосфатным остовом мРНК согласно настоящему изобретению. Модификация остова применительно к настоящему изобретению представляет собой модификацию, при которой фосфатные группы остова в нуклеотидах, содержащихся в мРНК, подвергнуты химической модификации. Нуклеотиды, которые можно предпочтительно применять в этой связи, содержат, например, фосфотиоат-модифицированный фосфатный остов, при этом предпочтительно по меньшей мере один из атомов кислорода фосфатной группы, содержащихся в фосфатном остове, заменен атомом серы. Стабилизированные мРНК могут дополнительно содержать, например, неионные аналоги фосфатов, такие как, например, алкил- и арилфосфонаты, в которых заряженный атом кислорода фосфатной группы заменен алкильной или арильной группой, или фосфодиэфиры и алкилфосфотриэфиры, в которых заряженный кислородсодержащий остаток присутствует в алкилированной форме. Такие модификации остова, как правило, включают, не предполагая какого-либо ограничения, модификации из группы, состоящей из метилфосфонатов, фосфорамидатов и фосфотиоатов (например, цитидин-5'-O-(1-тиофосфат)).

Ниже описаны конкретные модификации, которые предпочтительно способны "стабилизировать" мРНК, как определено в данном документе.

Химические модификации.

Термин "модификация мРНК", используемый в данном документе, может относиться к химическим модификациям, включающим модификации остова, а также модификации сахарного компонента или модификации азотистого основания.

В данном контексте модифицированная (последовательность) мРНК, определенная в данном документе, может содержать аналоги/модификации нуклеотидов, например, модификации остова, модификации сахарного компонента или модификации азотистого основания. Модификация остова применительно к настоящему изобретению представляет собой модификацию, при которой фосфатные группы остова в нуклеотидах, содержащихся в соединении мРНК, содержащем последовательность мРНК, определенную в данном документе, подвергнуты химической модификации. Модификация сахарного компонента применительно к настоящему изобретению представляет собой химическую модификацию сахарного компонента нуклеотидов соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, определенную в данном документе. Кроме того, модификация азотистого основания применительно к настоящему изобретению представляет собой химическую модификацию компонента, являющегося азотистым основанием, нуклеотидов соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК. В данном контексте аналоги или модификации нуклеотидов предпочтительно выбраны из аналогов нуклеотидов, применимых для транскрипции и/или трансляции.

Модификации сахарного компонента.

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, которые могут быть включены в состав модифицированного соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, описанную в данном документе, могут иметь модификацию сахарного компонента. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована или заменена рядом различных "окси"- или "дезоксид"-заместителей. Примеры "окси"-модификаций 2'-гидроксильной группы включают без ограничения алкокси или арилокси (-OR, например, R=H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG), $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; "запертые" нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил соединен, например, метиленовым мостиком, с 4'-атомом углерода того же самого рибозного сахарного компонента; и аминогруппы (-O-амино, где аминогруппа, например NRR, может представлять собой алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамино, полиамино) или аминоалкокси.

"Дезоксид"-модификации предусматривают водород, amino (например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту) или аминогруппу, которая может быть присоединена к сахарному компоненту посредством линкера, где линкер содержит один или несколько из атомов C, N и O.

Сахарная группа может также содержать один или несколько атомов углерода, имеющих стереохимическую конфигурацию, противоположную таковой для соответствующих атомов углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная мРНК может содержать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахарного компонента.

Модификации остова.

В модифицированных нуклеозидах и нуклеотидах, которые могут быть включены в состав модифицированного соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, описанную в данном документе, может быть дополнительно модифицирован фосфатный остов. Фосфатные группы остова могут быть модифицированы путем замены одного или нескольких атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут предусматривать полную замену немодифицированного фосфатного компонента модифицированным фосфатным компонентом, описанным в данном документе. Примеры модифицированных фосфатных групп включают без ограничения фосфотиоаты, фосфоселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные эфиры, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. В фосфодитиоатах оба нелинкерных атома кислорода заменены атомами серы. Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены линкерного атома кислорода атомом азота (мостиговые фосфорамидаты), серы (мостиговые фосфотиоаты) и углерода (мостиговые метиленфосфонаты).

Модификации азотистого основания.

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, которые могут быть включены в состав модифицированного соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, описанную в данном документе, могут дополнительно иметь модификацию компонента, являющегося нуклеиновым основанием. Примеры нуклеиновых оснований, обнаруживаемых в мРНК, включают без ограничения аденин, гуанин, цитозин и урацил. Например, нуклеозиды и нуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть химически модифицированными со стороны большой бороздки. В некоторых вариантах осуществления химические модификации со стороны большой бороздки могут предусматривать аминогруппу, тиольную группу, алкильную группу или галогеновую группу.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения аналоги/модификации нуклеотидов выбраны из модификаций азотистого основания, которые предпочтительно выбраны из 2-амино-6-хлорпуринрибозид-5'-трифосфата, 2-аминопуринрибозид-5'-трифосфата; 2-аминоаденозин-5'-трифосфата, 2'-амино-2'-дезоксцитидинтрифосфата, 2-тиоцитидин-5'-трифосфата, 2-тиоуридин-5'-трифосфата, 2'-фтортимидин-5'-трифосфата, 2'-О-метилюридин-5'-трифосфата, 4-тиоуридин-5'-трифосфата, 5-аминоаллилцитидин-5'-трифосфата, 5-аминоаллилуридин-5'-трифосфата, 5-бромцитидин-5'-трифосфата, 5-бромуридин-5'-трифосфата, 5-бром-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата, 5-бром-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 5-йодцитидин-5'-трифосфата, 5-йод-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата, 5-йодуридин-5'-трифосфата, 5-йод-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 5-метилцитидин-5'-трифосфата, 5-метилуридин-5'-трифосфата, 5-пропинил-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата, 5-пропинил-2'-дезоксуридин-5'-трифосфата, 6-азацитидин-5'-трифосфата, 6-азауридин-5'-трифосфата, 6-хлорпуринрибозид-5'-трифосфата, 7-дезааденозин-5'-трифосфата, 7-дезазагуанозин-5'-трифосфата, 8-азааденозин-5'-трифосфата, 8-азидоаденозин-5'-трифосфата, бензимидазолрибозид-5'-трифосфата, N1-метиладенозин-5'-трифосфата, N1-метилгуанозин-5'-трифосфата, N6-метиладенозин-5'-трифосфата, O6-метилгуанозин-5'-трифосфата, псевдоуридин-5'-трифосфата или пуромицин-5'-трифосфата, ксантозин-5'-трифосфата. Особое предпочтение в отношении модификаций азотистого основания отдается нуклеотидам, выбранным из группы нуклеотидов с модифицированным азотистым основанием, состоящей из 5-метилцитидин-5'-трифосфата, 7-дезазагуанозин-5'-трифосфата, 5-бромцитидин-5'-трифосфата и псевдоуридин-5'-трифосфата.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают пиридин-4-оновый рибонуклеозид, 5-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 2-

тиопсевдоурин, 5-гидроксиурин, 3-метилурин, 5-карбоксиметилурин, 1-карбоксиметилпсевдоурин, 5-пропинилурин, 1-пропинилпсевдоурин, 5-тауринометилурин, 1-тауринометилпсевдоурин, 5-тауринометил-2-тиоурин, 1-тауринометил-4-тиоурин, 5-метилурин, 1-метилпсевдоурин, 4-тио-1-метилпсевдоурин, 2-тио-1-метилпсевдоурин, 1-метил-1-дезапсевдоурин, 2-тио-1-метил-1-дезапсевдоурин, дигидроурин, дигидропсевдоурин, 2-тиодигидроурин, 2-тиодигидропсевдоурин, 2-метоксиурин, 2-метокси-4-тиоурин, 4-метокспсевдоурин и 4-метокси-2-тиопсевдоурин.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 5-азацитидин, псевдоизоцитидин, 3-метилцитидин, N4-ацетилцитидин, 5-формилцитидин, N4-метилцитидин, 5-гидроксиметилцитидин, 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролоцитидин, пирролопсевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин, 2-тио-5-метилцитидин, 4-тиопсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, зебуларин, 5-азазебуларин, 5-метилзебуларин, 5-аза-2-тиозебуларин, 2-тиозебуларин, 2-метоксицитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метокспсевдоизоцитидин и 4-метокси-1-метилпсевдоизоцитидин.

В других вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 7-дезаадин, 7-деза-8-азаадин, 7-деза-2-аминопурин, 7-деза-8-аза-2-аминопурин, 7-деза-2,6-диаминопурин, 7-деза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метиладенозин, N6-метиладенозин, N6-изопентениладенозин, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, N6-глицинилкарбамоиладенозин, N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6,N6-диметиладенозин, 7-метиладин, 2-метилтиоадин и 2-метоксиадин.

В других вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают инозин, 1-метилюинозин, виозин, вибутозин, 7-дезагуанозин, 7-деза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-дезагуанозин, 6-тио-7-деза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин, 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метилюинозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин, N2-метилгуанозин, N2,N2-диметилгуанозин, 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N2-метил-6-тиогуанозин и N2,N2-диметил-6-тиогуанозин.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид может быть модифицирован со стороны большой бороздки и может предусматривать замену атома водорода при C-5 урацила метильной группой или галогеновой группой. В конкретных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой 5'-O-(1-тиофосфат)аденозин, 5'-O-(1-тиофосфат)цитидин, 5'-O-(1-тиофосфат)гуанозин, 5'-O-(1-тиофосфат)урин или 5'-O-(1-тиофосфат)псевдоурин.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления модифицированная мРНК может содержать модификации нуклеозидов, выбранные из 6-азацитидина, 2-тиоцитидина, а-тиоцитидина, псевдоизоцитидина, 5-аминоаллилуридина, 5-йодуридина, N1-метилпсевдоуридина, 5,6-дигидроуридина, а-тиоуридина, 4-тиоуридина, 6-азауридина, 5-гидроксиуридина, дезокситимидина, 5-метилуридина, пирролоцитидина, инозина, α -тиогуанозина, 6-метилгуанозина, 5-метилцитидина, 8-оксогуанозина, 7-дезагуанозина, N1-метиладенозина, 2-амино-6-хлорпурина, N6-метил-2-аминопурина, псевдоизоцитидина, 6-хлорпурина, N6-метиладенозина, α -тиоаденозина, 8-азидоаденозина, 7-дезааденозина.

В очень конкретном варианте осуществления настоящего изобретения соединение мРНК не содержит модификации азотистого основания, описанной выше.

Липидная модификация.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления модифицированное соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, определенную в данном документе, может содержать липидную модификацию. Такая мРНК с липидной модификацией, как правило, содержит мРНК, определенную в данном документе. Такая мРНК с липидной модификацией, определенная в данном документе, как правило, дополнительно содержит по меньшей мере один линкер, ковалентно связанный с этой мРНК, и по меньшей мере один липид, ковалентно связанный с соответствующим линкером. В качестве альтернативы, мРНК с липидной модификацией содержит по меньшей мере одну мРНК, определенную в данном документе, и по меньшей мере один (бифункциональный) липид, ковалентно связанный (без использования линкера) с этой мРНК. В соответствии с третьей альтернативой мРНК с липидной модификацией содержит молекулу мРНК, определенную в данном документе, по меньшей мере один линкер, ковалентно связанный с этой мРНК, и по меньшей мере один липид, ковалентно связанный с соответствующим линкером, а также по меньшей мере один (бифункциональный) липид, ковалентно связанный (без использования линкера) с этой мРНК. В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы липидная модификация присутствовала на концах линейной последовательности мРНК.

Модификации последовательности.

Модификация содержания G/C.

В соответствии с другим вариантом осуществления липидные наночастицы, содержащие мРНК, содержат соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, которая может быть модифицированной, и в силу этого стабилизированной, посредством модификации содержания пары гуанозин/цитозин

(G/C) в последовательности мРНК, предпочтительно в по меньшей мере одной кодирующей области соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК согласно настоящему изобретению.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения содержание G/C в кодирующей области соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, модифицировано, в частности увеличено, по сравнению с содержанием G/C в кодирующей области соответствующей мРНК дикого типа, т.е. немодифицированной мРНК. Аминокислотная последовательность, кодируемая данной мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей мРНК дикого типа. Эта модификация последовательности мРНК согласно настоящему изобретению производится, исходя из того, что последовательность любой области мРНК, которая должна транслироваться, является важной для эффективной трансляции этой мРНК. Таким образом, состав мРНК и последовательность различных нуклеотидов являются важными. В частности, последовательности, характеризующиеся увеличенным содержанием пары G (гуанозин)/C (цитозин), являются более стабильными, чем последовательности, характеризующиеся увеличенным содержанием пары A (аденозин)/U (урацил). В соответствии с настоящим изобретением кодоны мРНК, таким образом, изменены по сравнению с соответствующей мРНК дикого типа при сохранении транслируемой аминокислотной последовательности таким образом, что они содержат увеличенное количество пар нуклеотидов G/C. С учетом того, что несколько кодонов кодируют одну и ту же аминокислоту (так называемой вырожденности генетического кода), можно определить кодоны, наиболее благоприятные для стабильности (в соответствии с так называемой альтернативной частотой использования кодонов). В зависимости от аминокислоты, которая должна кодироваться мРНК, существуют различные возможности для модификации последовательности мРНК по сравнению с ее последовательностью дикого типа. В случае с аминокислотами, которые кодируются кодонами, содержащими исключительно нуклеотиды G или C, модификация кодона не требуется. Таким образом, для кодонов, кодирующих Pro (CCC и CCG), Arg (CGC или CGG), Ala (GCC или GCG) и Gly (GGC или GGG), не нужна модификация, поскольку A или U отсутствуют. В отличие от этого, кодоны, которые содержат нуклеотиды A и/или U, могут быть модифицированы путем замены другими кодонами, которые кодируют те же самые аминокислоты, но не содержат A и/или U. Их примерами являются: кодоны, кодирующие Pro, которые могут быть модифицированы путем замены CCU или CCA на CCC или CCG; кодоны, кодирующие Arg, которые могут быть модифицированы путем замены CGU, или CGA, или AGA, или AGG на CGC или CGG; кодоны, кодирующие Ala, которые могут быть модифицированы путем замены GCU или GCA на GCC или GCG; кодоны, кодирующие Gly, которые могут быть модифицированы путем замены GGU или GGA на GGC или GGG. В других случаях, хотя нуклеотиды A или U нельзя удалить из кодонов, возможно, однако, уменьшить содержание A и U путем использования кодонов, имеющих более низкое содержание нуклеотидов A и/или U. Их примерами являются кодоны, кодирующие Phe, которые могут быть модифицированы путем замены UUU на UUC; кодоны, кодирующие Leu, которые могут быть модифицированы путем замены UUA, UUG, CUU или CUA на CUC или CUG; кодоны, кодирующие Ser, которые могут быть модифицированы путем замены UCU, или UCA, или AGU на UCC, UCG или AGC; кодон, кодирующий Tug, который может быть модифицирован путем замены UAU на UAC; кодон, кодирующий Cys, который может быть модифицирован путем замены UGU на UGC; кодон, кодирующий His, который может быть модифицирован путем замены CAU на CAC; кодон, кодирующий Gln, который может быть модифицирован путем замены CAA на CAG; кодон, кодирующий Ile, который может быть модифицирован путем замены AUU или AUA на AUC; кодоны, кодирующие Thr, которые могут быть модифицированы путем замены ACU или ACA на ACC или ACG; кодон, кодирующий Asn, который может быть модифицирован путем замены AAU на AAC; кодон, кодирующий Lys, который может быть модифицирован путем замены AAA на AAG; кодоны, кодирующие Val, которые могут быть модифицированы путем замены GUU или GUA на GUC или GUG; кодон, кодирующий Asp, который может быть модифицирован путем замены GAU на GAC; кодон, кодирующий Glu, который может быть модифицирован путем замены GAA на GAG; стоп-кодон UAA, который может быть модифицирован путем замены на UAG или UGA. В то же время в случае с кодонами, кодирующими Met (AUG) и Trp (UGG), отсутствует возможность модификации последовательности. Замены, перечисленные выше, можно использовать по отдельности или во всех возможных комбинациях для увеличения содержания G/C в последовательности мРНК согласно настоящему изобретению по сравнению с ее конкретной мРНК дикого типа (т.е. исходной последовательностью). Таким образом, например, все кодоны, кодирующие Thr, встречающиеся в последовательности дикого типа, могут быть модифицированы путем замены на ACC (или ACG). Однако предпочтительно использовать, например, комбинации вышеупомянутых возможностей замен:

замену всех кодонов, кодирующих Thr, в исходной последовательности (мРНК дикого типа) на ACC (или ACG) и замену всех кодонов, изначально кодирующих Ser, на UCC (или UCG, или AGC);

замену всех кодонов, кодирующих Ile, в исходной последовательности на AUC, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Lys, на AAG, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Tug, на UAC;

замену всех кодонов, кодирующих Val, в исходной последовательности на GUC (или GUG), и заме-

ну всех кодонов, изначально кодирующих Glu, на GAG, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Ala, на GCC (или GCG), и замену всех кодонов, изначально кодирующих Arg, на CGC (или CGG);

замену всех кодонов, кодирующих Val, в исходной последовательности на GUC (или GUG), и замену всех кодонов, изначально кодирующих Glu, на GAG, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Ala, на GCC (или GCG), и замену всех кодонов, изначально кодирующих Gly, на GGC (или GGG), и замену всех кодонов, изначально кодирующих Asp, на AAC;

замену всех кодонов, кодирующих Val, в исходной последовательности на GUC (или GUG), и замену всех кодонов, изначально кодирующих Phe, на UUC, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Cys, на UGC, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Leu, на CUG (или CUC), и замену всех кодонов, изначально кодирующих Gln, на CAG, и замену всех кодонов, изначально кодирующих Pro, на CCC (или CCG); и т.д.

Содержание G/C в кодирующей области соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно увеличено на по меньшей мере 7%, более предпочтительно на по меньшей мере 15%, особенно предпочтительно на по меньшей мере 20% по сравнению с содержанием G/C в кодирующей области РНК дикого типа, которая кодирует антиген, определенный в данном документе, или его фрагмент или вариант. В соответствии с конкретным вариантом осуществления 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% заменяемых кодонов в области, кодирующей пептид или белок, определенный в данном документе, или его фрагмент или вариант, или в целой последовательности мРНК дикого типа заменены с увеличением таким образом содержания G/C в указанной последовательности. В данном контексте особенно предпочтительным является увеличение содержания G/C в последовательности мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно в по меньшей мере одной кодирующей области последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением, до максимального (т.е. 100% заменяемых кодонов) по сравнению с последовательностью дикого типа. В соответствии с настоящим изобретением дополнительная предпочтительная модификация последовательности мРНК согласно настоящему изобретению проводится на основании обнаружения того, что эффективность трансляции также определяется разной частотой встречаемости тРНК в клетках. Таким образом, если в последовательности мРНК согласно настоящему изобретению в большей степени присутствуют так называемые "редко используемые кодоны", то соответствующая модифицированная последовательность мРНК транслируется в значительно более слабой степени, чем в случае присутствия кодонов, для которых предназначены относительно "часто встречающиеся" тРНК. В соответствии с настоящим изобретением в модифицированной последовательности мРНК согласно настоящему изобретению область, кодирующая пептид или белок, определенный в данном документе, или его фрагмент или вариант, является модифицированной по сравнению с соответствующей областью последовательности мРНК дикого типа таким образом, что по меньшей мере один кодон последовательности дикого типа, для которого предназначена тРНК, относительно редко встречающаяся в клетке, заменен кодоном, для которого предназначена тРНК, относительно часто встречающаяся в клетке и переносящая ту же самую аминокислоту, что и относительно редко встречающаяся тРНК. Посредством данной модификации последовательность мРНК согласно настоящему изобретению модифицируется таким образом, что вставляются кодоны, для которых доступны часто встречающиеся тРНК. Другими словами, в соответствии с настоящим изобретением посредством данной модификации все кодоны последовательности дикого типа, для которых предназначена тРНК, относительно редко встречающаяся в клетке, могут в каждом случае быть заменены кодоном, для которого предназначена тРНК, относительно часто встречающаяся в клетке и в каждом случае переносящая ту же самую аминокислоту, что и относительно редко встречающаяся тРНК. То, какие тРНК встречаются относительно часто в клетке, а какие, наоборот, встречаются относительно редко, известно специалисту в данной области; см., например, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Кодоны, которые используют для конкретной аминокислоты тРНК, встречающуюся наиболее часто, например, кодон, кодирующий Gly, который использует тРНК, наиболее часто встречающуюся в клетке (человека), являются особенно предпочтительными. В соответствии с настоящим изобретением особенно предпочтительным является установление связи между содержанием G/C в последовательности, которое является увеличенным, в частности максимально увеличенным, в модифицированной последовательности мРНК согласно настоящему изобретению, и "часто используемыми" кодонами без модификации аминокислотной последовательности белка, кодируемого кодирующей областью последовательности мРНК. Данный предпочтительный вариант осуществления позволяет получить особенно эффективно транслируемую и стабилизированную (модифицированную) последовательность мРНК согласно настоящему изобретению. Определение модифицированной последовательности мРНК согласно настоящему изобретению, описанной выше (увеличенное содержание G/C; замена кодонов для тРНК), можно проводить с помощью компьютерной программы, поясняемой в WO 02/098443, содержание раскрытия которой включено в полном объеме в настоящее изобретение. С помощью данной компьютерной программы нуклеотидную последовательность в любой необходимой последовательности мРНК можно модифицировать с использованием генетического кода или его вырожденной природы таким образом, чтобы в результате получить макси-

мальное содержание G/C, в комбинации с использованием кодонов, для которых предназначены тРНК, встречающиеся в клетке как можно чаще, при этом аминокислотная последовательность, кодируемая модифицированной последовательностью мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с немодифицированной последовательностью. В качестве альтернативы также возможно модифицировать только содержание G/C или только частоту использования кодонов по сравнению с исходной последовательностью. Исходный код в Visual Basic 6.0 (используемая среда разработки: Microsoft Visual Studio Enterprise 6.0 с Servicepack 3) также описан в WO 02/098443. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения содержание A/U в окружении участка связывания рибосомы последовательности мРНК согласно настоящему изобретению является увеличенным по сравнению с содержанием A/U в окружении участка связывания рибосомы соответствующей ей мРНК дикого типа. Данная модификация (увеличенное содержание A/U около участка связывания рибосомы) обеспечивает увеличение эффективности связывания рибосомы с мРНК. Эффективное связывание рибосом с участком связывания рибосомы (последовательность Козак: SEQ ID NO: 224307 или SEQ ID NO: 224308, AUG образует стартовый кодон), в свою очередь, оказывает эффект эффективной трансляции мРНК. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения последовательность мРНК согласно настоящему изобретению может быть модифицированной в отношении потенциально дестабилизирующих элементов последовательностей. В частности, кодирующая область и/или 5'- и/или 3'-нетранслируемая область данной последовательности мРНК может быть модифицированной по сравнению с соответствующей мРНК дикого типа таким образом, чтобы она не содержала дестабилизирующих элементов последовательностей, при этом аминокислотная последовательность, кодируемая модифицированной последовательностью мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с последовательностью, кодируемой соответствующей мРНК дикого типа. Известно, что, например, в последовательностях эукариотических мРНК встречаются дестабилизирующие элементы последовательностей (DSE), с которыми связываются сигнальные белки, регулирующие ферментативное разрушение мРНК *in vivo*. Для дополнительной стабилизации модифицированной последовательности мРНК, необязательно в области, которая кодирует по меньшей мере один пептид или белок, определенный в данном документе, или его фрагмент или вариант, можно, таким образом, проводить одну или несколько таких модификаций по сравнению с соответствующей областью мРНК дикого типа так, чтобы в ней не содержались или фактически не содержались дестабилизирующие элементы последовательностей. В соответствии с настоящим изобретением DSE, присутствующие в нетранслируемых областях (3'- и/или 5'-UTR), также можно удалить из последовательности мРНК согласно настоящему изобретению посредством таких модификаций. Такими дестабилизирующими последовательностями являются, например AU-богатые последовательности (AURES), которые встречаются в участках 3'-UTR многочисленных нестабильных мРНК (Caput et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670-1674). Последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, следовательно, предпочтительно является модифицированной по сравнению с соответствующей мРНК дикого типа таким образом, что последовательность мРНК согласно настоящему изобретению не содержит таких дестабилизирующих последовательностей. Это также применимо к тем мотивам последовательностей, которые распознаются возможными эндонуклеазами, например, к последовательности GAACAAG, которая содержится в сегменте 3'-UTR гена, кодирующего рецептор трансферрина (Binder et al., EMBO J. 1994, 13: 1969-1980). Эти мотивы последовательностей также предпочтительно удалены из последовательности мРНК согласно настоящему изобретению.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)" или соответственно "столбца C" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 64025-78055, 224085-224106, 192073-206103 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит

последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 90422-92600, 224107-224112, 218470-220648 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 78056-90421, 224113, 224313-224317, 206104-218469 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 92601-94528, 220649-222576 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 94529-96036, 224271-224273, 222577-224084 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, идентичную или характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 64025-96036, 192073-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 64025-96036, 192073-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

Последовательности, адаптированные в соответствии с частотой использования кодонов у человека В соответствии с настоящим изобретением дополнительная предпочтительная модификация соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, содержащуюся в мРНК липидных наночастиц, содержащих мРНК согласно настоящему изобретению, проводится на основании обнаружения того, что кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту, как правило, встречаются с разной частотой. В соответствии с настоящим изобретением в модифицированном соединении мРНК, содержащем последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, кодирующая область, определенная в данном документе, предпочтительно является модифицированной по сравнению с соответствующей кодирующей областью соответствующей мРНК дикого типа таким образом, что частота встречаемости кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту, соответствует природной частоте встречаемости этого кодона в соответствии с частотой использования кодонов у человека, как, например, показано в табл. 1а (таблице частоты использования кодонов у человека).

Например, в случае присутствия аминокислоты аланина (Ala) в аминокислотной последовательности, кодируемой по меньшей мере одной кодирующей областью соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, кодирующая область дикого типа предпочтительно адаптирована таким образом, что кодон "GCC" используется с частотой 0,40, кодон "GCT" используется с частотой 0,28, кодон "GCA" используется с частотой 0,22, а кодон "GCG" используется с частотой 0,10 и т.д. (см. табл. 1а).

Таблица 1а. Таблица частоты использования кодонов у человека

Аминокислота	Кодон	Доля	/1000	Аминокислота	Кодон	Доля	/1000
Ala	GCG	0,10	7,4	Pro	CCG	0,11	6,9
Ala	GCA	0,22	15,8	Pro	CCA	0,27	16,9
Ala	GCT	0,28	18,5	Pro	CCT	0,29	17,5
Ala	GCC*	0,40	27,7	Pro	CCC*	0,33	19,8
Cys	TGT	0,42	10,6	Gln	CAG*	0,73	34,2
Cys	TGC*	0,58	12,6	Gln	CAA	0,27	12,3
Asp	GAT	0,44	21,8	Arg	AGG	0,22	12,0
Asp	GAC*	0,56	25,1	Arg	AGA*	0,21	12,1
Glu	GAG*	0,59	39,6	Arg	CGG	0,19	11,4
Glu	GAA	0,41	29,0	Arg	CGA	0,10	6,2
Phe	TTT	0,43	17,6	Arg	CGT	0,09	4,5
Phe	TTC*	0,57	20,3	Arg	CGC	0,19	10,4
Gly	GGG	0,23	16,5	Ser	AGT	0,14	12,1
Gly	GGA	0,26	16,5	Ser	AGC*	0,25	19,5
Gly	GGT	0,18	10,8	Ser	TCG	0,06	4,4
Gly	GGC*	0,33	22,2	Ser	TCA	0,15	12,2
His	CAT	0,41	10,9	Ser	TCT	0,18	15,2
His	CAC*	0,59	15,1	Ser	TCC	0,23	17,7
Ile	ATA	0,14	7,5	Thr	ACG	0,12	6,1
Ile	ATT	0,35	16,0	Thr	ACA	0,27	15,1
Ile	ATC*	0,52	20,8	Thr	ACT	0,23	13,1
Lys	AAG*	0,60	31,9	Thr	ACC*	0,38	18,9
Lys	AAA	0,40	24,4	Val	GTG*	0,48	28,1
Leu	TTG	0,12	12,9	Val	GTA	0,10	7,1
Leu	TTA	0,06	7,7	Val	GTT	0,17	11,0
Leu	CTG*	0,43	39,6	Val	GTC	0,25	14,5
Leu	CTA	0,07	7,2	Trp	TGG*	1	13,2
Leu	CTT	0,12	13,2	Tyr	TAT	0,42	12,2
Leu	CTC	0,20	19,6	Tyr	TAC*	0,58	15,3
Met	ATG*	1	22,0	Стоп-кодон	TGA*	0,61	1,6
Asn	AAT	0,44	17,0	Стоп-кодон	TAG	0,17	0,8
Asn	AAC*	0,56	19,1	Стоп-кодон	TAA	0,22	1,0

*наиболее часто используемый кодон.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 128049-160060 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 128049-142079 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 154446-156624 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 142080-154445 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 156625-158552 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 158553-160060 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из вируса Эбола, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 20-44 из заявки на патент WO 2016097065 или фрагменты или варианты этих последовательностей или состоит из них. В данном контексте SEQ ID NO: 20-44 из WO 2016097065 и раскрытие, относящееся к SEQ ID NO: 20-44 из WO 2016097065, включены в данный документ посредством ссылки.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, идентичную или характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 128049-160060 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 128049-160060, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

Кодон-оптимизированные последовательности.

Как описано выше, в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно, чтобы все кодоны последовательности дикого типа, для которых предназначена тРНК, относительно редко встречающаяся в клетке, были заменены кодоном, для которого предназначена тРНК, относительно часто встречающаяся в клетке и в каждом случае переносящая ту же самую аминокислоту, что и относительно редко встречающаяся тРНК. Следовательно, особенно предпочтительно, чтобы для каждой кодируемой аминокислоты использовали наиболее часто используемые кодоны (см. табл. 1а, "Таблица частоты использования кодонов у человека", наиболее часто используемые кодоны отмечены звездочками). В результате такой процедуры оптимизации увеличивается индекс адаптации кодонов (CAI), и в конечном счете CAI максимально увеличивается. В контексте настоящего изобретения последовательности с увеличенным или максимально увеличенным CAI, как правило, называются "кодон-оптимизированными" последовательностями и/или последовательностями с увеличенным CAI и/или максимально увеличенным CAI. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область/последовательность является кодон-оптимизированной, как описано в данном документе. Более предпочтительно, чтобы индекс адаптации кодонов (CAI) по меньшей мере одной кодирующей последовательности составлял по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9 или по меньшей мере 0,95. Наиболее предпочтительно, чтобы индекс адаптации кодонов (CAI) по

меньшей мере одной кодирующей последовательности составлял 1.

Например, в случае присутствия аминокислоты аланина (Ala) в аминокислотной последовательности, кодируемой по меньшей мере одной кодирующей последовательностью РНК в соответствии с настоящим изобретением, кодирующая последовательность дикого типа адаптирована таким образом, что для указанной аминокислоты всегда используется наиболее часто используемый у человека кодон "GCC", или, в случае с аминокислотой цистеином (Cys), последовательность дикого типа адаптирована таким образом, что для указанной аминокислоты всегда используется наиболее часто используемый у человека кодон "TGC", и т.д.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 160061-192072 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 160061-174091 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 186458-188636 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 174092-186457 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 188637-190564 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 190565-192072 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, идентичную или характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 160061-192072, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 160061-192072,

или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

С-оптимизированные последовательности.

В соответствии с другим вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, может быть модифицировано посредством модификации, предпочтительно увеличения, содержания цитозина (С) в последовательности мРНК, предпочтительно в кодирующей области последовательности мРНК.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения содержание С в кодирующей области последовательности мРНК согласно настоящему изобретению модифицировано, предпочтительно увеличено, по сравнению с содержанием С в кодирующей области соответствующей мРНК дикого типа, т.е. немодифицированной мРНК. Аминокислотная последовательность, кодируемая по меньшей мере одной кодирующей областью последовательности мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей мРНК дикого типа.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированная последовательность мРНК модифицирована таким образом, что достигается по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80 или по меньшей мере 90% от теоретически возможного максимального содержания цитозина или даже максимальное содержание цитозина.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или даже 100% кодонов целевой последовательности мРНК дикого типа, являющихся "оптимизируемыми по содержанию цитозина", заменены кодонами, имеющими более высокое содержание цитозина, чем в кодонах, присутствующих в последовательности дикого типа.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления некоторые из кодонов кодирующей последовательности дикого типа могут быть дополнительно модифицированы таким образом, чтобы кодон, для которого предназначена тРНК, относительно редко встречающаяся в клетке, был заменен кодоном, для которого предназначена тРНК, относительно часто встречающаяся в клетке, при условии, что относительно часто встречающаяся тРНК, которая предназначена для заменяющего кодона, переносит ту же аминокислоту, что и относительно редко встречающаяся тРНК, которая предназначена для исходного кодона дикого типа. Предпочтительно, чтобы все кодоны, для которых предназначена относительно редко встречающаяся тРНК, были заменены кодоном, для которого предназначена тРНК, относительно часто встречающаяся в клетке, за исключением кодонов, кодирующих аминокислоты, которые кодируются исключительно кодонами, не содержащими каких-либо цитозиновых оснований, или за исключением глутамина (Gln), который кодируется двумя кодонами, оба из которых содержат одинаковое количество цитозиновых оснований.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения модифицированная целевая мРНК модифицирована таким образом, что с помощью кодонов, для которых предназначены тРНК, относительно часто встречающиеся в клетке, достигается по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% от теоретически возможного максимального содержания цитозина или даже максимальное содержание цитозина, при этом аминокислотная последовательность остается неизменной.

Вследствие природной вырожденности генетического кода конкретную аминокислоту может кодировать более чем один кодон. Соответственно, 18 из 20 встречающихся в природе аминокислот кодируются более чем одним кодоном (за исключением Трип и Met), например, 2 кодонами (например, Cys, Asp, Glu), тремя кодонами (например, Ile), 4 кодонами (например, Al, Gly, Pro) или 6 кодонами (например, Leu, Arg, Ser). Однако не все кодоны, кодирующие одну и ту же аминокислоту, используются с одинаковой частотой в условиях *in vivo*. В зависимости от каждого отдельного организма устанавливается типичный профиль частоты использования кодонов.

Термин "кодон, оптимизируемый по содержанию цитозина", используемый в контексте настоящего изобретения, относится к кодонам, которые характеризуются более низким содержанием цитозиновых оснований, чем другие кодоны, кодирующие ту же самую аминокислоту. Соответственно, любой кодон дикого типа, который может быть заменен другим кодоном, кодирующим ту же самую аминокислоту и характеризующимся большим количеством цитозиновых оснований в этом кодоне, считается оптимизируемым по содержанию цитозина (С-оптимизируемым). Любая такая замена С-оптимизируемого кодона дикого типа конкретным С-оптимизированным кодоном в пределах кодирующей области дикого типа приводит к увеличению общего содержания С в ней и отражает С-обогащенную модифицированную последовательность мРНК. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК согласно настоящему изобретению, содержит последовательность мРНК с максимально увеличенным содержанием С, содержащую С-оптимизированные кодоны вместо всех потенциально С-оптимизируемых кодонов, или состоит из нее. Соответственно, 100% всех теоретически заменяемых С-оптимизируемых кодонов предпочтительно заменены С-оптимизированными кодонами по всей длине кодирующей области.

В данном контексте кодоны, оптимизируемые по содержанию цитозина, представляют собой кодоны, содержащие меньшее количество цитозиновых оснований, чем другие кодоны, кодирующие ту же

самую аминокислоту.

Любой из кодонов GCG, GCA, GCU, которые кодируют аминокислоту Ala, может быть заменен кодоном GCC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

кодон UGU, который кодирует Cys, может быть заменен кодоном UGC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

кодон GAU, который кодирует Asp, может быть заменен кодоном GAC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

кодон UUU, который кодирует Phe, может быть заменен кодоном UUC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов GGG, GGA, GGU, которые кодируют Gly, может быть заменен кодоном GGC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

кодон CAU, который кодирует His, может быть заменен кодоном CAC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов AUA, AUU, которые кодируют Ile, может быть заменен кодоном AUC, и/или

любой из кодонов UUG, UUA, CUG, CUA, CUU, кодирующих Leu, может быть заменен кодоном CUC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

кодон AAU, который кодирует Asn, может быть заменен кодоном AAC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов CCG, CCA, CCU, кодирующих Pro, может быть заменен кодоном CCC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов AGG, AGA, CGG, CGA, CGU, кодирующих Arg, может быть заменен кодоном CGC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов AGU, AGC, UCG, UCA, UCU, кодирующих Ser, может быть заменен кодоном UCC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов ACG, ACA, ACU, кодирующих Thr, может быть заменен кодоном ACC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

любой из кодонов GUG, GUA, GUU, кодирующих Val, может быть заменен кодоном GUC, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или

кодон UAU, кодирующий Tyr, может быть заменен кодоном UAC, кодирующим ту же самую аминокислоту.

В любом из вышеупомянутых случаев количество цитозиновых оснований увеличивается на 1 для каждого заменяемого кодона. Замена всех кодонов, не являющихся С-оптимизированными (соответствующих С-оптимизируемому кодоном), в кодирующей области приводит к получению кодирующей последовательности с максимально увеличенным содержанием С. В контексте настоящего изобретения по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90% кодонов, не являющихся С-оптимизированными, в пределах по меньшей мере одной кодирующей области последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением заменены С-оптимизированными кодонами.

Может быть предпочтительно, чтобы для некоторых аминокислот процентная доля С-оптимизируемых кодонов, замененных С-оптимизированными кодонами, составляла меньше 70%, тогда как для других аминокислот процентная доля замененных кодонов превышала 70%, с достижением общего процентного значения С-оптимизации, составляющего по меньшей мере 70% всех С-оптимизируемых кодонов дикого типа в кодирующей области.

В С-оптимизированной последовательности мРНК согласно настоящему изобретению предпочтительно по меньшей мере 50% С-оптимизируемых кодонов дикого типа, кодирующих любую указанную аминокислоту, заменены С-оптимизированными кодонами, например, любая модифицированная С-обогащенная последовательность мРНК предпочтительно содержит по меньшей мере 50% С-оптимизированных кодонов в положениях С-оптимизируемых кодонов дикого типа, кодирующих любую из вышеуказанных аминокислот Ala, Cys, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val и Tyr, предпочтительно по меньшей мере 60%.

В данном контексте кодоны, не являющиеся оптимизируемыми по содержанию цитозина, которые, тем не менее, кодируют аминокислоты, кодируемые по меньшей мере двумя кодонами, можно использовать без какого-либо дополнительного процесса отбора. Однако кодон в последовательности дикого типа, для которого предназначена тРНК, относительно редко встречающаяся в клетке, например, в клетке человека, может быть заменен кодоном, для которого предназначена тРНК, относительно часто встречающаяся в клетке, при этом они оба кодируют одну и ту же аминокислоту. Соответственно, относительно редко используемый кодон GAA, кодирующий Glu, может быть заменен относительно часто используемым кодоном GAG, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или относительно редко используемый кодон AM, кодирующий Lys, может быть заменен относительно часто используемым кодоном AAG, кодирующим ту же самую аминокислоту, и/или относительно редко используемый кодон САА, кодирующий Gln, может быть заменен относительно часто используемым кодоном CAG, кодирующим ту же самую аминокислоту.

В данном контексте аминокислоты Met (AUG) и Trp (UGG), каждая из которых кодируется только одним кодоном, остаются неизмененными. Стоп-кодона не являются оптимизируемыми по содержанию цитозина, однако, относительно редко используемые стоп-кодона - янтарь, охра (UAA, UAG) - могут быть заменены относительно часто встречающимся стоп-кодом опалом (UGA).

Единичные замены, перечисленные выше, можно использовать по отдельности, а также во всех возможных комбинациях с целью оптимизации содержания цитозина в модифицированной последовательности мРНК по сравнению с последовательностью мРНК дикого типа.

Соответственно, по меньшей мере одна кодирующая последовательность, определенная в данном документе, может быть изменена по сравнению с кодирующей областью соответствующей мРНК дикого типа таким образом, чтобы для аминокислоты, кодируемой по меньшей мере двумя или более кодонами, один из которых содержит одно дополнительное цитозиновое основание, такой кодон мог быть заменен С-оптимизированным кодоном, содержащим одно дополнительное цитозиновое основание, при этом аминокислота являлась предпочтительно неизменной по сравнению с последовательностью дикого типа.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 96037-128048 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 96037-110067 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 122434-124612 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 110068-122433 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа В, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 124613-126540 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с дополнительным особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, определенную в данном документе, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина вируса бешенства, где кодирующая область содержит любую из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 126541-128048 или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна кодирующая область последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность РНК, идентичную или характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 96037-128048, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей,

или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления по меньшей мере одна кодирующая область соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит последовательность РНК, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из (модифицированных) последовательностей РНК в соответствии с SEQ ID NO: 96037-128048, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления в настоящем изобретении представлены липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, определенную в данном документе, где содержание G/C в по меньшей мере одной кодирующей области последовательности мРНК является увеличенным по сравнению с содержанием G/C в соответствующей кодирующей области соответствующей мРНК дикого типа, и/или где содержание C по меньшей мере в одной кодирующей области последовательности мРНК является увеличенным по сравнению с содержанием C в соответствующей кодирующей области соответствующей мРНК дикого типа, и/или где кодоны по меньшей мере в одной кодирующей области последовательности мРНК адаптированы в соответствии с частотой использования кодонов у человека, где индекс адаптации кодонов (CAI) предпочтительно является увеличенным или максимально увеличенным в по меньшей мере одной кодирующей области последовательности мРНК, и где аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой соответствующей мРНК дикого типа.

5'-кэп-структура.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения модифицированная последовательность мРНК, определенная в данном документе, может быть модифицирована путем добавления так называемой "5'-кэп-структуры", которая предпочтительно стабилизирует мРНК, описанную в данном документе. 5'-кэп представляет собой структурную единицу, как правило, структурную единицу с модифицированными нуклеотидами, которая обычно "кэпирует" 5'-конец зрелой мРНК. 5'-кэп может, как правило, быть образован модифицированным нуклеотидом, в частности производным гуанинового нуклеотида. 5'-кэп предпочтительно соединен с 5'-концом посредством 5'-5'-трифосфатной связи. 5'-кэп может быть метилированным, например, в случае с m7GpppN, где N представляет собой 5'-концевой нуклеотид нуклеиновой кислоты, несущей 5'-кэп, как правило, на 5'-конце мРНК. m7GpppN представляет собой 5'-кэп-структуру, которая встречается в природе в мРНК, транскрибируемой под действием полимеразы II, и, следовательно, предпочтительно не считается в данном контексте модификацией, содержащейся в модифицированной мРНК. Соответственно, модифицированная последовательность мРНК согласно настоящему изобретению может содержать m7GpppN в качестве 5'-кэпа, но модифицированная последовательность мРНК, как правило, дополнительно содержит по меньшей мере одну дополнительную модификацию, определенную в данном документе.

Дополнительные примеры 5'-кэп-структур включают глицерил, "перевернутый" дезоксирибозный остаток (компонент), лишенный азотистого основания, 4',5'-метиленимодифицированный нуклеотид, 1-(бета-D-эритрофуранозил)-модифицированный нуклеотид, 4'-тиомодифицированный нуклеотид, карбоциклический нуклеотид, 1,5-ангидрогекситмодифицированный нуклеотид, L-нуклеотиды, альфа-нуклеотид, нуклеотид с модифицированным азотистым основанием, тиреонопентофуранозилмодифицированный нуклеотид, ациклический 3',4'-секо-нуклеотид, ациклический 3,4-дигидроксипентилмодифицированный нуклеотид, ациклический 3,5-дигидроксипентилмодифицированный нуклеотид, 3'-3'-"перевернутый" нуклеотидный компонент, 3'-3'-"перевернутый" компонент, лишенный азотистого основания, 3'-2'-"перевернутый" нуклеотидный компонент, 3'-2'-"перевернутый" компонент, лишенный азотистого основания, 1,4-бутандиолфосфатный, 3'-фосфорамидатный, гексилфосфатный, аминоксилфосфатный, 3'-фосфатный, 3'-фосфотиоатный, фосфодитиоатный или мостиковый или немостиковый метилфосфонатный компонент. Эти модифицированные 5'-кэп-структуры рассматриваются в качестве по меньшей мере одной модификации в данном контексте.

Особенно предпочтительными модифицированными 5'-кэп-структурами являются кэп 1 (метилирование рибозы нуклеотида, смежного с m7G), кэп 2 (дополнительное метилирование рибозы 2-го нуклеотида ниже m7G), кэп 3 (дополнительное метилирование рибозы 3-го нуклеотида ниже m7G), кэп 4 (метилирование рибозы 4-го нуклеотида ниже m7G), ARCA (аналог кэп-структуры с правильной ориентацией), модифицированный ARCA (например, фосфотиоатмодифицированный ARCA), инозин, NI-метилгуанозин, 2'-фторгуанозин, 7-дезазагуанозин, 8-оксогуанозин, 2-аминогуанозин, LNA-гуанозин и 2-азидогуанозин. Соответственно, РНК в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит 5'-кэп-структуру.

Поли(А)-последовательность/хвост.

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, может содержать на 3'-конце поли(А)-хвост длиной, как правило, приблизительно 10-200 аденозиновых нуклеотидов, предпочтитель-

но приблизительно 10-100 аденозиновых нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно 40-80 аденозиновых нуклеотидов или еще более предпочтительно приблизительно 50-70 аденозиновых нуклеотидов.

Поли(А)-последовательность в соединении мРНК, содержащем последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно получена из ДНК-матрицы путем транскрипции РНК *in vitro*. В качестве альтернативы, поли(А)-последовательность также может быть получена *in vitro* с помощью общепринятых способов химического синтеза без обязательной транскрипции из ДНК-предшественника. Кроме того, поли(А)-последовательности или поли(А)-хвосты могут быть образованы путем ферментативного полиаденилирования РНК в соответствии с настоящим изобретением с помощью коммерчески доступных наборов для полиаденилирования и соответствующих протоколов, известных из уровня техники.

В качестве альтернативы, мРНК, описанная в данном документе, необязательно содержит сигнал полиаденилирования, который определен в данном документе в качестве сигнала, придающего полиаденилирование (транскрибированной) РНК с помощью специфических белковых факторов (например, фактора специфичности расщепления и полиаденилирования (CPSF), фактора стимуляции расщепления (CstF), факторов расщепления I и II (CF I и CF II), поли(А)-полимеразы (PAP)). В данном контексте предпочтительным является консенсусный сигнал полиаденилирования, содержащий консенсусную последовательность NN(U/T)ANA. В особенно предпочтительном аспекте сигнал полиаденилирования содержит одну из следующих последовательностей: AA(U/T)AAA или A(U/T)(U/T)AAA (где уридин обычно присутствует в РНК, а тимидин обычно присутствует в ДНК).

Поли(С)-последовательность.

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, может содержать на 3'-конце поли(С)-хвост длиной, как правило, приблизительно 10-200 цитозиновых нуклеотидов, предпочтительно приблизительно 10-100 цитозиновых нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно 20-70 цитозиновых нуклеотидов, или еще более предпочтительно приблизительно 20-60, или даже 10-40 цитозиновых нуклеотидов.

В одном предпочтительном варианте осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN;
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,
- с) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых основания;
- д) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

В более предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN;
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант,
- с) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых основания;
- д) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

В особенно предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN;
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, предпочтительно содержащую любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоящую из них;
- с) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых основания;

d) необязательно поли(C)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

UTR.

В предпочтительном варианте осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит по меньшей мере один элемент 5'- или 3'-UTR. В данном контексте элемент UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'- или 3'-UTR любого встречающегося в природе гена или полученную из фрагмента, гомолога или варианта 5'- или 3'-UTR гена, или состоит из нее. Элемент 5'- или 3'-UTR, используемый в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одной кодирующей области последовательности мРНК согласно настоящему изобретению. Даже в том случае, если предпочтительными являются элементы 5'- или 3'-UTR, полученные из генов, встречающихся в природе, в контексте настоящего изобретения также можно использовать элементы UTR, сконструированные синтетическим путем.

Элементы 3'-UTR.

Термин "элемент 3'-UTR", как правило, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR или из варианта 3'-UTR, или состоит из нее. Элемент 3'-UTR в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, может представлять собой 3'-UTR РНК, предпочтительно мРНК. Таким образом, в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, элемент 3'-UTR предпочтительно может представлять собой 3'-UTR РНК, предпочтительно мРНК, или может представлять собой матрицу для транскрипции для образования 3'-UTR РНК. Таким образом, элемент 3'-UTR предпочтительно представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая соответствует 3'-UTR РНК, предпочтительно 3'-UTR мРНК, такой как мРНК, полученная путем транскрипции векторной конструкции, созданной способами генетической инженерии. Элемент 3'-UTR предпочтительно выполняет функцию 3'-UTR или кодирует последовательность, которая выполняет функцию 3'-UTR.

Предпочтительно по меньшей мере один элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена хордового, предпочтительно гена позвоночного, более предпочтительно гена млекопитающего, наиболее предпочтительно гена человека, или из варианта 3'-UTR гена хордового, предпочтительно гена позвоночного, более предпочтительно гена млекопитающего, наиболее предпочтительно гена человека, или состоит из нее.

Соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно содержит элемент 3'-UTR, который может быть получен из гена, соответствующего мРНК с увеличенным временем полужизни (при экспрессии которого образуется стабильная мРНК), например, элемент 3'-UTR, определенный и описанный ниже. Элемент 3'-UTR предпочтительно представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена, который предпочтительно кодирует стабильную мРНК, или из гомолога, фрагмента или варианта указанного гена.

В особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена, выбранного из группы, состоящей из гена альбумина, гена α -глобина, гена β -глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы и гена альфа-цепи коллагена, такого как ген альфа-1-цепи коллагена (I типа), или из варианта 3'-UTR гена, выбранного из группы, состоящей из гена альбумина, гена α -глобина, гена β -глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы и гена альфа-цепи коллагена, такого как ген альфа-1-цепи коллагена (I типа), в соответствии с SEQ ID NO: 1369-1390 из заявки на патент WO 2013/143700, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки, или из его гомолога, фрагмента или варианта, или состоит из нее. В особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена альбумина, предпочтительно гена альбумина позвоночного, более предпочтительно гена альбумина млекопитающего, наиболее предпочтительно гена альбумина человека, в соответствии с SEQ ID NO: 224301 или SEQ ID NO: 224303 или соответствующие последовательности РНК под SEQ ID NO: 224300 или SEQ ID NO: 224304 или состоит из них.

3'-UTR гена альбумина человека, SEQ ID NO: 224301

CATCACAATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAATGAAGATCAAAGCTTATTCATCTGTTTTCTTTT
CGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTCTGTGCTTCAATTAATAAAA
AATGGAAGAATCT

(соответствует SEQ ID NO: 1369 из заявки на патент WO 2013/143700).

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержало элемент 3'-UTR, содержащий соответствующую последовательность РНК, полученную из нуклеиновых кислот в соответствии с SEQ ID NO: 1369-1390 из заявки на патент WO 2013/143700, или ее фрагмент, гомолог или вариант.

Наиболее предпочтительно, чтобы элемент 3'-UTR содержал последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из фрагмента гена альбумина человека, в соответствии с SEQ ID NO: 224303.

3'-UTR гена альбумина 7

CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTT
CGTTGGTGTAAGCCAAACACCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTCTCTGTGCTCAATTAATAAAA
AATGGAAAGAACCT

(SEQ ID NO: 224303, соответствует SEQ ID NO: 1376 из заявки на патент WO 2013/143700).

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы элемент 3'-UTR последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержал последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224301 или SEQ ID NO: 224303, показанную под SEQ ID NO: 224302 или SEQ ID NO: 224304, или состоял из нее.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена α - или β -глобина, предпочтительно гена α - или β -глобина позвоночного, более предпочтительно гена α - или β -глобина млекопитающего, наиболее предпочтительно гена α - или β -глобина человека, в соответствии с SEQ ID NO: 224291, 224293, 224295, 224297 или соответствующие последовательности РНК под SEQ ID NO: 224292, 224294, 224296, 224298 или состоит из них.

3'-UTR гена альфа-1-цепи гемоглобина Homo sapiens (HBA1)

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCTCCCTTCTGCACCCGTACCCCGTGGT
CTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC

(SEQ ID NO: 224291, соответствует SEQ ID NO: 1370 из заявки на патент WO 2013/143700).

3'-UTR гена альфа-2-цепи гемоглобина Homo sapiens (HBA2)

GCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCTGCCGCTGGGCCTCCCAACGGGCCCTCTCCCTCTTGCACCGGCCCTCTCTGGTC
TTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCAG

(SEQ ID NO: 224293, соответствует SEQ ID NO: 1371 из заявки на патент WO 2013/143700).

3'-UTR гена бета-цепи гемоглобина Homo sapiens (HBB)

GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCTAAGTCCAACCTAACTGGGGGATATTATGAAGGGC
CTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC

(SEQ ID NO: 224295, соответствует SEQ ID NO: 1372 из заявки на патент WO 2013/143700).

Например, элемент 3'-UTR может содержать центральную часть, связывающую α -комплекс, 3'-UTR гена α -глобина, такого как ген α -глобина человека, или гомолога, фрагмента или варианта гена α -глобина, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 224297, или состоять из нее.

Центральная часть, связывающая α -комплекс, 3'-UTR гена α -глобина (также называемая в данном документе "muag")

GGCCGATGGGCCTCCCAACGGGCCCTCTCCCTCTTGCACCG

(SEQ ID NO: 224297, соответствует SEQ ID NO: 1393 из заявки на патент WO 2013/143700).

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы элемент 3'-UTR последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержал последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, показанную под SEQ ID NO: 224298, или ее гомолог, фрагмент или вариант или состоял из них.

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты, полученная из 3'-UTR гена [...]" предпочтительно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, в основе которой лежит последовательность 3'-UTR гена [...] или ее часть, как, например, 3'-UTR гена альбумина, гена α -глобина, гена β -глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы или гена альфа-цепи коллагена, такого как ген альфа-1-цепи коллагена (I типа), предпочтительно гена альбумина, или ее часть. Данный термин включает последовательности, соответствующие целой последовательности 3'-UTR, т.е. полноразмерной последовательности 3'-UTR гена, а также последовательности, соответствующие фрагменту последовательности 3'-UTR гена, такого как ген альбумина, ген α -глобина, ген β -глобина, ген тирозингидроксилазы, ген липоксигеназы или ген альфа-цепи коллагена, такой как ген альфа-1-цепи коллагена (I типа), предпочтительно гена альбумина.

Термин "последовательность нуклеиновой кислоты, полученная из варианта 3'-UTR гена [...]" предпочтительно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, в основе которой лежит вариант последовательности 3'-UTR гена, как, например, вариант 3'-UTR гена альбумина, гена α -глобина, гена β -глобина, гена тирозингидроксилазы, гена липоксигеназы или гена альфа-цепи коллагена, такого как ген альфа-1-цепи коллагена (I типа), или его часть, как описано выше. Данный термин включает последовательности, соответствующие целой последовательности варианта 3'-UTR гена, т.е. полноразмерной последовательности варианта 3'-UTR гена, и последовательности, соответствующие фрагменту последовательности варианта 3'-UTR гена. Фрагмент в данном контексте предпочтительно состоит из непрерывного отрезка из нуклеотидов, соответствующего непрерывному отрезку из нуклеотидов в полноразмерном варианте 3'-UTR, который представляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, более предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, еще более

предпочтительно по меньшей мере 80% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% полноразмерного варианта 3'-UTR. Такой фрагмент варианта в смысле, предполагаемом в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент варианта, описанного в данном документе.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит 5'-кэп-структуру и/или по меньшей мере один элемент 3'-нетранслируемой области (элемент 3'-UTR), предпочтительно определенные в данном документе. Более предпочтительно, РНК дополнительно содержит элемент 5'-UTR, определенный в данном документе.

В одном предпочтительном варианте осуществления соединения мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,
- c) необязательно элемент 3'-UTR, предпочтительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альфа-глобина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, показанную под SEQ ID NO: 224298, ее гомолог, фрагмент или вариант;
- d) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований;
- e) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

В предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант,
- c) необязательно элемент 3'-UTR, предпочтительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альфа-глобина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, показанную под SEQ ID NO: 224298, ее гомолог, фрагмент или вариант;
- d) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований;
- e) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

В особенно предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, предпочтительно содержащую любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в PCT/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоящую из них,
- c) необязательно элемент 3'-UTR, предпочтительно содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альфа-глобина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, показанную под SEQ ID NO: 224298, ее гомолог, фрагмент или вариант;
- d) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований;
- e) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

Элементы 5'-UTR.

В особенно предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одно соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит по меньшей мере один элемент 5'-нетранслируемой области (элемент 5'-UTR). Предпочтительно по меньшей мере один элемент 5'-UTR содержит последова-

тельность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена или полученную из фрагмента, гомолога или варианта 5'-UTR TOP-содержащего гена, или состоит из нее.

Особенно предпочтительно, чтобы элемент 5'-UTR не содержал TOP-мотив или 5'-TOP, определенный выше.

В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты элемента 5'-UTR, полученного из 5'-UTR TOP-содержащего гена, заканчивается на своем 3'-конце нуклеотидом, расположенным в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 выше стартового кодона (например, A(U/T)G) гена или мРНК, из которых она получена. Таким образом, элемент 5'-UTR не содержит какой-либо части области, кодирующей белок. Таким образом, предпочтительно единственная часть, кодирующая белок, по меньшей мере одной последовательности мРНК представлена кодирующей областью.

Последовательность нуклеиновой кислоты, полученная из 5'-UTR TOP-содержащего гена, предпочтительно получена из TOP-содержащего гена эукариот, предпочтительно TOP-содержащего гена растения или животного, более предпочтительно TOP-содержащего гена хордового, еще более предпочтительно TOP-содержащего гена позвоночного, наиболее предпочтительно TOP-содержащего гена млекопитающего, такого как TOP-содержащий ген человека.

Например, элемент 5'-UTR предпочтительно выбран из элементов 5'-UTR, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки, из гомологов SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, из их варианта или предпочтительно из соответствующей последовательности РНК, или состоящих из нее. Термин "гомологи SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700" относится к последовательностям видов, отличных от *Homo sapiens*, которые являются гомологичными по отношению к последовательностям в соответствии с SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700.

В предпочтительном варианте осуществления элемент 5'-UTR соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из последовательности нуклеиновой кислоты, простирающейся от положения нуклеотида 5 (т.е. нуклеотида, расположенного в положении 5 в последовательности) до положения нуклеотида, расположенного непосредственно рядом со стартовым кодоном в 5'-направлении от него (расположенного на 3'-конце последовательностей), например, положения нуклеотида, расположенного непосредственно рядом с последовательностью ATG в 5'-направлении от нее, в последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, из гомологов SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, из их варианта или соответствующей последовательности РНК, или состоит из нее. Особенно предпочтительно, чтобы элемент 5'-UTR был получен из последовательности нуклеиновой кислоты, простирающейся от положения нуклеотида, расположенного непосредственно рядом с 5'-TOP в 3'-направлении от него, до положения нуклеотида, расположенного непосредственно рядом со стартовым кодоном в 5'-направлении от него (расположенного на 3'-конце последовательностей), например положения нуклеотида, расположенного непосредственно рядом с последовательностью ATG в 5'-направлении от нее, в последовательности нуклеиновой кислоты, выбранной из SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, из гомологов SEQ ID NO: 1-1363, SEQ ID NO: 1395, SEQ ID NO: 1421 и SEQ ID NO: 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, из их варианта или соответствующей последовательности РНК.

В особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего рибосомный белок, или из варианта 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего рибосомный белок, или состоит из нее. Например, элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из SEQ ID NO: 67, 170, 193, 244, 259, 554, 650, 675, 700, 721, 913, 1016, 1063, 1120, 1138 и 1284-1360 из заявки на патент WO 2013/143700, соответствующей последовательности РНК, ее гомолога или ее варианта, описанных в данном документе, предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее. Как описано выше, последовательность, простирающаяся от положения 5 до нуклеотида, расположенного непосредственно рядом с ATG в 5'-направлении от него (который расположен на 3'-конце последовательностей), соответствует 5'-UTR указанным последовательностям.

Элемент 5'-UTR предпочтительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего белок большой субъединицы рибосомы (RPL), или из гомолога или варианта 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего белок большой субъединицы рибосомы (RPL), или состоит из нее. Например, элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из

SEQ ID NO: 67, 259, 1284-1318, 1344, 1346, 1348-1354, 1357, 1358, 1421 и 1422 из заявки на патент WO 2013/143700, соответствующей последовательности РНК, ее гомолога или ее варианта, описанных в данном документе, предпочтительно не имеющую 5'-ТОР-мотива, или состоит из нее.

В особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR гена белка 32 большой субъединицы рибосомы, предпочтительно гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (L32) позвоночного, более предпочтительно гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (L32) млекопитающего, наиболее предпочтительно гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (L32) человека, или из варианта 5'-UTR гена белка 32 большой субъединицы рибосомы, предпочтительно гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (L32) позвоночного, более предпочтительно гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (L32) млекопитающего, наиболее предпочтительно гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (L32) человека, или состоит из нее, где элемент 5'-UTR предпочтительно не содержит 5'-ТОР указанного гена.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287 или SEQ ID NO: 224288 (5'-UTR гена белка 32 большой субъединицы рибосомы человека, не имеющая 5'-концевого олигопиримидинового тракта:

GGCGCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCTTCTCGGCATC;

соответствует SEQ ID NO: 1368 из заявки на патент WO 2013/143700) или предпочтительно с соответствующей последовательностью РНК, или состоит из нее, или при этом по меньшей мере один элемент 5'-UTR содержит фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287 или более предпочтительно с соответствующей последовательностью РНК (SEQ ID NO: 224288), или состоит из него, где фрагмент предпочтительно описан выше, т.е. представляет собой непрерывный отрезок из нуклеотидов, представляющий по меньшей мере 20% и т.д. полноразмерной 5'-UTR. Фрагмент предпочтительно характеризуется длиной, составляющей по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или больше, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или больше, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов или больше. Фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент, описанный в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит элемент 5'-UTR, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена позвоночного, такого как TOP-содержащий ген млекопитающего, например, человека, выбранный из

RPSA, RPS2, RPS3, RPS3A, RPS4, RPS5,

RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS10, RPS11, RPS12, RPS13, RPS14, RPS15, RPS15A, RPS16, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27, RPS27A, RPS28, RPS29, RPS30, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL8, RPL9, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL21, RPL22, RPL23, RPL23A, RPL24, RPL26, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL32, RPL34, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL38, RPL39, RPL40, RPL41, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPLP3, RPLP0, RPLP1, RPLP2, EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G, EEF2, EIF3E, EIF3F, EIF3H, EIF2S3, EIF3C, EIF3K, EIF3EIP, EIF4A2, PABPC1, HNRNPA1, TPT1, TUBB1, UBA52, NPM1, ATP5G2, GNB2L1, NME2, UQCRB,

или из ее гомолога или варианта, или состоит из нее, где элемент 5'-UTR предпочтительно не содержит TOP-мотив или 5'-ТОР указанных генов, и где элемент 5'-UTR необязательно начинается на своем 5'-конце с нуклеотида, расположенного в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ниже 5'-концевого олигопиримидинового тракта (TOP), и где элемент 5'-UTR, полученный из 5'-UTR TOP-содержащего гена, дополнительно необязательно заканчивается на своем 3'-конце нуклеотидом, расположенным в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 выше стартового кодона (A(U/T)G) гена, из которого он получен.

В дополнительных особенно предпочтительных вариантах осуществления элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (RPL32), гена белка 35 большой субъединицы рибосомы (RPL35), гена белка 21 большой субъединицы рибосомы (RPL21), гена альфа-субъединицы 1 комплекса F1 H⁺-транспортирующей АТФ-

синтазы митохондрий сердечной мышцы (ATP5A1), гена (17-бета) гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4), гена андроген-индуцируемого белка 1 (AIG1), гена субъединицы VIc цитохром-с-оксидазы (COX6C) или гена N-ацилсфингозинамидогидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) или из их варианта, предпочтительно из гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (RPL32) позвоночного, гена белка 35 большой субъединицы рибосомы (RPL35) позвоночного, гена белка 21 большой субъединицы рибосомы (RPL21) позвоночного, гена альфа-субъединицы 1 комплекса F1 H⁺-транспортирующей АТФ-синтазы митохондрий сердечной мышцы (ATP5A1) позвоночного, гена (17-бета) гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4) позвоночного, гена андроген-индуцируемого белка 1 (AIG1) позвоночного, гена субъединицы VIc цитохром-с-оксидазы (COX6C) позвоночного или гена N-ацилсфингозинамидогидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) позвоночного или из их варианта, более предпочтительно из гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (RPL32) млекопитающего, гена белка 35 большой субъединицы рибосомы (RPL35) млекопитающего, гена белка 21 большой субъединицы рибосомы (RPL21) млекопитающего, гена альфа-субъединицы 1 комплекса F1 H⁺-транспортирующей АТФ-синтазы митохондрий сердечной мышцы (ATP5A1) млекопитающего, гена (17-бета) гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4) млекопитающего, гена андроген-индуцируемого белка 1 (AIG1) млекопитающего, гена субъединицы VIc цитохром-с-оксидазы (COX6C) млекопитающего или гена N-ацилсфингозинамидогидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) млекопитающего или из их варианта, наиболее предпочтительно из гена белка 32 большой субъединицы рибосомы (RPL32) человека, гена белка 35 большой субъединицы рибосомы (RPL35) человека, гена белка 21 большой субъединицы рибосомы (RPL21) человека, гена альфа-субъединицы 1 комплекса F1 H⁺-транспортирующей АТФ-синтазы митохондрий сердечной мышцы (ATP5A1) человека, гена (17-бета) гидроксистероиддегидрогеназы 4 (HSD17B4) человека, гена андроген-индуцируемого белка 1 (AIG1) человека, гена субъединицы VIc цитохром-с-оксидазы (COX6C) человека или гена N-ацилсфингозинамидогидролазы (кислой церамидазы) 1 (ASAH1) человека или из их варианта, или состоит из нее, где элемент 5'-UTR предпочтительно не содержит 5'-TOP указанного гена.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1368 или SEQ ID NO: 1412-1420 из заявки на патент WO 2013/143700 или с соответствующей последовательностью РНК, или состоит из нее, или при этом по меньшей мере один элемент 5'-UTR содержит фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 1368 или SEQ ID NO: 1412-1420 из заявки на патент WO 2013/143700, или состоит из него, где фрагмент предпочтительно описан выше, т.е. представляет собой непрерывный отрезок из нуклеотидов, представляющий по меньшей мере 20% и т.д. полноразмерной 5'-UTR. Фрагмент предпочтительно характеризуется длиной, составляющей по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или больше, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или больше, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов или больше. Фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент, описанный в данном документе.

Соответственно, в особенно предпочтительном варианте осуществления элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224289 (5'-UTR ATP5A1, не имеющая 5'-концевого олигопиримидинового тракта:

GCGGCTCGGCCATTTTGTCCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCGGAGTAACTGCAAAG;

соответствует SEQ ID NO: 224289 из заявки на патент WO 2013/143700) или предпочтительно с соответствующей последовательностью РНК (SEQ ID NO: 224290), или состоит из нее, или где по меньшей мере один элемент 5'-UTR содержит фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 40%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60%, предпочтительно по меньшей мере при-

близительно 70%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224289 или более предпочтительно с соответствующей последовательностью РНК (SEQ ID NO: 224290), или состоит из него, где фрагмент предпочтительно описан выше, т.е. представляет собой непрерывный отрезок из нуклеотидов, представляющий по меньшей мере 20% и т.д. полноразмерной 5'-UTR. Фрагмент предпочтительно характеризуется длиной, составляющей по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или больше, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов или больше, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов или больше. Фрагмент предпочтительно представляет собой функциональный фрагмент, описанный в данном документе.

Предпочтительно по меньшей мере один элемент 5'-UTR и по меньшей мере один элемент 3'-UTR действуют синергично, что увеличивает образование белка на по меньшей мере одной последовательности мРНК, описанной выше.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

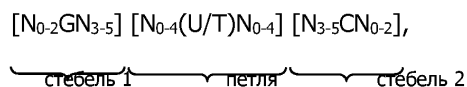
- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN;
- б) необязательно элемент 5'-UTR, который предпочтительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, или состоит из нее, более предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287, показанную под SEQ ID NO: 224288, ее гомолог, фрагмент или вариант, или состоящий из нее;
- с) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, предпочтительно содержащую любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоящую из них,
- д) необязательно элемент 3'-UTR, который предпочтительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена, при экспрессии которого образуется стабильная мРНК, или состоит из нее, более предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224291, 224293, 224295, 224297, 224299, 224301 или 224303, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 224297 или SEQ ID NO: 224303, или ее гомолог, фрагмент или вариант, или состоящий из нее;
- е) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований; и
- ф) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований.

Структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК.

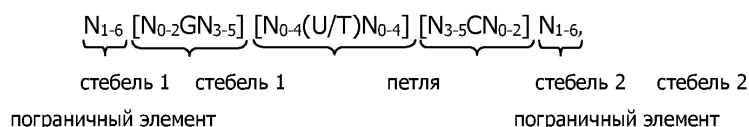
В особенно предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК соединения мРНК в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность/структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК. Такие последовательности структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК предпочтительно выбраны из последовательностей структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, раскрытых в WO 2012/019780, раскрытие которой настоящим включено посредством ссылки.

Последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, подходящая для применения в настоящем изобретении, предпочтительно выбрана по меньшей мере из одной из следующих формул (V) или (VI):

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



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



где пограничные элементы N₁₋₆ стебля 1 или стебля 2 представляют собой непрерывную последовательность из 1-6, предпочтительно 2-6, более предпочтительно 2-5, еще более предпочтительно 3-5, наиболее предпочтительно 4-5 или 5 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида;

стебель 1 [N₀₋₂GN₃₋₅] является обратно-комплементарным или частично обратно-комплементарным элементу, представляющему собой стебель 2, и представляет собой непрерывную последовательность из 5-7 нуклеотидов;

где N_{0-2} представляет собой непрерывную последовательность из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида;

где N₃₋₅ представляет собой непрерывную последовательность из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида, и

где G представляет собой гуанозин или его аналог и может быть необязательно заменен цитидином или его аналогом, при условии, что комплементарный ему нуклеотид цитидин в стебле 2 заменен гуано-зином;

последовательность петли $[N_{0.4}(U/T)N_{0.4}]$ расположена между элементами, представляющими собой стебель 1 и стебель 2, и представляет собой непрерывную последовательность из 3-5 нуклеотидов, более предпочтительно из 4 нуклеотидов;

где каждый N₀₋₄ независимо от других представляет собой непрерывную последовательность из 0-4, предпочтительно 1-3, более предпочтительно 1-2 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида; и

где U/T представляет собой уридин или необязательно тимидин;

стебель 2 [N₃₋₅GN₀₋₂] является обратно-комплементарным или частично обратно-комплементарным элементу, представляющему собой стебель 1, и представляет собой непрерывную последовательность из 5-7 нуклеотидов;

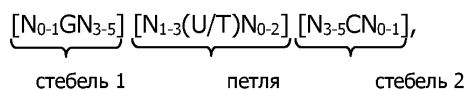
где N₃₋₅ представляет собой непрерывную последовательность из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида;

где N_{0-2} представляет собой непрерывную последовательность из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G или C, или аналога этого нуклеотида; и

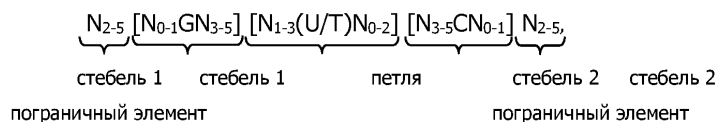
где С представляет собой цитидин или его аналог и может быть необязательно заменен гуанозином или его аналогом, при условии, что комплементарный ему нуклеозид гуанозин в стебле 1 заменен цитидином; где стебель 1 и стебель 2 способны образовывать друг с другом пары оснований с образованием обратно-комплементарной последовательности, где образование пар оснований может происходить между стеблем 1 и стеблем 2, например, путем образования уотсон-криковских пар оснований между нуклеотидами А и U/Т или G и С или путем образования неуотсон-криковских пар оснований, например, образования неоднозначных пар оснований, образования обратных уотсон-криковских пар оснований, образования хугстиновских пар оснований, образования обратных хугстиновских пар оснований, или способны образовывать друг с другом пары оснований с образованием частично обратно-комплементарной последовательности, где между стеблем 1 и стеблем 2 может происходить неполное образование пар оснований, исходя из того, что одно или несколько оснований в одном стебле не имеют комплементарного основания в обратно-комплементарной последовательности другого стебля.

В соответствии с дополнительным предпочтительным вариантом осуществления последовательность мРНК соединения мРНК в соответствии с настоящим изобретением может содержать по меньшей мере одну последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК в соответствии с по меньшей мере одной из следующих конкретных формул (Va) или (VIa):

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



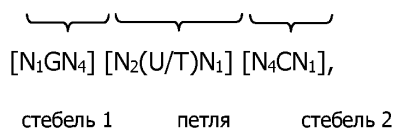
формула (Via) (последовательность структуры типа "стебель-петля" с пограничными элементами стебля):



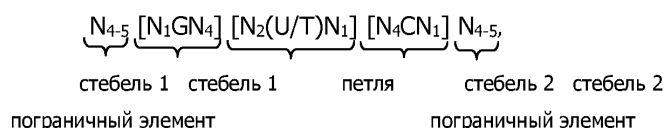
где N, C, G, T и U определены выше.

В соответствии с дополнительным более особенно предпочтительным вариантом осуществления по меньшей мере одна мРНК в композиции в соответствии с настоящим изобретением может содержать по меньшей мере одну последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК в соответствии с по меньшей мере одной из следующих конкретных формул (Vb) или (VIb):

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



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



где N, C, G, T и U определены выше.

Особенно предпочтительной последовательностью структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК является последовательность

CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA

(в соответствии с SEQ ID NO: 224305) или более предпочтительно соответствующая последовательность РНК

CAAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCA

(в соответствии с SEQ ID NO: 224306).

Любые вышеупомянутые модификации можно применять в отношении соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, и дополнительно в отношении любой мРНК, применяемой в контексте настоящего изобретения, и можно в случае целесообразности или необходимости проводить совместно друг с другом в любой комбинации, при условии, что в этих комбинациях модификации не препятствуют друг другу в соответствующей последовательности мРНК. Специалист в данной области сможет в соответствии с этим сделать свой выбор.

Соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, которая содержит по меньшей мере одну кодирующую область, определенную в данном документе, может предпочтительно содержать 5'-UTR и/или 3'-UTR, предпочтительно содержащую по меньшей мере одну структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК. 3'-UTR последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно также содержит поли(А)- и/или поли(С)-последовательности, определенные в данном документе. Отдельные элементы 3'-UTR могут встречаться в ней в любом порядке в направлении 5'-3' вдоль последовательности мРНК согласно настоящему изобретению. Кроме того, также могут содержаться дополнительные элементы, описанные в данном документе, такие как стабилизирующая последовательность, определенная в данном документе (например, полученная из UTR гена глобина), последовательности IRES и т.д. Каждый из элементов также может повторяться в последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере один раз (в частности, в би- или полицистронных конструкциях), предпочтительно два раза или больше. В качестве примера, отдельные элементы могут присутствовать в последовательности мРНК в соответствии с настоящим изобретением в следующем порядке:

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

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

5'-кодирующая область - структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК - сигнал полиаденилирования - 3'; или

5'-кодирующая область - сигнал полиаденилирования - структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК - 3'; или

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

5'-кодирующая область - структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК - структура типа "сте-

бель-петля" гистоновых мРНК - сигнал полиаденилирования - 3'; или

5'-кодирующая область - стабилизирующая последовательность - поли(А)/(С)-последовательность - структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК - 3'; или

5'-кодирующая область - стабилизирующая последовательность - поли(А)/(С)-последовательность - поли(А)/(С)-последовательность - структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК - 3' и т.д.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК согласно настоящему изобретению, предпочтительно содержит по меньшей мере один из следующих структурных элементов: элемент 5'- и/или 3'-нетранслируемой области (элемент UTR), в частности элемент 5'-UTR, который предпочтительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена или из ее фрагмента, гомолога или варианта, или состоит из нее, или элемент 5'- и/или 3'-UTR, который предпочтительно может быть получен из гена, при экспрессии которого образуется стабильная мРНК, или из его гомолога, фрагмента или варианта; структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК в его 3'-нетранслируемой области; 5'-кэп-структуру; поли(А)-хвост или поли(С)-последовательность.

В одном варианте осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,
- c) необязательно элемент 3'-UTR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альфа-глобина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224291, 224293 или 224297, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 224297, или ее гомолог, фрагмент или вариант;
- d) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований;
- e) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований; и
- f) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

В особенно предпочтительном варианте осуществления соединения мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, предпочтительно содержащую любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/ЕР2016/075843, под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоящую из них;
- c) необязательно элемент 3'-UTR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альфа-глобина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224291, 224293 или 224297, предпочтительно в соответствии с SEQ ID NO: 224297, или ее гомолог, фрагмент или вариант;
- d) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований;
- e) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований; и
- f) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

В соответствии с другим особенно предпочтительным вариантом осуществления соединения мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит, предпочтительно в направлении 5'-3':

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN;
- b) элемент 5'-UTR, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, или состоит из нее, предпочтительно содержащий последовательность

РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287 или SEQ ID NO: 224289, показанную под SEQ ID NO: 224288 или SEQ ID NO: 224290, ее гомолог, фрагмент или вариант, или состоящий из нее;

с) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, предпочтительно содержащую любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, имеющих числовой идентификатор <223>, который начинается с "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (wt)", или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt1)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt2)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt3)", "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt4)" или "производной и/или модифицированной CDS-последовательности (opt5)", или соответственно "столбца В" или "столбца С" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/ЕР2016/075843, под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоящую из них, d) необязательно элемент 3'-UTR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена, при экспрессии которого образуется стабильная мРНК, или состоящий из нее, более предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224301 или SEQ ID NO: 224303, показанную под SEQ ID NO: 224302 или SEQ ID NO: 224304, ее гомолог, фрагмент или вариант, или состоящий из нее;

е) необязательно поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 64 аденозиновых оснований;

f) необязательно поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 30 цитозиновых оснований; и g) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержит следующие последовательности мРНК (или последовательности РНК, идентичные или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичные следующим последовательностям РНК).

НА вируса гриппа А:

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224198-224201, 224203-224210;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), в соответствии с SEQ ID NO: SEQ ID NO: 224181-224194;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224163-224175;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224117-224126, 224130, 224131, 224132;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа, подобного А/Мичиган/45/2015 (H1N1)pdm09, в соответствии с SEQ ID NO: 224133-224142-224162.

НА вируса гриппа В:

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа В/Пхукет/3037/2013, в соответствии с SEQ ID NO: 224246-224255, 224256, 224257;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (GI: 223950973; FJ766840.1), в соответствии с SEQ ID NO: 224236-224245.

НА вируса гриппа А:

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224319-224323;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа, подобного А/Мичиган/45/2015 (H1N1)pdm09, в соответствии с SEQ ID NO: 224324-224325;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224326-224335;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), в соответствии с SEQ ID NO: 224336-224339;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1194/2004 (H5N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224342-224343;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1), в соответствии с SEQ ID NO: 224344-224345.

НА вируса гриппа В:

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (GI: 223950973; FJ766840.1), в соответствии с SEQ ID NO: 224348-224349;

мРНК, кодирующая белок НА вируса гриппа В/Пхукет/3037/2013, в соответствии с SEQ ID NO: 224350-224351.

Наиболее предпочтительные последовательности мРНК включают в себя следующие.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютиниона (НА) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 1-14031, или его фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, идентичная или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная последовательности РНК в соответствии с SEQ ID NO: 32013-46043, 64025-78055, 224085-224106, 96037-110067, 128049-142079, 160061-174091, 192073-206103, или ее фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютиниона (НА) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 26398-28576, или его фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, идентичная или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная последовательности РНК в соответствии с SEQ ID NO: 58410-60588, 90422-92600, 224107-224112, 122434-124612, 154446-156624, 186458-188636, 218470-220648, или ее фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 14032-26397, 224309 или 224310, или его фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, идентичная или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная последовательности РНК в соответствии с SEQ ID NO: 110068-122433, 78056-90421, 224113, 224313-224317, 110068-122433, 142080-154445, 174092-186457, 206104-218469, или ее фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 28577-30504, или его фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, идентичная или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 60589-62516, 92601-94528, 124613-126540, 156625-158552, 188637-190564, 220649-222576, или ее фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G (RAV-G, RAVBV-G или RABV-G), нуклеопротеина N (RAV-N), фосфопротеина Р (RAV-P), белка матрикса М (RAV-M) или РНК-полимеразы L (RAV-L) вируса бешенства, или его фрагмент, вариант.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G (RAV-G, RAVBV-G или RABV-G) вируса бешенства в соответствии с SEQ ID NO: 30505-32012, или его фрагмент или вариант.

Последовательность мРНК, содержащая по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 62517-64024, 224270, 224274, 94529-96036, 224271-224273, 126541-128048, 158553-160060, 190565-192072, 222577-224084, или ее фрагмент или вариант.

Сигнальные пептиды.

В соответствии с другим особенно предпочтительным вариантом осуществления последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно или в качестве альтернативы кодировать секреторный сигнальный пептид. Такие сигнальные пептиды представляют собой, без ограничения, последовательности, которые, как правило, характеризуются длиной, составляющей приблизительно 15-30 аминокислот, и предпочтительно расположены на N-конце кодируемого пептида. Сигнальные пептиды, определенные в данном документе, предпочтительно обеспечивают возможность транспорта антигена, антигенного белка или антигенного пептида, кодируемого по меньшей мере одной последовательностью мРНК, в определенный клеточный компартмент, предпочтительно на клеточную поверхность, в эндоплазматический ретикулум (ER) или эндосомно-лизосомный компартмент. Примеры последовательностей секреторных сигнальных пептидов, определенных в данном документе, включают без ограничения сигнальные последовательности классических или неклассических молекул МНС (например, сигнальные последовательности молекул МНС I и II класса, например молекулы МНС I класса HLA-A*0201), сигнальные последовательности цитокинов или иммуноглобулинов, определенных в данном документе, сигнальные последовательности инвариантной цепи иммуноглобулинов или антител, определенных в данном документе, сигнальные последовательности Lamp1, тапазина, Erp57, кальретикулина, кальнексина и дополнительных мембраноассоциированных белков или белков, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулумом (ER) или эндосомно-лизосомным компартментом. В соответствии с настоящим изобретением наиболее предпочтительно могут применяться сигнальные последовательности молекулы МНС I класса HLA-A*0201. Например, сигнальный пептид, полученный из HLA-A, предпоч-

тительно применяют с целью способствования секреции кодируемого антигена, определенного в данном документе, или его фрагмента или варианта. Сигнальный пептид HLA-A более предпочтительно слит с кодируемым антигеном, определенным в данном документе, или с его фрагментом или вариантом.

Получение мРНК.

мРНК в соответствии с настоящим изобретением можно получать с помощью любого способа, известного из уровня техники, в том числе способов синтеза, таких как, например, твердофазный синтез РНК, а также способов *in vitro*, таких как реакции транскрипции РНК *in vitro*, в частности, согласно описанному в примерах.

Как отмечается, соединение мРНК в соответствии с настоящим изобретением инкапсулировано в липидную наночастицу или связано с ней.

Термин "липидная наночастица", также упоминаемый как LNP, относится к частице, имеющей по меньшей мере один размер нанометрового порядка (например, 1-1000 нм), которая содержит один или несколько липидов, например, липид формулы (I), (II) или (III). В некоторых вариантах осуществления такие липидные наночастицы содержат катионный липид (например, липид формулы (I), (II) или (III)) и один или несколько наполнителей, выбранных из нейтральных липидов, заряженных липидов, стероидов и липидов, конъюгированных с полимерами (например, пегилированный липид, такой как пегилированный липид формулы (IV)). В некоторых вариантах осуществления мРНК или ее часть инкапсулирована в липидную часть липидной наночастицы или находится в водном пространстве, окруженном некоторой или всей липидной частью липидной наночастицы, что тем самым защищает ее от ферментативного разрушения или других нежелательных эффектов, индуцируемых механизмами организма-хозяина или клетки-хозяина, например, неблагоприятного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления мРНК или ее часть связаны с липидными наночастицами.

В контексте настоящего изобретения липидные наночастицы не ограничены какими-либо конкретными морфологическими характеристиками, и их следует интерпретировать как предусматривающие любые морфологические характеристики, образующиеся при объединении катионного липида и необязательно одного или нескольких дополнительных липидов, например, в водной среде и/или в присутствии соединения нуклеиновой кислоты. Например, липосома, липидный комплекс, липоплекс и т.п. находятся в пределах объема липидной наночастицы.

В различных вариантах осуществления липидные наночастицы имеют средний диаметр, составляющий от приблизительно 30 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 90 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 до приблизительно 90 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм или приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 нм, и являются фактически нетоксичными. В определенных вариантах осуществления мРНК в случае присутствия в липидных наночастицах является устойчивой к разрушению под действием нуклеазы в водном растворе. Как используется в данном документе, средний диаметр может быть представлен в виде z-среднего размера, определяемого с помощью динамического рассеяния света.

LNP может содержать любой липид, способный образовывать частицу, к которой присоединяются одна или несколько молекул нуклеиновых кислот или в которую инкапсулируются одна или несколько молекул нуклеиновых кислот. Термин "липид" относится к группе органических соединений, являющихся производными жирных кислот (например, к сложным эфирам) и обычно характеризующихся как нерастворимые в воде, но растворимые во многих органических растворителях. Липиды обычно подразделяются по меньшей мере на три класса: (1) "простые липиды", которые включают жиры и масла, а также воски; (2) "сложные липиды", которые включают фосфолипиды и гликолипиды; и (3) "производные липидов", такие как стероиды.

В одном варианте осуществления мРНК-содержащая LNP содержит один или несколько катионных липидов, определенных в данном документе, и один или несколько стабилизирующих липидов. Стабилизирующие липиды включают нейтральные липиды и пегилированные липиды.

Как указано, LNP содержит катионный липид. Катионный липид предпочтительно является катионизируемым, т.е. он становится протонированным по мере снижения pH ниже pKa ионизируемой группы липида, но все более нейтральным при более высоких значениях pH. Будучи положительно заряженным, липид, таким образом, может связываться с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. В определенных вариантах осуществления катионный липид включает цвиттер-ионный липид, который приобретает положительный заряд с уменьшением pH. LNP может содержать любой липид, способный образовывать частицу, к которой присоединяются одна или несколько молекул нуклеиновых кислот или в которую инкапсулируются одна или несколько молекул нуклеиновых кислот.

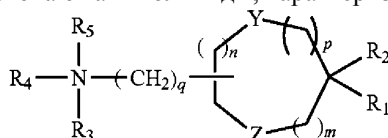
В определенных вариантах осуществления LNP может содержать любой дополнительный катионный или катионизируемый липид, т.е. любую из ряда молекул липидов, которые несут суммарный положительный заряд при выбранном значении pH, таком как физиологическое значение pH. Такие липиды

включают без ограничения хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC); хлорид N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмония (DOTMA); бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB); хлорид N-(2,3-диолеилокси)пропил-N,N,N-триметиламмония (DOTAP); 3-(N,N-диметиламиноэтан)карбамоил)холестерин (DC-Choi), трифторацетат N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)N-2-(сперминкарбоксамидо)этил-N,N-диметиламмония (DOSPA), диоктадециламидоглицилкарбоксиспермин (DOGS), 1,2-диолеил-3-диметиламинпропан (DODAP), N,N-диметил-2,3-диолеилоксипропиламин (DODMA) и бромид N-(1,2-димиристилоксипроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония (DMRIE).

Дополнительно, доступен ряд коммерческих препаратов катионных липидов, которые можно применять в настоящем изобретении. Они включают, например, LIPOFECTIN® (коммерчески доступные катионные липосомы, содержащие DOTMA и 1,2-диолеил-sn-3-фосфоэтанолламин (DOPE), от GIBCO/BRL, Гранд-Айленд, Нью-Йорк); LIPOFECTAMINE® (коммерчески доступные катионные липосомы, содержащие трифторацетат N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N-(2-(сперминкарбоксамидо)этил)-N,N-диметиламмония (DOSPA) и (DOPE), от GIBCO/BRL) и TRANSFECTAM® (коммерчески доступные катионные липиды, содержащие диоктадециламидоглицилкарбоксиспермин (DOGS) в этаноле, от Promega Corp., Мэдисон, Висконсин). Следующие липиды являются катионными и имеют положительный заряд при значениях pH ниже физиологических: DODAP, DODMA, DMDMA, 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA).

В одном варианте осуществления дополнительный катионный липид представляет собой аминоллипид. Подходящие аминоллипиды, применимые в настоящем изобретении, включают аминоллипиды, описанные в WO 2012/016184, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные аминоллипиды включают без ограничения 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), хлоридную соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA-Cl), хлоридную соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP-Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ), 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA) и 2,2-дилинолеил-4-диметиламинметил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA).

Подходящие аминоллипиды включают аминоллипиды, характеризующиеся следующей формулой:



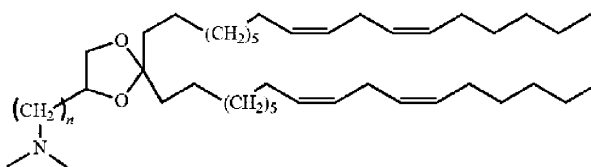
где R₁ и R₂ являются одинаковыми либо разными и независимо представляют собой необязательно замещенный C₁₀-C₂₄алкил, необязательно замещенный C₁₀-C₂₄алкенил, необязательно замещенный C₁₀-C₂₄алкинил или необязательно замещенный C₁₀-C₂₄ацил;

R₃ и R₄ являются одинаковыми либо разными и независимо представляют собой необязательно замещенный C₁-C₆алкил, необязательно замещенный C₂-C₆алкенил или необязательно замещенный C₂-C₆алкинил, или R₃ и R₄ могут быть соединены с образованием необязательно замещенного гетероциклического кольца из 4-6 атомов углерода и 1-2 гетероатомов, выбранных из атомов азота и кислорода;

R₅ отсутствует либо присутствует и в случае присутствия представляет собой водород или C₁-C₆алкил; m, n и p являются одинаковыми либо разными и независимо равняются 0 либо 1 при условии, что m, n и p одновременно не равняются 0; q равняется 0, 1, 2, 3 или 4; и

Y и Z являются одинаковыми либо разными и независимо представляют собой O, S или NH. В одном варианте осуществления каждый из R₁ и R₂ представляет собой линолеил, и аминоллипид представляет собой дилинолеилсодержащий аминоллипид. В одном варианте осуществления аминоллипид представляет собой дилинолеилсодержащий аминоллипид.

Иллюстративный применимый дилинолеилсодержащий аминоллипид характеризуется следующей формулой:

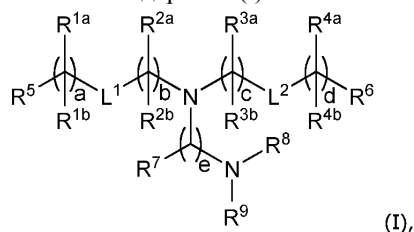


DLin-K-DMA

где n равняется 0, 1, 2, 3 или 4.

В одном варианте осуществления катионный липид представляет собой DLin-K-DMA. В одном варианте осуществления катионный липид представляет собой DLin-KC2-DMA (вышеупомянутый DLin-K-DMA, где n равняется 2).

В одном варианте осуществления LNP содержит: (i) катионный липидный компонент формулы (I)



определенной ниже, или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, и

(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней. В отношении соединения мРНК, последовательности мРНК и антигенного пептида или белка делается ссылка на описание этих признаков, включая соответствующие вышеупомянутые возможные варианты и предпочтения. В одном из предпочтительных вариантов осуществления соединение мРНК не содержит модификации нуклеозида. В другом варианте осуществления оно не содержит модификации азотистого основания. В дополнительном варианте осуществления оно не содержит 1-метилпсевдоуридиновой модификации. В дополнительном варианте осуществления соединение мРНК содержит только природные нуклеозиды аденин, гуанин, цитозин и урацил. Более того, если катионный липид представляет собой соединение 1-6, определенное ниже, то липидная наночастица не является липидной наночастицей, содержащей соединение 1-6, DSPC, холестерин и конъюгат PEG-липид формулы (IVa) в соотношении приблизительно 50:10:38,5:1,5, которая инкапсулирует немодифицированную, 1-метилпсевдоуридинмодифицированную или кодон-оптимизированную мРНК, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа PR8 или Cal/7/2009 или белок оболочки CD4-независимого HIV-1 R3A.

Что касается формулы (I):

каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ или углерод-углеродную двойную связь;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{1a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{2a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{3a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} алкил, либо (b) R^{4a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

каждый из R^5 и R^6 независимо представляет собой метил или циклоалкил; R^7 в каждом случае независимо представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил;

каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой C_1 - C_{12} алкил; или

R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее один атом азота;

каждое из a и d независимо представляет собой целое число от 0 до 24; каждое из b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 24; и e равняется 1 или 2.

В определенных вариантах осуществления формулы (I) по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} или R^{4a} представляет собой C_1 - C_{12} алкил, или по меньшей мере один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$. В других вариантах осуществления R^{1a} и R^{1b} не представляют собой изопропил, если a равняется 6, или н-бутил, если a равняется 8.

В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления формулы (I) по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} или R^{4a} представляет собой C_1 - C_{12} алкил, или по меньшей мере один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$; и

R^{1a} и R^{1b} не представляют собой изопропил, если a равняется 6, или н-бутил, если a равняется 8.

В других вариантах осуществления формулы (I) каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой незамещенный C_1 - C_{12} алкил; или R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо, содержащее один атом азота.

В определенных вариантах осуществления формулы (I) любой из L^1 или L^2 может представлять собой $-O(C=O)-$ или углерод-углеродную двойную связь. Каждый из L^1 и L^2 может представлять собой $-O(C=O)-$, или каждый из них может представлять собой углерод-углеродную двойную связь.

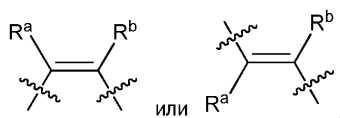
В некоторых вариантах осуществления формулы (I) один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$. В других вариантах осуществления как L^1 , так и L^2 представляют собой $-O(C=O)-$.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) один из L^1 или L^2 представляет собой $-(C=O)O-$. В других вариантах осуществления как L^1 , так и L^2 представляют собой $-(C=O)O-$.

В некоторых других вариантах осуществления формулы (I) один из L^1 или L^2 представляет собой углерод-углеродную двойную связь. В других вариантах осуществления как L^1 , так и L^2 представляют собой углерод-углеродную двойную связь.

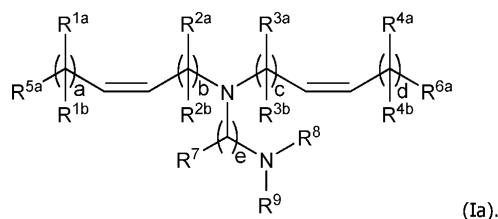
В еще нескольких других вариантах осуществления формулы (I) один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$, а другой из L^1 или L^2 представляет собой $-(C=O)O-$. В дополнительных вариантах осуществления один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$, а другой из L^1 или L^2 представляет собой углерод-углеродную двойную связь. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления один из L^1 или L^2 представляет собой $-(C=O)O-$, а другой из L^1 или L^2 представляет собой углерод-углеродную двойную связь.

Понятно, что "углерод-углеродная" двойная связь, как используется во всем данном описании, относится к одной из следующих структур:



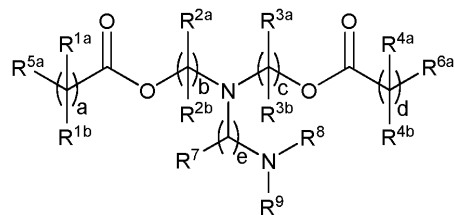
где R^a и R^b в каждом случае независимо представляют собой H или заместитель. Например, в некоторых вариантах осуществления R^a и R^b в каждом случае независимо представляют собой H, C_1 - C_{12} алкил или циклоалкил, например, H или C_1 - C_{12} алкил.

В других вариантах осуществления липидные соединения формулы (I) характеризуются следующей структурой (Ia):



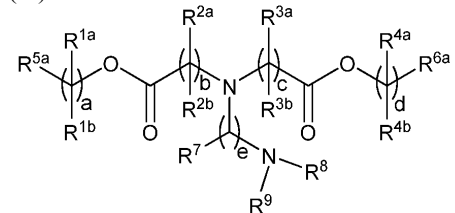
(Ia).

В других вариантах осуществления липидные соединения формулы (I) характеризуются следующей структурой (Ib):



(Ib).

В еще некоторых других вариантах осуществления липидные соединения формулы (I) характеризуются следующей структурой (Ic):



(Ic).

В определенных вариантах осуществления липидного соединения формулы (I) каждое из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 2 до 12 или целое число от 4 до 12. В других вариантах осуществления каждое из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 8 до 12 или от 5 до 9. В некоторых определенных вариантах осуществления a равняется 0. В некоторых вариантах осуществления a равняется 1. В других вариантах осуществления a равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления a равняется 4. В некоторых вариантах осуществления a равняется 5. В других вариантах осуществления a равняется 6. В дополни-

тельных вариантах осуществления а равняется 7. В еще некоторых других вариантах осуществления а равняется 8. В некоторых вариантах осуществления а равняется 9. В других вариантах осуществления а равняется 10. В дополнительных вариантах осуществления а равняется 11. В еще некоторых других вариантах осуществления а равняется 12. В некоторых вариантах осуществления а равняется 13. В других вариантах осуществления а равняется 14. В дополнительных вариантах осуществления а равняется 15. В еще некоторых других вариантах осуществления а равняется 16.

В некоторых других вариантах осуществления формулы (I) b равняется 1. В других вариантах осуществления b равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 4. В некоторых вариантах осуществления b равняется 5. В других вариантах осуществления b равняется 6. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 7. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 8. В некоторых вариантах осуществления b равняется 9. В других вариантах осуществления b равняется 10. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 11. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 12. В некоторых вариантах осуществления b равняется 13. В других вариантах осуществления b равняется 14. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 15. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 16.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления формулы (I) с равняется 1. В других вариантах осуществления с равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления с равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления с равняется 4. В некоторых вариантах осуществления с равняется 5. В других вариантах осуществления с равняется 6. В дополнительных вариантах осуществления с равняется 7. В еще некоторых других вариантах осуществления с равняется 8. В некоторых вариантах осуществления с равняется 9. В других вариантах осуществления с равняется 10. В дополнительных вариантах осуществления с равняется 11. В еще некоторых других вариантах осуществления с равняется 12. В некоторых вариантах осуществления с равняется 13. В других вариантах осуществления с равняется 14. В дополнительных вариантах осуществления с равняется 15. В еще некоторых других вариантах осуществления с равняется 16.

В некоторых определенных других вариантах осуществления формулы (I) d равняется 0. В некоторых вариантах осуществления d равняется 1. В других вариантах осуществления d равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления d равняется 4. В некоторых вариантах осуществления d равняется 5. В других вариантах осуществления d равняется 6. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 7. В еще некоторых других вариантах осуществления d равняется 8. В некоторых вариантах осуществления d равняется 9. В других вариантах осуществления d равняется 10. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 11. В еще некоторых других вариантах осуществления d равняется 12. В некоторых вариантах осуществления d равняется 13. В других вариантах осуществления d равняется 14. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 15. В еще некоторых других вариантах осуществления d равняется 16.

В некоторых других различных вариантах осуществления формулы (I) а и d являются одинаковыми. В некоторых других вариантах осуществления b и с являются одинаковыми. В некоторых других конкретных вариантах осуществления а и d являются одинаковыми, и b и с являются одинаковыми.

Сумма а и b и сумма с и d в формуле (I) являются факторами, которые можно варьировать для получения липида формулы I, обладающего необходимыми свойствами. В одном варианте осуществления а и b выбраны таким образом, чтобы их сумма представляла собой целое число, находящееся в диапазоне от 14 до 24. В других вариантах осуществления с и d выбраны таким образом, чтобы их сумма представляла собой целое число, находящееся в диапазоне от 14 до 24. В дополнительном варианте осуществления сумма а и b и сумма с и d являются одинаковыми. Например, в некоторых вариантах осуществления сумма а и b и сумма с и d являются одинаковыми целыми числами, которые могут находиться в диапазоне от 14 до 24. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления а, b, с и d выбраны таким образом, чтобы сумма а и b и сумма с и d равнялись 12 или больше.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) e равняется 1. В других вариантах осуществления e равняется 2.

Заместители R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} в формуле (I) конкретно не ограничены. В определенных вариантах осуществления R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} в каждом случае представляют собой H. В определенных других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет собой C_1 - C_{12} алкил. В определенных других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет собой C_1 - C_8 алкил. В определенных других вариантах осуществления по меньшей мере один из R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} и R^{4a} представляет собой C_1 - C_6 алкил. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет собой метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, n-гексил или n-октил.

В определенных вариантах осуществления формулы (I) R^{1a} , R^{1b} , R^{4a} и R^{4b} в каждом случае представляют собой C_1 - C_{12} алкил.

В дополнительных вариантах осуществления формулы (I) по меньшей мере один из R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} представляет собой H, или R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} в каждом случае представляют собой H.

В определенных вариантах осуществления формулы (I) R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь. В других вариантах осуществления вышеуказанного R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь.

Заместители R^5 и R^6 в формуле (I) конкретно не ограничены в вышеуказанных вариантах осуществления. В определенных вариантах осуществления один или оба из R^5 или R^6 представляют собой метил. В определенных других вариантах осуществления один или оба из R^5 или R^6 представляют собой циклоалкил, например, циклогексил. В этих вариантах осуществления циклоалкил может быть замещенным или незамещенным. В определенных других вариантах осуществления циклоалкил замещен C_1 - C_{12} алкилом, например, трет-бутилом.

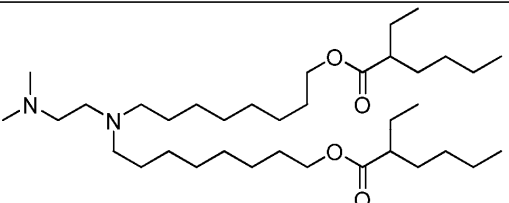
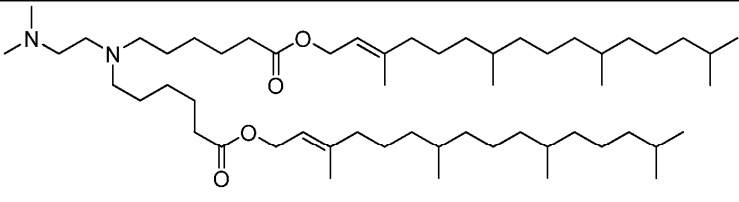
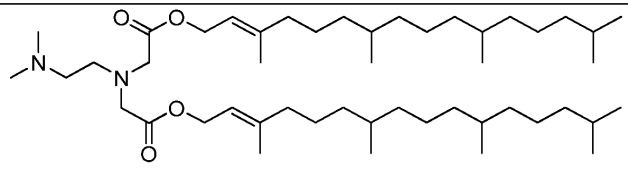
Заместители R^7 конкретно не ограничены в вышеуказанных вариантах осуществления формулы (I). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один R^7 представляет собой H. В некоторых других вариантах осуществления R^7 в каждом случае представляет собой H. В определенных других вариантах осуществления R^7 представляет собой C_1 - C_{12} алкил.

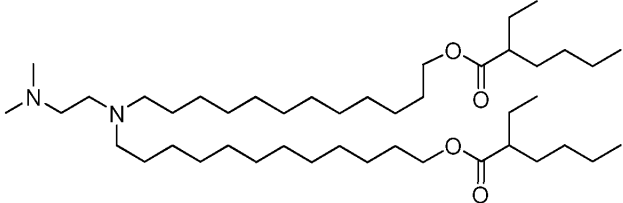
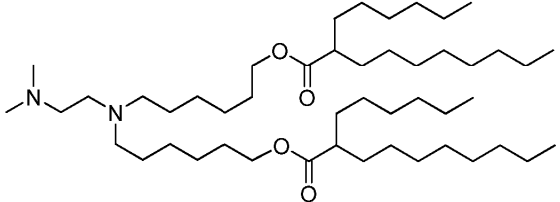
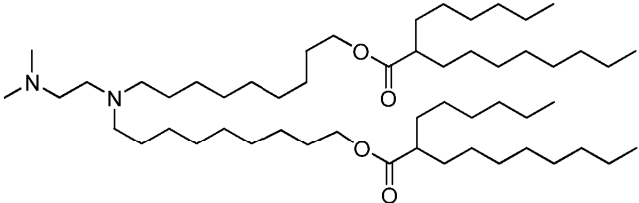
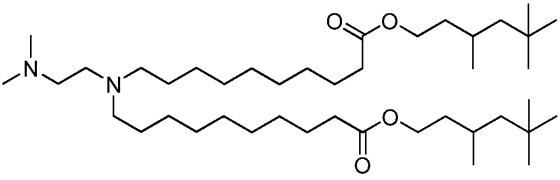
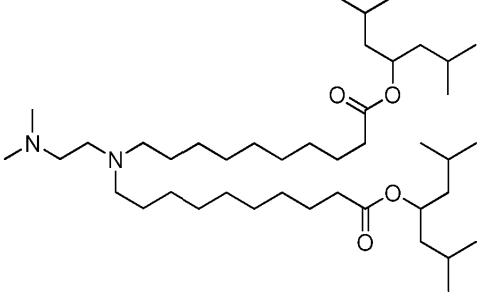
В определенных других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (I) один из R^8 или R^9 представляет собой метил. В других вариантах осуществления как R^8 , так и R^9 представляют собой метил.

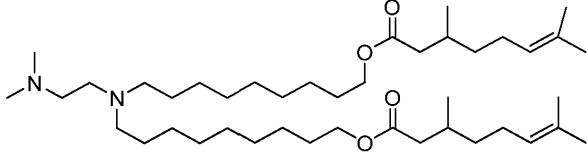
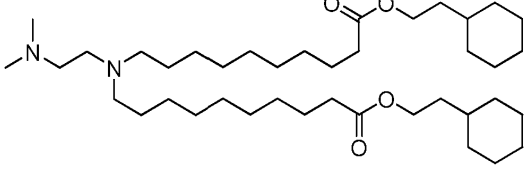
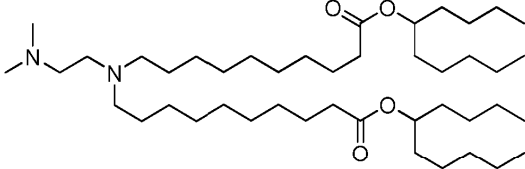
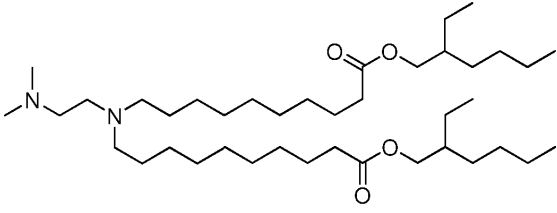
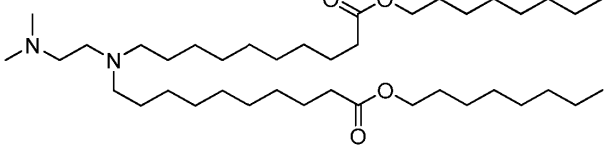
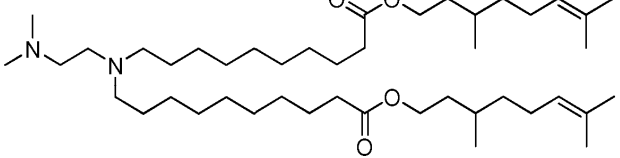
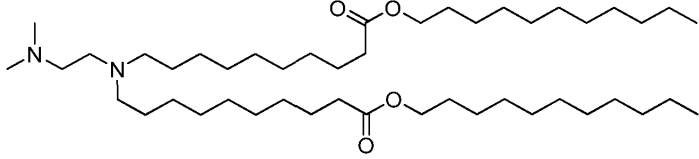
В некоторых различных вариантах осуществления формулы (I) R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное гетероциклическое кольцо, например, пирролидинильное кольцо.

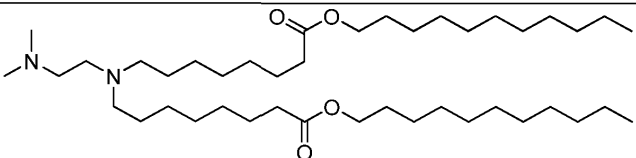
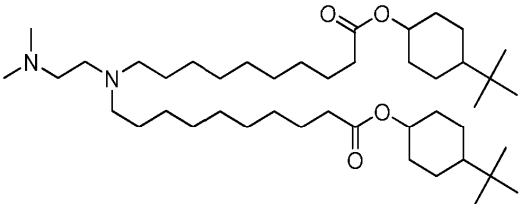
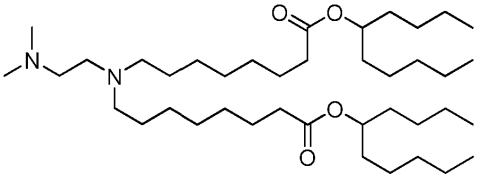
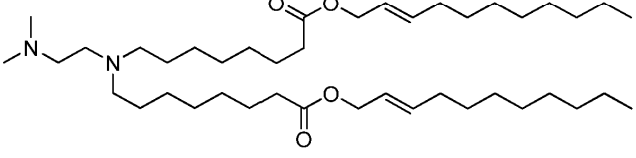
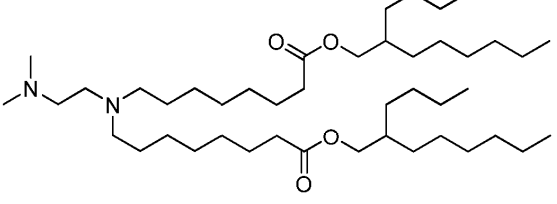
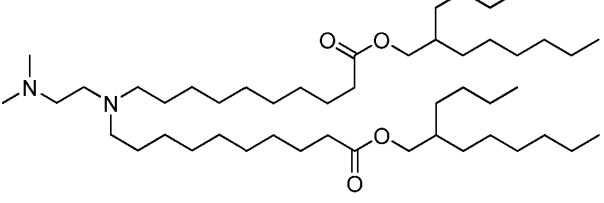
Во многих различных вариантах осуществления липид формулы (I) характеризуется одной из структур, приведенных в табл. 7 ("Иллюстративные липиды формулы (I)") ниже.

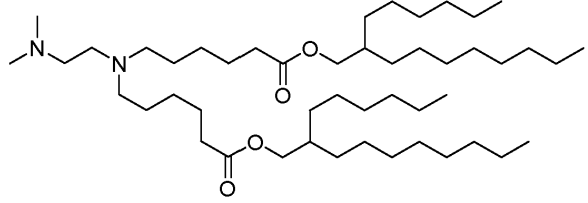
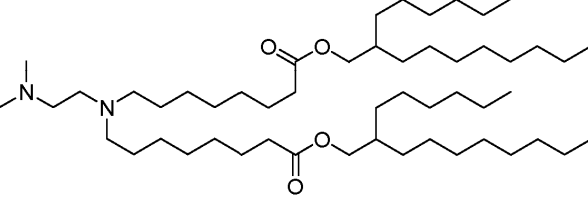
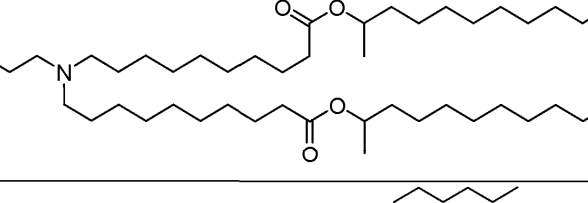
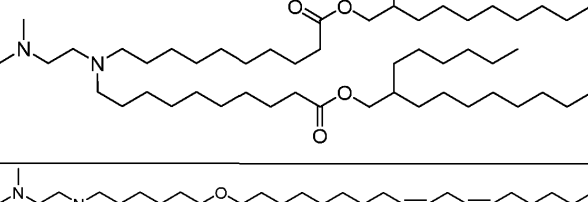
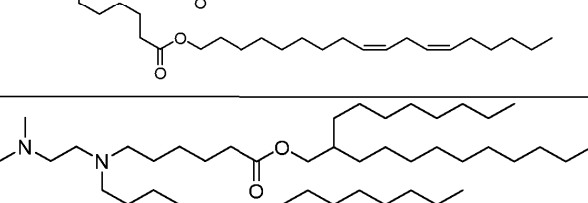
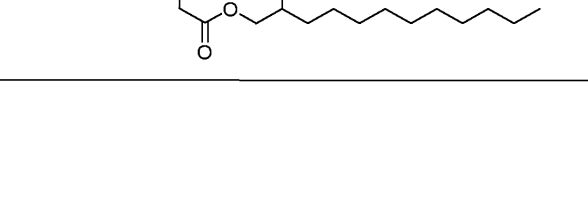
Таблица 7. Иллюстративные липиды формулы (I)

№	Структура	Способ получения
I-1		B
I-2		A
I-3		A

I-4		B
I-5		B
I-6		B
I-7		A
I-8		A

I-9		B
I-10		A
I-11		A
I-12		A
I-13		A
I-14		A
I-15		A

I-16		A
I-17		A
I-18		A
I-19		A
I-20		A
I-21		A

I-22		A
I-23		A
I-24		A
I-25		A
I-26		A
I-27		A

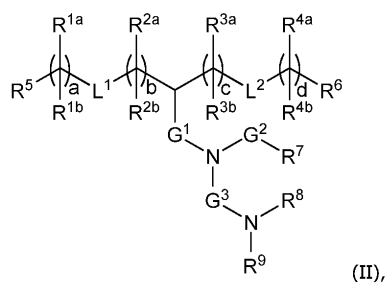
I-28		A
I-29		A
I-30		A
I-31		C
I-32		C
I-33		C

I-34		B
I-35		B
I-36		C
I-37		C
I-38		B

I-39		B
I-40		B
I-41		B

В некоторых вариантах осуществления LNP содержат липид формулы (I), соединение мРНК, определенное в данном документе, и один или несколько наполнителей, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и пегилированных липидов. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (I) представляет собой соединение 1-5. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (I) представляет собой соединение I-6.

В другом варианте осуществления липидная наночастица содержит (i) катионный липид со структурой формулы (II):



дополнительно определенной ниже, или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, и (ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней. В отношении соединения мРНК, последовательности мРНК и антигенного пептида или белка делается ссылка на описание этих признаков, включая соответствующие вышеупомянутые возможные варианты и предпочтения. В одном из предпочтительных вариантов осуществления соединение мРНК не содержит модификации нуклеозида. В другом варианте осуществления оно не содержит модификации азотистого основания. В дополнительном варианте осуществления оно не содержит 1-метилпсевдоуридиновой модификации. В дополнительном варианте осуществления соединение мРНК содержит только встречающиеся в природе нуклеозиды аденин, гуанин, цитозин и урацил.

Формула (II) дополнительно определена в следующем:

каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)NR^a$, $-OC(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)O-$ или прямую связь;

G^1 представляет собой C_1-C_2 алкилен, $-(C=O)-$, $-O(C=O)-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$ или прямую связь;

G^2 представляет собой $-C(=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)S-$, $-C(=O)NR^a$ или прямую связь;

G^3 представляет собой C_1 - C_6 алкилен;

R^a представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют собой либо (а) H или C_1 - C_{12} алкил;

либо (b) R^{1a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют собой либо (а) H или C_1 - C_{12} алкил;

либо (b) R^{2a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют собой либо (а) H или C_1 - C_{12} алкил;

либо (b) R^{3a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют собой либо (а) H или C_1 - C_{12} алкил;

либо (b) R^{4a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

каждый из R^5 и R^6 независимо представляет собой H или метил;

R^7 представляет собой C_4 - C_{20} алкил;

каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой C_1 - C_{12} алкил; или R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо;

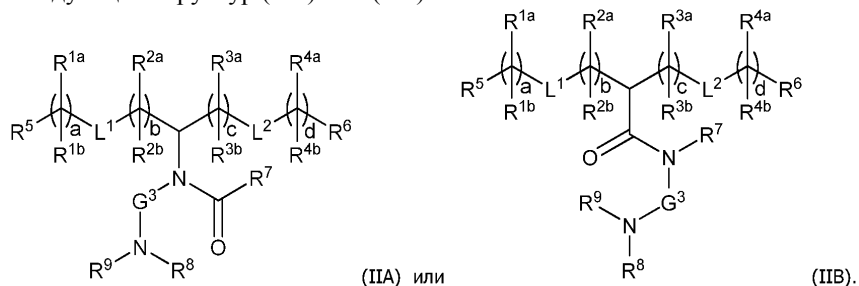
каждое из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 1 до 24; и

x равняется 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ или прямую связь. В других вариантах осуществления каждый из G^1 и G^2 независимо представляет собой $-(C=O)-$ или прямую связь. В некоторых различных вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$ или прямую связь; и каждый из G^1 и G^2 независимо представляет собой $-(C=O)-$ или прямую связь.

В некоторых различных вариантах осуществления формулы (II) каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^a-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $-NR^aC(=O)NR^a$, $-OC(=O)NR^a$, $-NR^aC(=O)O-$, $-NR^aS(O)_xNR^a$, $-NR^aS(O)_x-$ или $-S(O)_xNR^a$.

В других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение характеризуется одной из следующих структур (IIA) или (IIB):



В некоторых вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение характеризуется структурой (IIA). В других вариантах осуществления липидное соединение характеризуется структурой (IIB).

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления формулы (II) один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-O(C=O)-$.

В некоторых различных вариантах осуществления формулы (II) один из L^1 или L^2 представляет собой $-(C=O)O-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-(C=O)O-$.

В различных вариантах осуществления формулы (II) один из L^1 или L^2 представляет собой прямую связь. Как используется в данном документе, "прямая связь" означает, что группа (например, L^1 или L^2) отсутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой прямую связь.

В других различных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере в одном случае для R^{1a} и R^{1b} R^{1a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь.

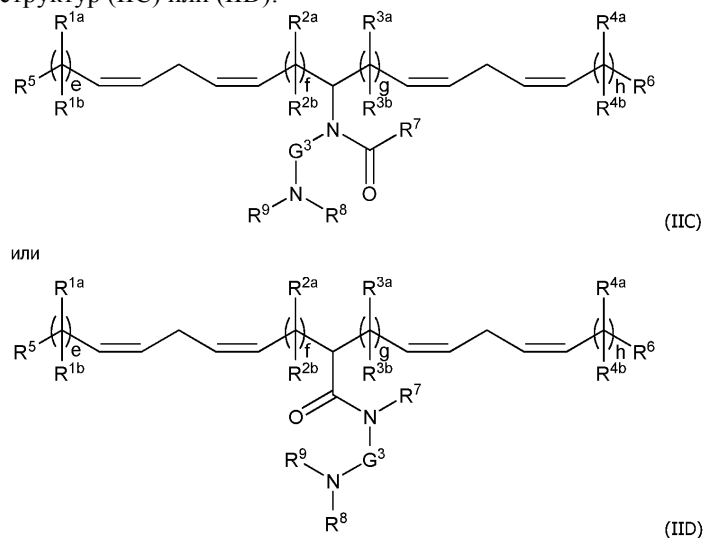
В еще нескольких других различных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере в одном случае для R^{4a} и R^{4b} R^{4a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с

которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь.

В дополнительных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере в одном случае для R^{2a} и R^{2b} R^{2a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь.

В других различных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере в одном случае для R^{3a} и R^{3b} R^{3a} представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь.

В различных других вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение характеризуется одной из следующих структур (IIC) или (IID):



где каждое из e, f, g и h независимо представляет собой целое число от 1 до 12.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) липидное соединение характеризуется структурой (IC). В других вариантах осуществления липидное соединение характеризуется структурой (IID).

В различных вариантах осуществления структур (IC) или (IID) каждое из e, f, g и h независимо представляет собой целое число от 4 до 10.

В определенных вариантах осуществления формулы (II) каждое из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 2 до 12 или целое число от 4 до 12. В других вариантах осуществления каждое из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 8 до 12 или от 5 до 9. В некоторых определенных вариантах осуществления a равняется 0. В некоторых вариантах осуществления a равняется 1. В других вариантах осуществления a равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления a равняется 4. В некоторых вариантах осуществления a равняется 5. В других вариантах осуществления a равняется 6. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 7. В еще некоторых других вариантах осуществления a равняется 8. В некоторых вариантах осуществления a равняется 9. В других вариантах осуществления a равняется 10. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 11. В еще некоторых других вариантах осуществления a равняется 12. В некоторых вариантах осуществления a равняется 13. В других вариантах осуществления a равняется 14. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 15. В еще некоторых других вариантах осуществления a равняется 16.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) b равняется 1. В других вариантах осуществления b равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 4. В некоторых вариантах осуществления b равняется 5. В других вариантах осуществления b равняется 6. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 7. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 8. В некоторых вариантах осуществления b равняется 9. В других вариантах осуществления b равняется 10. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 11. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 12. В некоторых вариантах осуществления b равняется 13. В других вариантах осуществления b равняется 14. В дополнительных вариантах осуществления b равняется 15. В еще некоторых других вариантах осуществления b равняется 16.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) c равняется 1. В других вариантах осуществления c равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления c равняется 3. В еще некоторых других вариантах осуществления c равняется 4. В некоторых вариантах осуществления c равняется 5. В других вариантах осуществления c равняется 6. В дополнительных вариантах осуществления c равняется 7. В

R^{3a} и R^{4a} представляет собой C_1 - C_6 алкил. В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет собой метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, н-гексил или н-октил.

В определенных вариантах осуществления формулы (II) R^{1a} , R^{1b} , R^{4a} и R^{4b} в каждом случае представляют собой C_1 - C_{12} алкил.

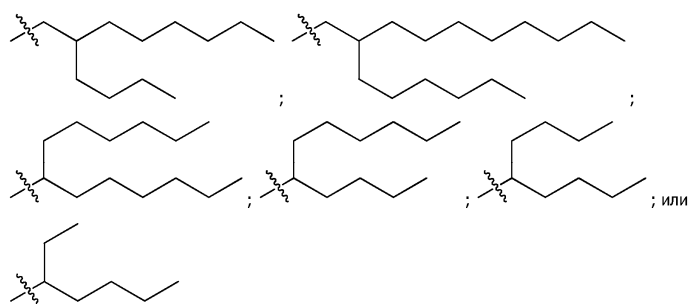
В дополнительных вариантах осуществления формулы (II) по меньшей мере один из R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} представляет собой H, или R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} и R^{4b} в каждом случае представляют собой H.

В определенных вариантах осуществления формулы (II) R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь. В других вариантах осуществления вышеуказанного R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь.

Заместители R^5 и R^6 в формуле (II) конкретно не ограничены в вышеуказанных вариантах осуществления. В определенных вариантах осуществления один из R^5 или R^6 представляет собой метил. В других вариантах осуществления каждый из R^5 или R^6 представляет собой метил.

Заместители R^7 в формуле (II) конкретно не ограничены в вышеуказанных вариантах осуществления. В определенных вариантах осуществления R^7 представляет собой C_6 - C_{16} алкил. В некоторых других вариантах осуществления R^7 представляет собой C_6 - C_9 алкил. В некоторых из этих вариантов осуществления R^7 замещен $-(C=O)OR^b$, $-O(C=O)R^b$, $-C(=O)R^b$, $-OR^b$, $-S(O)_xR^b$, $-S-SR^b$, $-C(=O)SR^b$, $-SC(=O)R^b$, $-NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)R^b$, $-C(=O)NR^aR^b$, $-NR^aC(=O)NR^aR^b$, $-OC(=O)NR^aR^b$, $-NR^aS(O)_xNR^aR^b$, $-NR^aS(O)_xR^b$ или $-S(O)_xNR^aR^b$, где R^a представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил; R^b представляет собой C_1 - C_{12} алкил; и x равняется 0, 1 или 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R^7 замещен $-(C=O)OR^b$ или $-O(C=O)R^b$.

В различных вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) R^b представляет собой разветвленный C_1 - C_{12} алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления R^b характеризуется одной из следующих структур:



В определенных других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (II) один из R^8 или R^9 представляет собой метил. В других вариантах осуществления как R^8 , так и R^9 представляют собой метил.

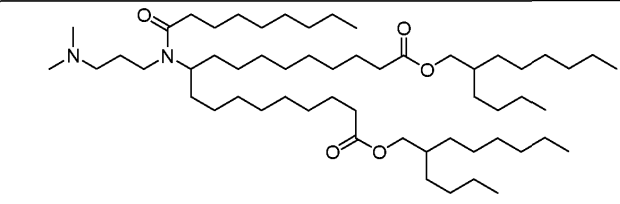
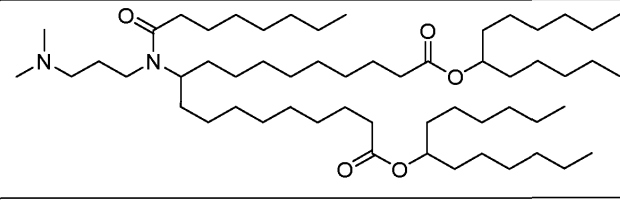
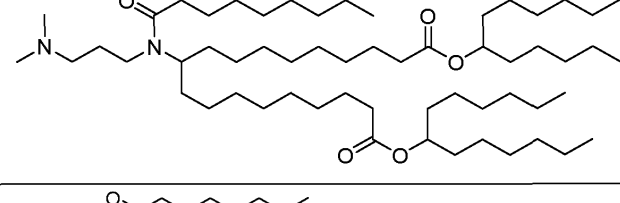
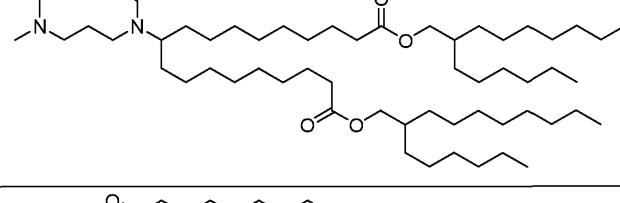
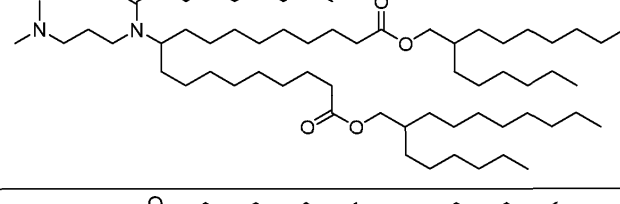
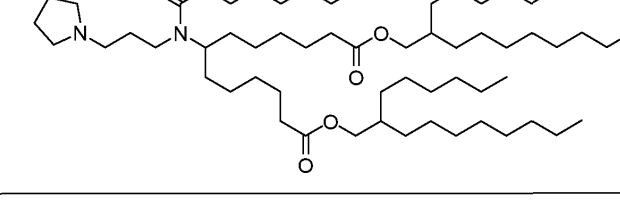
В некоторых различных вариантах осуществления формулы (II) R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанного R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-членное гетероциклическое кольцо, например пирролидинильное кольцо. В некоторых различных вариантах осуществления вышеуказанного R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 6-членное гетероциклическое кольцо, например пиперазинильное кольцо.

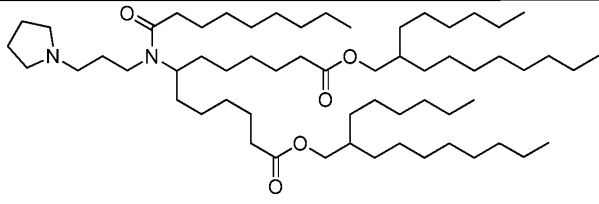
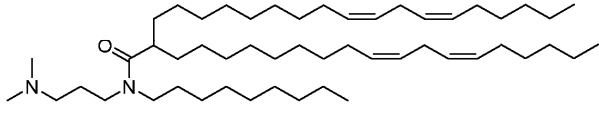
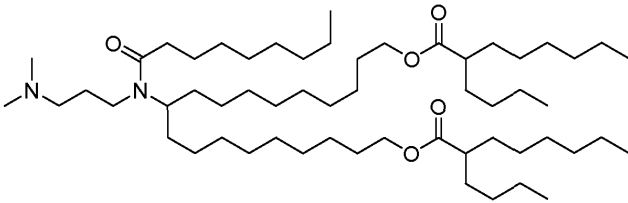
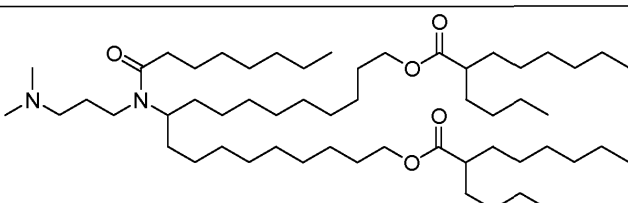
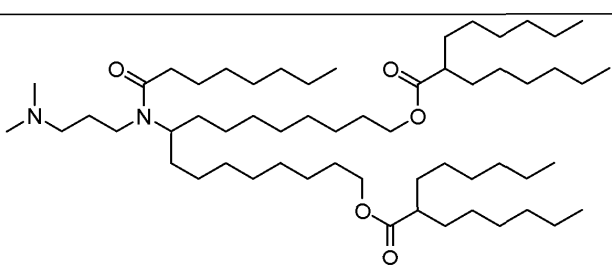
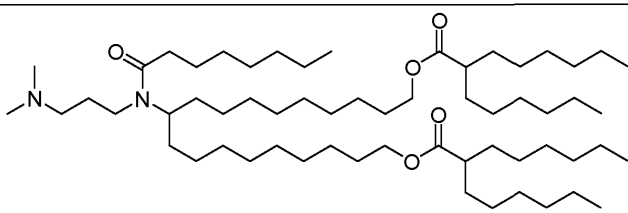
В еще нескольких других вариантах осуществления вышеуказанных липидов формулы (II) G^3 представляет собой C_2 - C_4 алкилен, например, C_3 алкилен.

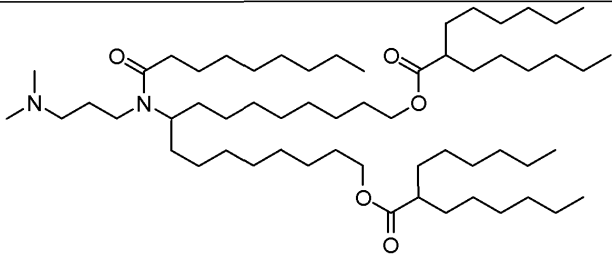
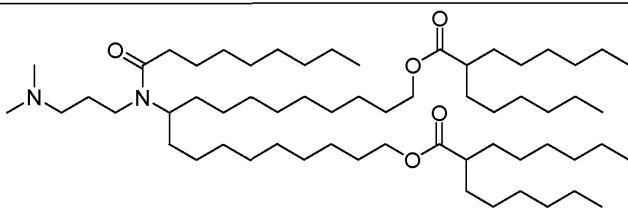
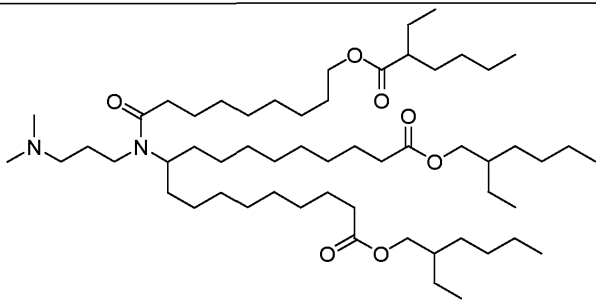
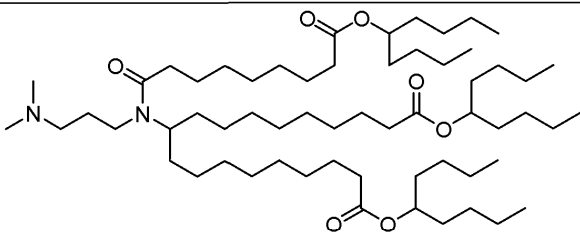
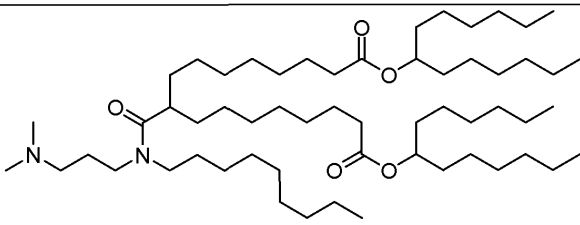
Во многих различных вариантах осуществления липидное соединение характеризуется одной из структур, приведенных в табл. 8 ("Иллюстративные липиды формулы (II)") ниже.

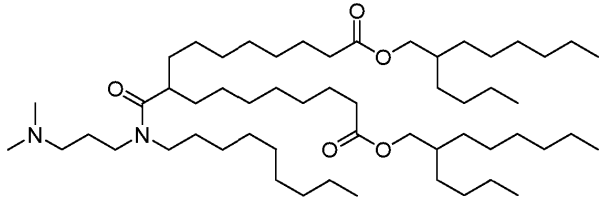
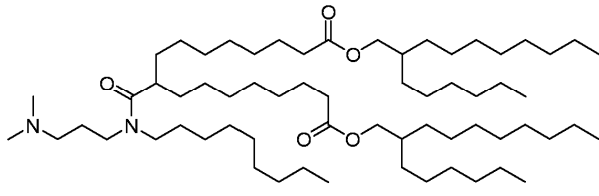
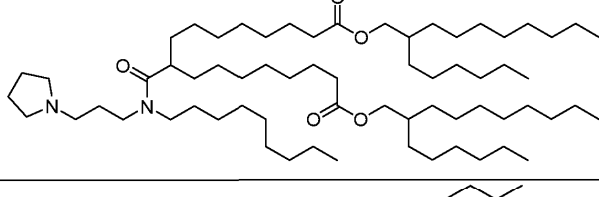
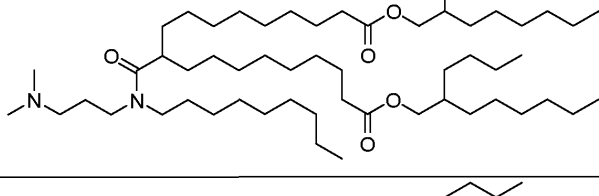
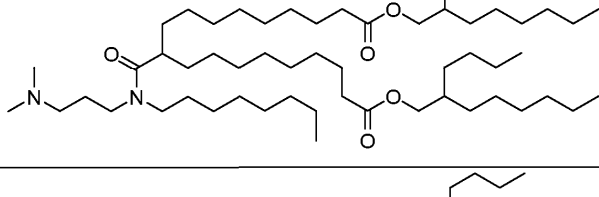
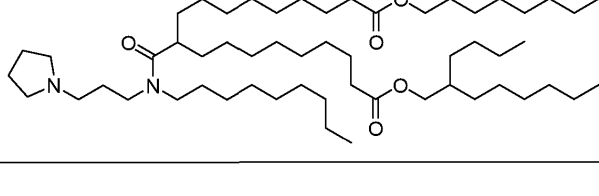
Таблица 8. Иллюстративные липиды формулы (II)

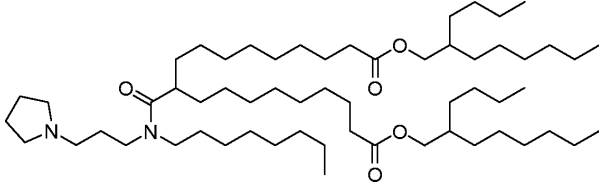
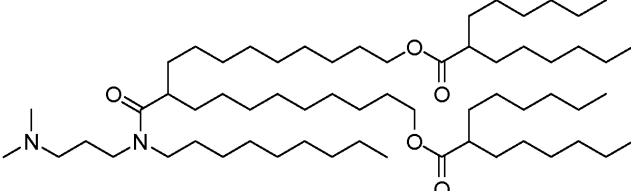
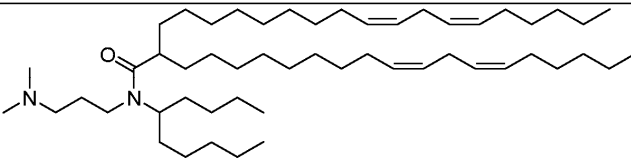
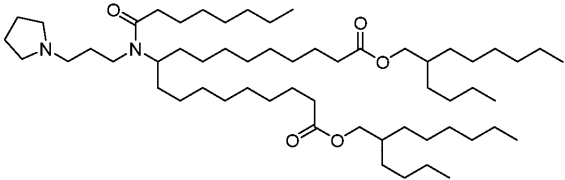
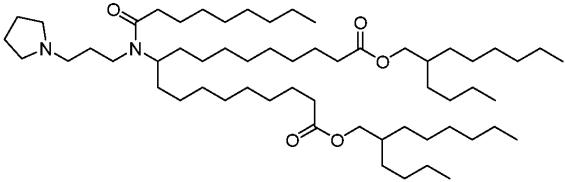
№	Структура	Способ получения
II-1		D
II-2		D
II-3		D
II-4		E
II-5		D
II-6		D
II-7		D
II-8		D

II-9		D
II-10		D
II-11		D
II-12		D
II-13		D
II-14		D

II-15		D
II-16		E
II-17		D
II-18		D
II-19		D
II-20		D

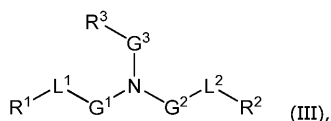
II-21		D
II-22		D
II-23		D
II-24		D
II-25		E

II-26		E
II-27		E
II-28		E
II-29		E
II-30		E
II-31		E

II-32		E
II-33		E
II-34		E
II-35		D
II-36		D

В некоторых вариантах осуществления LNP содержат липид формулы (II), соединение мРНК, описанное выше, и один или несколько наполнителей, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и пегелированных липидов. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (II) представляет собой соединение II-9. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (II) представляет собой соединение II-10. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (II) представляет собой соединение II-11. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (II) представляет собой соединение II-12. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (II) представляет собой соединение II-32.

В дополнительном варианте осуществления LNP содержит (i) катионный липид формулы (III)



дополнительно определенной ниже, или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, и (ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней. В отношении соединения мРНК, последовательности мРНК и антигенного пептида или белка делается ссылка на описание этих признаков, включая соответствующие вышеупомянутые возможные варианты и предпочтения. В одном из предпочтительных вариантов осуществления соединение мРНК не содержит модификации нуклеозида. В другом варианте осуществления оно не содержит модификации азотистого основания. В дополнительном варианте осуществления оно не содержит 1-метилпсевдоуридиновой модификации. В еще одном дополнительном варианте осуществления соединение мРНК содержит только природные нуклеозиды аденин, гуанин, цитозин и урацил.

Формула (III) дополнительно определена в следующем:

один из L^1 или L^2 представляет собой $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{=O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})_x-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{C}(\text{=O})\text{S}-$, $\text{SC}(\text{=O})-$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})-$, $-\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$, $-\text{OC}(\text{=O})\text{NR}^a-$ или $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{O}-$, а другой из L^1 или L^2 представляет собой $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$, $-(\text{C}=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{=O})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}(\text{O})_x-$, $-\text{S}-\text{S}-$, $-\text{C}(\text{=O})\text{S}-$, $\text{SC}(\text{=O})-$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})-$, $-\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$, $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a-$, $-\text{OC}(\text{=O})\text{NR}^a-$ или $-\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{O}-$ или прямую связь;

каждый из G^1 и G^2 независимо представляет собой незамещенный C_1 - C_{12} алкилен или C_1 - C_{12} ал-

кенилен;

G^3 представляет собой C_1 - C_{24} алкилен, C_1 - C_{24} алкенилен, C_3 - C_8 циклоалкилен, C_3 - C_8 циклоалкенилен;

R^a представляет собой H или C_1 - C_{12} алкил;

каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой C_6 - C_{24} алкил или C_6 - C_{24} алкенил;

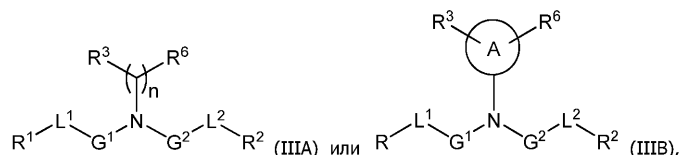
R^3 представляет собой H, OR^5 , CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ или $-NR^5C(=O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1 - C_{12} алкил;

R^5 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил; и

x равняется 0, 1 или 2.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) липид характеризуется одной из следующих структур (IIIА) или (IIIВ):



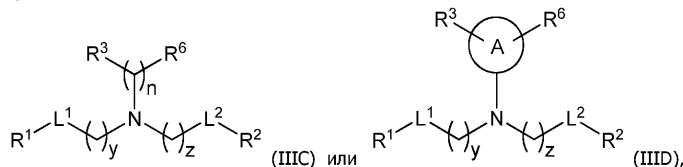
где А представляет собой 3-8-членное циклоалкильное или циклоалкиленовое кольцо;

R^6 в каждом случае независимо представляет собой H, OH или C_1 - C_{24} алкил;

n представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 1 до 15.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) липид характеризуется структурой (IIIА), а в других вариантах осуществления липид характеризуется структурой (IIIВ).

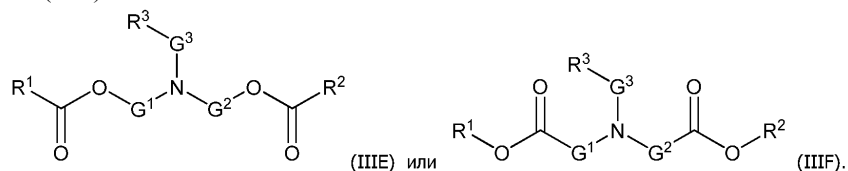
В других вариантах осуществления формулы (III) липид характеризуется одной из следующих структур (IIIС) или (IIID):



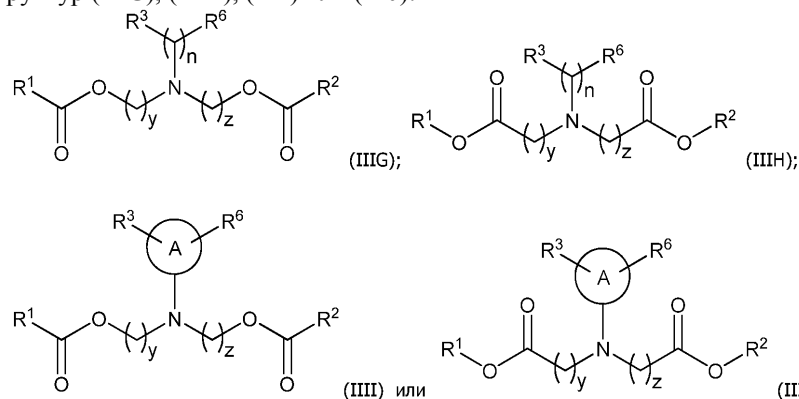
где каждое из y и z независимо представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 1 до 12.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления формулы (III) один из L^1 или L^2 представляет собой $-O(C=O)-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-O(C=O)-$. В некоторых различных вариантах осуществления любого из вышеуказанного каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-(C=O)O-$ или $-O(C=O)-$. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из L^1 и L^2 представляет собой $-(C=O)O-$.

В некоторых различных вариантах осуществления формулы (III) липид имеет одну из следующих структур (IIIE) или (IIIF):



В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) липид характеризуется одной из следующих структур (IIIG), (IIIH), (IIII) или (IIIJ):



В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) n представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 12, например от 2 до 8 или от 2 до 4. Например, в некоторых вариантах осуществления n равняется 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления n равняется 3. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4. В некоторых вариантах осуществления n равняется 5.

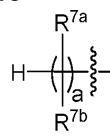
В некоторых вариантах осуществления n равняется 6.

В некоторых других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) каждое из y и z независимо представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 2 до 10. Например, в некоторых вариантах осуществления каждое из y и z независимо представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 4 до 9 или от 4 до 6.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R^6 представляет собой H. В других вышеуказанных вариантах осуществления R^6 представляет собой C_1 - C_{24} алкил. В других вариантах осуществления R^6 представляет собой OH.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III) G^3 является незамещенным. В других вариантах осуществления G^3 является замещенным. Во многих различных вариантах осуществления G^3 представляет собой линейный C_1 - C_{24} алкилен или линейный C_1 - C_{24} алкенилен.

В некоторых других вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R^1 или R^2 или они оба представляют собой C_6 - C_{24} алкенил. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из R^1 и R^2 независимо характеризуется следующей структурой:

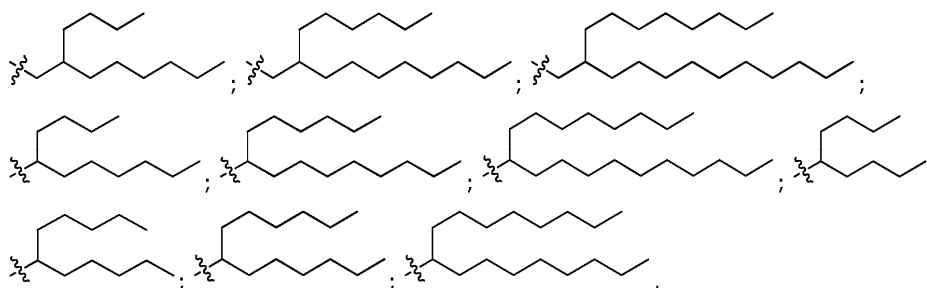


где R^{7a} и R^{7b} в каждом случае независимо представляют собой H или C_1 - C_{12} алкил; и a представляет собой целое число от 2 до 12, где каждый из R^{7a} , R^{7b} и a выбран таким образом, чтобы каждый из R^1 и R^2 независимо содержал 6-20 атомов углерода.

Например, в некоторых вариантах осуществления a представляет собой целое число, находящееся в диапазоне от 5 до 9 или от 8 до 12.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R^{7a} по меньшей мере в одном случае представляет собой H. Например, в некоторых вариантах осуществления R^{7a} в каждом случае представляет собой H. В других различных вариантах осуществления вышеуказанного R^{7b} по меньшей мере в одном случае представляет собой C_1 - C_8 алкил. Например, в некоторых вариантах осуществления C_1 - C_8 алкил представляет собой метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, н-гексил или н-октил.

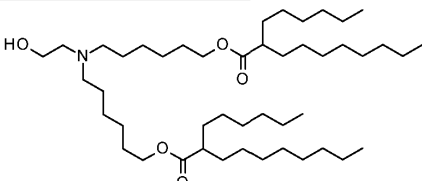
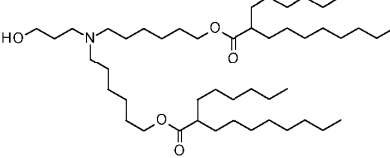
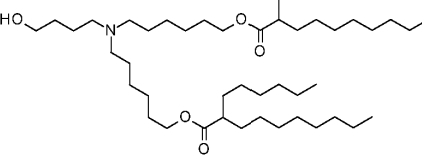
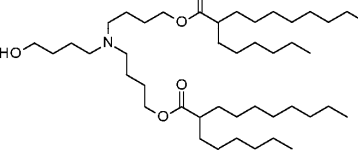
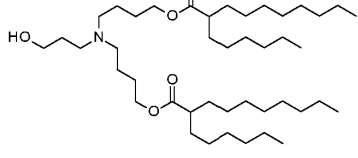
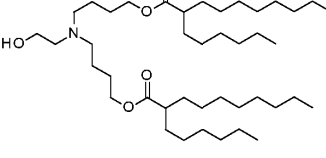
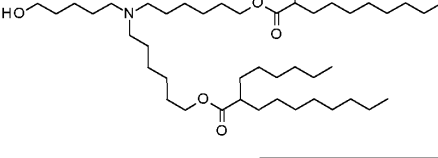
В различных вариантах осуществления формулы (III) R^1 или R^2 или они оба характеризуются одной из следующих структур:

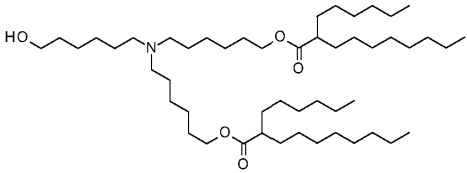
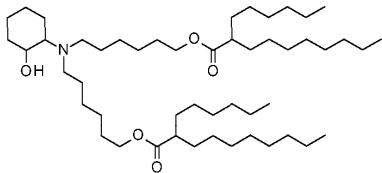
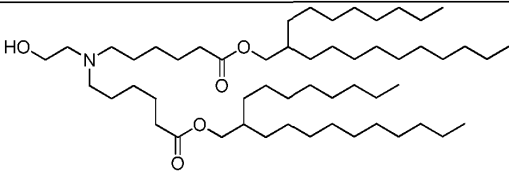
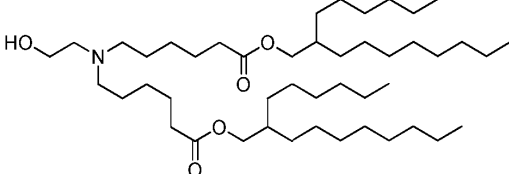
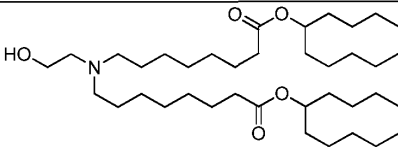
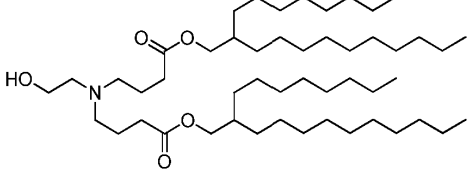
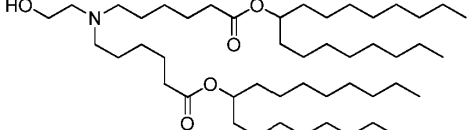


В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления формулы (III) R^3 представляет собой OH, CN, $-C(=O)OR^4$, $-OC(=O)R^4$ или $-NHC(=O)R^4$. В некоторых вариантах осуществления R^4 представляет собой метил или этил.

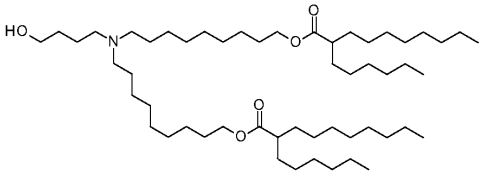
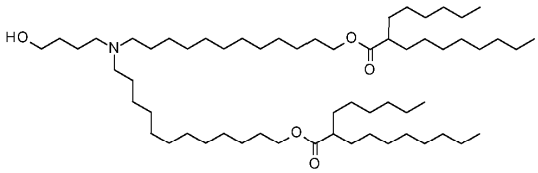
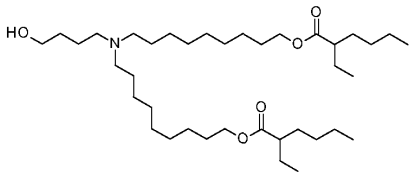
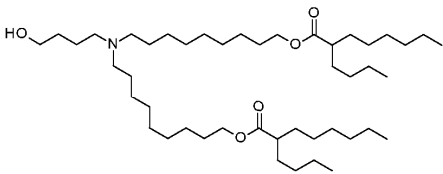
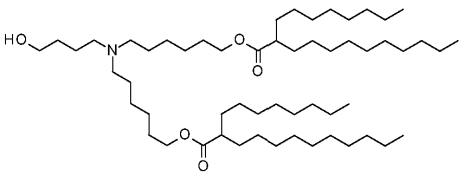
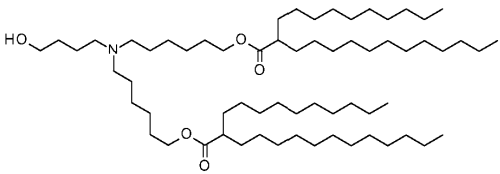
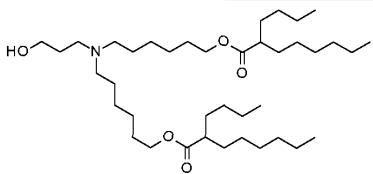
Во многих различных вариантах осуществления катионный липид формулы (III) характеризуется одной из структур, приведенных в табл. 9 ("Иллюстративные соединения формулы (III)") ниже.

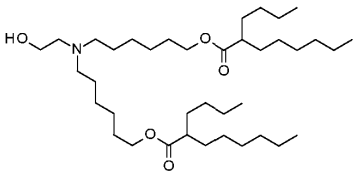
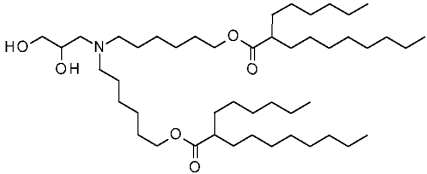
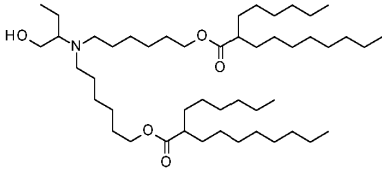
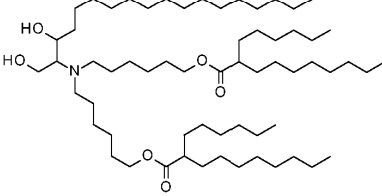
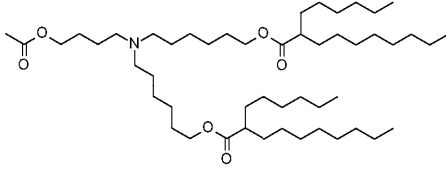
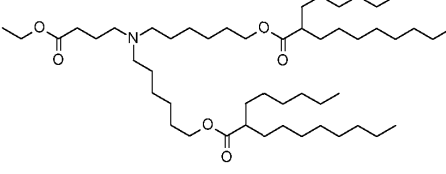
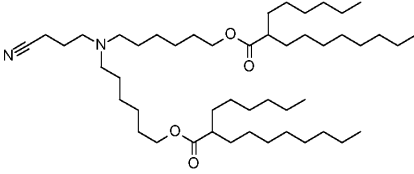
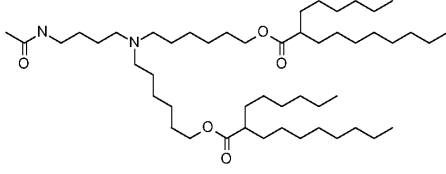
Таблица 9. Иллюстративные соединения формулы (III)

№	Структура	Способ получения
III-1		F
III-2		F
III-3		F
III-4		F
III-5		F
III-6		F
III-7		F

III-8		F
III-9		F
III-10		F
III-11		F
III-12		F
III-13		F
III-14		F

III-15		F
III-16		G
III-17		G
III-18		G
III-19		G
III-20		G
III-21		G

III-22		G
III-23		G
III-24		G
III-25		G
III-26		G
III-27		G
III-28		G

III-29		G
III-30		G
III-31		G
III-32		G
III-33		G
III-34		G
III-35		G
III-36		G

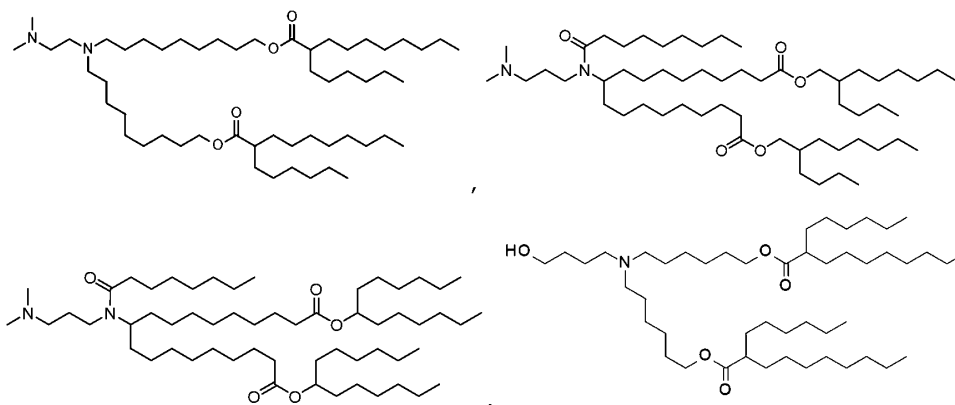
В некоторых вариантах осуществления LNP содержат липид формулы (III), соединение мРНК, описанное в данном документе, и один или несколько наполнителей, выбранных из нейтральных липидов, стероидов и пегилированных липидов. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (III) представляет собой соединение III-3. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (III) представляет собой соединение III-7.

В контексте настоящего изобретения LNP-III-3 означает липидную наночастицу, определенную в данном документе, содержащую катионное липидное соединение III-3 в соответствии с вышеприведенными таблицами. Другие липидные наночастицы упоминаются в аналогичной форме.

В определенных вариантах осуществления катионный липид формулы (I), (II) или (III) присутствует в LNP в количестве от приблизительно 30 до приблизительно 95 мол.% относительно общего содержания липидов в LNP. Если в состав LNP включено более одного катионного липида, то такие процентные доли применяются в отношении комбинации катионных липидов. В одном варианте осуществления катионный липид присутствует в LNP в количестве от приблизительно 30 до приблизительно 70 мол.%. В одном варианте осуществления катионный липид присутствует в LNP в количестве от приблизительно 40 до приблизительно 60 мол.%, таком как приблизительно 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 мол.% соответственно.

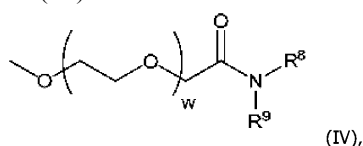
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения LNP содержит комбинацию или смесь любых липидов, описанных выше.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления липидная наночастица содержит катионный липид, выбранный из следующей группы:



В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к липидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит:

(i) конъюгат PEG-липид формулы (IV)



где каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 10-30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями;

и w имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60; и

(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок; где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней. В отношении соединения мРНК, последовательности мРНК и антигенного пептида или белка делается ссылка на описание этих признаков, включая соответствующие вышеупомянутые возможные варианты и предпочтения. В одном из предпочтительных вариантов осуществления соединение мРНК не содержит модификации нуклеозида. В другом варианте осуществления оно не содержит модификации азотистого основания. В дополнительном варианте осуществления оно не содержит 1-метилпсевдоуридиновой модификации. Более того, если конъюгат PEG-липид представляет собой соединение (IVa), то липидная наночастица не является липидной наночастицей, содержащей соединение 1-6, DSPC, холестерин и конъюгат PEG-липид (IVa) в соотношении приблизительно 50:10:38,5:1,5, которая инкапсулирует немодифицированную, 1-метилпсевдоуридинмодифицированную или кодон-оптимизированную мРНК, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа PR8 или Cal/7/2009 или белок оболочки CD4-независимого HIV-1 R3A. В одном из предпочтительных вариантов осуществления липидная наночастица содержит (i) катионный липид формулы (I), (II) или (III), определенной выше, (ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, описанный в данном документе, и

(iii) конъюгат PEG-липид формулы (IV); где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

Количество постоянно катионного липида или липидоида также следует выбирать с учетом количества нуклеиновой кислоты-карго. В одном варианте осуществления эти количества выбраны таким образом, что полученное в результате соотношение N/P в наночастице(наночастицах) или композиции находится в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 20. В данном контексте соотношение N/P определяется как молярное соотношение атомов азота ("N") в основных азотсодержащих группах липида или липидоида и фосфатных групп ("P") нуклеиновой кислоты, применяемой в качестве карго. Соотно-

шение N/P может быть рассчитано, исходя из того, что, например, 1 мкг РНК, как правило, содержит приблизительно 3 нмоль фосфатных остатков, при условии, что РНК характеризуется статистическим распределением азотистых оснований. Значение "N" липида или липидоида может быть рассчитано исходя из его молекулярной массы и относительного содержания постоянно катионных и - в случае наличия - катионизируемых групп.

Обычно полагают, что такие низкие соотношения N/P пагубно влияют на функциональные характеристики и эффективность *in vivo* таких комплексов носитель-карго или наночастиц, нагруженных нуклеиновыми кислотами. Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что такие соотношения N/P являются вполне применимыми в контексте настоящего изобретения, в частности, если предполагается локальное или внесосудистое введение наночастиц. В данном случае было соответственно обнаружено, что наночастицы являются эффективными и в то же время хорошо переносимыми.

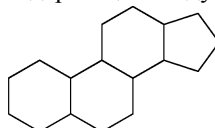
В определенных вариантах осуществления LNP содержит один или несколько дополнительных липидов, которые стабилизируют образование частиц в ходе их образования.

Подходящие стабилизирующие липиды включают нейтральные липиды и анионные липиды. Термин "нейтральный липид" относится к любой из ряда молекул липидов, которые существуют в незаряженной или нейтральной цвиттер-ионной форме при физиологическом значении pH. Иллюстративные нейтральные липиды включают диацилфосфатидилхолины, диацилфосфатидилэтаноламины, церамиды, сфингомиелины, дигидросфингомиелины, кефалины и цереброзиды.

Иллюстративные нейтральные липиды включают, например, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилдиолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилдиолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE) и 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE) и 1,2-дизлаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (транс-DOPE). В одном варианте осуществления нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC).

В некоторых вариантах осуществления LNP содержат нейтральный липид, выбранный из DSPC, DPPC, DMPC, DOPC, POPC, DOPE и SM. В различных вариантах осуществления молярное соотношение катионного липида (например, липида формулы (I), (II) или (III)) и нейтрального липида находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 8:1.

В различных вариантах осуществления LNP дополнительно содержат стероид или аналог стероида. "Стероид" представляет собой соединение, содержащее следующий углеродный скелет:



В определенных вариантах осуществления стероид или аналог стероида представляет собой холестерин. В некоторых из этих вариантов осуществления молярное соотношение катионного липида (например, липида формулы (I), (II) или (III)) и холестерина находится в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1:1.

Термин "анионный липид" относится к любому липиду, отрицательно заряженному при физиологическом значении pH. Эти липиды включают фосфатидилглицерин, кардиолипин, диацилфосфатидилсерин, диацилфосфатидную кислоту, N-додеканоилфосфатидилэтаноламины, N-сукцинилфосфатидилэтаноламины, N-глутарилфосфатидилэтаноламины, лизилфосфатидилглицерины, пальмитоилдиолеоилфосфатидилглицерин (POPG) и другие анионные модифицирующие группы, присоединенные к нейтральным липидам.

В определенных вариантах осуществления LNP содержит гликолипиды (например, моносиалоганглиозид GM₁).

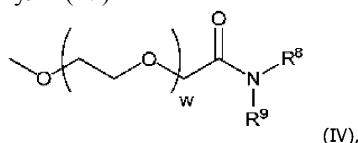
В некоторых вариантах осуществления LNP содержат липид, конъюгированный с полимером. Термин "липид, конъюгированный с полимером" относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полимерную часть. Примером липида, конъюгированного с полимером, является пегилированный липид. Термин "пегилированный липид" относится к молекуле, содержащей как липидную часть, так и полиэтиленгликолевую часть. Пегилированные липиды известны из уровня техники и включают 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-s-DMG) и т.п.

В определенных вариантах осуществления LNP содержит дополнительный стабилизирующий липид, представляющий собой конъюгат полиэтиленгликоль-липид (пегилированный липид). Подходящие конъюгаты полиэтиленгликоль-липид включают PEG-модифицированный фосфатидилэтаноламин, PEG-модифицированную фосфатидную кислоту, PEG-модифицированные церамиды (например, PEG-CerC14 или PEG-CerC20), PEG-модифицированные диалкиламины, PEG-модифицированные диацилглицерины,

PEG-модифицированные диалкилглицерины. Иллюстративные конъюгаты полиэтиленгликоль-липид включают PEG-c-DOMG, PEG-c-DMA и PEG-s-DMG. В одном варианте осуществления конъюгат полиэтиленгликоль-липид представляет собой N-[(метоксиполи(этиленгликоль)₂₀₀₀)карбамил]-1,2-димиристилоксипропил-3-амин (PEG-c-DMA). В одном варианте осуществления конъюгат полиэтиленгликоль-липид представляет собой PEG-c-DOMG.

В других вариантах осуществления LNP содержат пегилированный диацилглицерин (PEG-DAG), такой как 1-(монометоксиполиэтиленгликоль)-2,3-димиристоилглицерин (PEG-DMG), пегилированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), конъюгат PEG-сукцинат-диацилглицерин (PEG-S-DAG), такой как 4-O-(2',3'-ди(тетрадеканоксипропил)-1-O-(ω-метокси(полиэтоксипропил)бутандиоат (PEG-S-DMG), пегилированный церамид (PEG-cer) или конъюгат PEG-диалкоксипропилкарбамат, такой как ω-метокси(полиэтоксипропил)-N-(2,3-ди(тетрадеканоксипропил)карбамат или 2,3-ди(тетрадеканоксипропил)-N-(ω-метокси(полиэтоксипропил)карбамат. В различных вариантах осуществления молярное соотношение катионного липида и пегилированного липида находится в диапазоне от приблизительно 100:1 до приблизительно 25:1.

Как указано, липидная наночастица, содержащая мРНК, может содержать пегилированный липид, характеризующийся структурой формулы (IV)

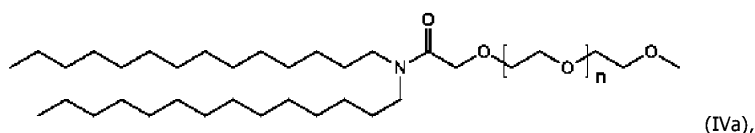


или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер или стереоизомер, где каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 10-30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и w имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60.

В некоторых вышеуказанных вариантах осуществления пегилированного липида (IV) R⁸ и R⁹ не представляют собой одновременно н-октадецил, если w равняется 42. В некоторых других вариантах осуществления каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 10-18 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 12-16 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 12 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 14 атомов углерода. В других вариантах осуществления каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 16 атомов углерода. В еще нескольких дополнительных вариантах осуществления каждый из R⁸ и R⁹ независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 18 атомов углерода. В еще нескольких других вариантах осуществления R⁸ представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 12 атомов углерода, а R⁹ представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 14 атомов углерода.

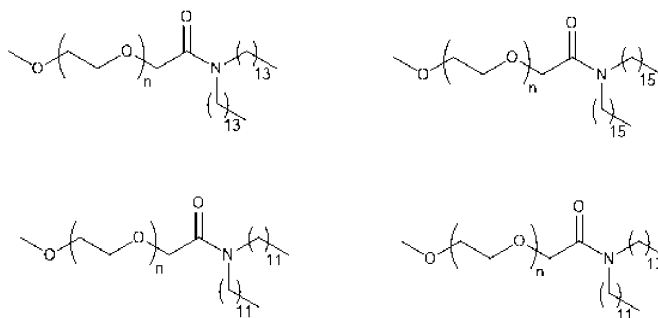
В различных вариантах осуществления w охватывает диапазон, выбранный таким образом, чтобы PEG-часть (IV) имела среднюю молекулярную массу, составляющую от приблизительно 400 до приблизительно 6000 г/моль. В некоторых вариантах осуществления среднее w равняется приблизительно 50.

В предпочтительном варианте осуществления R⁸ и R⁹ представляют собой насыщенные алкильные цепи. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления конъюгат PEG-липид представлен формулой (IVa)



где n имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60, такое как приблизительно 30±2, 32±2, 34±2, 36±2, 38±2, 40±2, 42±2, 44±2, 46±2, 48±2, 50±2, 52±2, 54±2, 56±2, 58±2 или 60±2. В наиболее предпочтительном варианте осуществления n равняется приблизительно 49.

В других вариантах осуществления пегилированный липид характеризуется одной из следующих структур:



где n представляет собой целое число, выбранное таким образом, чтобы средняя молекулярная масса пегилированного липида составляла приблизительно 2500 г/моль, при этом наиболее предпочтительно n равняется приблизительно 49.

В определенных вариантах осуществления конъюгат PEG-липид присутствует в LNP в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 10 мол.% относительно общего содержания липидов в наночастице. В одном варианте осуществления конъюгат PEG-липид присутствует в LNP в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 5 мол.%. В одном варианте осуществления конъюгат PEG-липид присутствует в LNP в количестве приблизительно 1 молярного процента или приблизительно 1,5 молярного процента.

В определенных вариантах осуществления LNP содержит один или несколько нацеливающих компонентов, способных нацеливать LNP на клетку или популяцию клеток. Например, в одном варианте осуществления нацеливающий компонент представляет собой лиганд, который направляет LNP на рецептор, находящийся на клеточной поверхности.

В определенных вариантах осуществления LNP содержит один или несколько интернализационных доменов. Например, в одном варианте осуществления LNP содержит один или несколько доменов, которые связываются с клеткой с индуцированием интернализации LNP. Например, в одном варианте осуществления один или несколько интернализационных доменов связываются с рецептором, находящимся на клеточной поверхности, с индуцированием рецептор-опосредованного поглощения LNP. В определенных вариантах осуществления LNP способна связывать биомолекулу *in vivo*, где биомолекула, связанная с LNP, может затем распознаваться рецептором клеточной поверхности с индуцированием интернализации. Например, в одном варианте осуществления LNP связывает системный AroE, что приводит к поглощению LNP и связанного с ним карго.

Другие иллюстративные LNP и их получение описаны в уровне техники, например в публикации заявки на патент США № US 20120276209, Semple et al., 2010, Nat. Biotechnol., 28(2): 172-176; Akinc et al., 2010, Mol. Ther., 18(7): 1357-1364; Basha et al., 2011, Mol. Ther., 19(12): 2186-2200; Leung et al., 2012, J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces, 116(34): 18440-18450; Lee et al., 2012, Int. J. Cancer., 131(5): E781-90; Belliveau et al., 2012, Mol. Ther. Nucleic Acids, 1: e37; Jayaraman et al., 2012, Angew Chem. Int. Ed. Engl., 51(34): 8529-8533; Mui et al., 2013, Mol. Ther. Nucleic Acids, 2, e139; Maier et al., 2013, Mol. Ther., 21(8): 1570-1578; и Tam et al., 2013, Nanomedicine, 9(5): 665-74, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

В предпочтительных вариантах осуществления липидные наночастицы имеют средний диаметр, составляющий от приблизительно 30 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 40 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 90 нм до приблизительно 100 нм, от приблизительно 70 до приблизительно 90 нм, от приблизительно 80 нм до приблизительно 90 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 80 нм или приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 нм, и являются фактически нетоксичными. Как указано, средний диаметр может соответствовать z -среднему размеру, определяемому с помощью динамического рассеяния света.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения липидные наночастицы имеют гидродинамический диаметр в диапазоне от приблизительно 50 нм до приблизительно 300 нм или от приблизительно 60 нм до приблизительно 250 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 150 нм или от приблизительно 60 нм до приблизительно 120 нм соответственно.

В определенных вариантах осуществления мРНК в случае присутствия в липидных наночастицах является устойчивой к разрушению под действием нуклеазы в водном растворе.

Общее количество мРНК в липидных наночастицах варьируется и может быть определено в зависимости от соотношения вес/вес мРНК и общих липидов. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соотношение мРНК и общих липидов составляет меньше 0,06 вес/вес, предпочтительно от 0,03 до 0,04 вес./вес.

В некоторых вариантах осуществления LNP содержат липид формулы (I), (II) или (III), соединение

мРНК, определенное выше, нейтральный липид, стероид и пегилированный липид. В некоторых вариантах осуществления липид формулы (I) представляет собой соединение I-6, или липид формулы (III) представляет собой соединение III-3, нейтральный липид представляет собой DSPC, стероид представляет собой холестерин, и пегилированный липид представляет собой соединение формулы (IVa).

В определенных вариантах осуществления LNP содержит один или несколько нацеливающих компонентов, способных нацеливать LNP на клетку или популяцию клеток. Например, в одном варианте осуществления нацеливающий компонент представляет собой лиганд, который направляет LNP на рецептор, находящийся на клеточной поверхности.

В определенных вариантах осуществления LNP содержит один или несколько интернализационных доменов. Например, в одном варианте осуществления LNP содержит один или несколько доменов, которые связываются с клеткой с индуцированием интернализации LNP. Например, в одном варианте осуществления один или несколько интернализационных доменов связываются с рецептором, находящимся на клеточной поверхности, с индуцированием рецептор-опосредованного поглощения LNP. В определенных вариантах осуществления LNP способна связывать биомолекулу *in vivo*, где биомолекула, связанная с LNP, может затем распознаваться рецептором клеточной поверхности с индуцированием интернализации. Например, в одном варианте осуществления LNP связывает системный АроЕ, что приводит к поглощению LNP и связанного с ним карго.

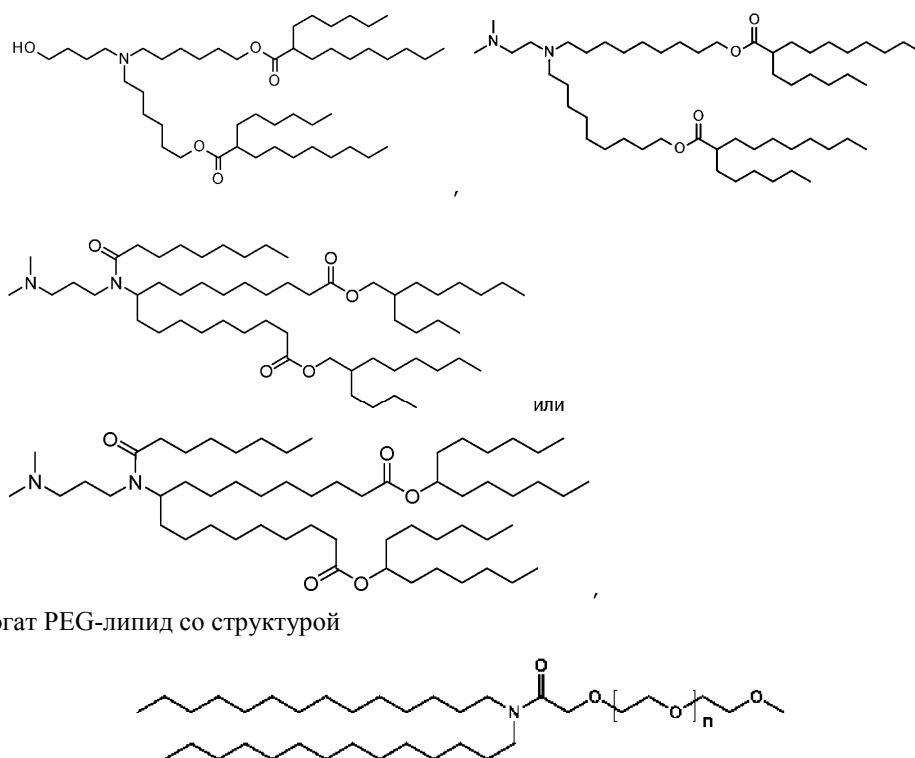
В частности, настоящее изобретение относится к следующим неограничивающим конкретным вариантам осуществления.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к липидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит катионный липид в соответствии с формулой (I), (II) или (II), определенной выше, и соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, определенный выше, где если катионный липид представлен формулой I-6, то липидная наночастица не является липидной наночастицей, содержащей соединение формулы I-6, DSPC, холестерин и конъюгат PEG-липид формулы (IVa) в соотношении приблизительно 50:10:38,5:1,5, которая инкапсулирует немодифицированную, 1-метилпсевдоуридинмодифицированную или кодон-оптимизированную мРНК, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа PR8 или Cal/7/2009 или белок оболочки CD4-независимого HIV-1 R3A.

Дополнительный предпочтительный вариант осуществления относится к липидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит конъюгат PEG-липид в соответствии с формулой (IV), определенной выше, и соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где если катионный липид представлен формулой I-6, то липидная наночастица не является липидной наночастицей, содержащей соединение формулы I-6, DSPC, холестерин и конъюгат PEG-липид формулы (IVa) в соотношении приблизительно 50:10:38,5:1,5, которая инкапсулирует немодифицированную, 1-метилпсевдоуридинмодифицированную или кодон-оптимизированную мРНК, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа PR8 или Cal/7/2009 или белок оболочки CD4-независимого HIV-1 R3A.

В конкретном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к липидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит катионный липид в соответствии с формулой (I), (II) или (III), конъюгат PEG-липид в соответствии с формулой (IV), соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, стероид и нейтральный липид, где, предпочтительно, если катионный липид представлен формулой I-6, то липидная наночастица не является липидной наночастицей, содержащей соединение формулы I-6, DSPC, холестерин и конъюгат PEG-липид формулы (IVa) в соотношении приблизительно 50:10:38,5:1,5, которая инкапсулирует немодифицированную, 1-метилпсевдоуридинмодифицированную или кодон-оптимизированную мРНК, кодирующую гемагглютинин вируса гриппа PR8 или Cal/7/2009 или белок оболочки CD4-независимого HIV-1 R3A, при этом антигенный пептид или белок предпочтительно получен из патогенных антигенов, опухолевых антигенов, аллергенных антигенов или собственных аутоантигенов или их фрагмента или варианта, при этом патогенный антиген более предпочтительно получен из вируса гриппа или бешенства.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к липидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит катионный липид, выбранный из

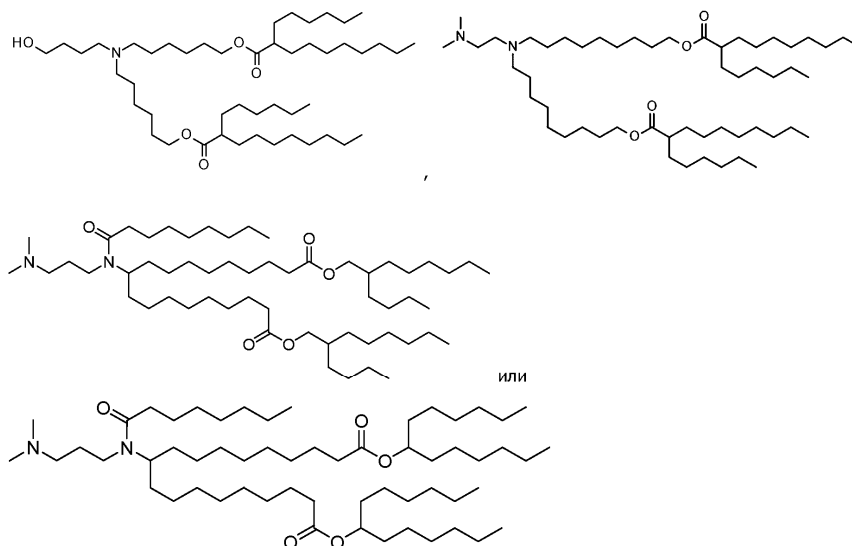


где n имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60, предпочтительно составляющее приблизительно 49, необязательно нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), и необязательно стероид, предпочтительно холестерин, где молярное соотношение катионного липида и DSPC необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 8:1, где молярное соотношение катионного липида и холестерина необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 1:1.

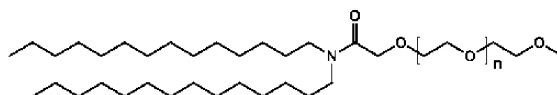
В одном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится клипидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит катионный липид формулы (I), (II) или (III) и/или конъюгат PEG-липид формулы (IV), необязательно нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), и необязательно стероид, предпочтительно холестерин, где молярное соотношение катионного липида и DSPC необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 8:1, где молярное соотношение катионного липида и холестерина необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 1:1, а также композицию на основе мРНК, содержащую последовательность мРНК, кодирующую антигенный пептид или белок, где последовательность мРНК дополнительно содержит, предпочтительно в направлении 5'-3', следующие элементы:

- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN,
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,
- в) поли(A)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов,
- г) необязательно поли(C)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов, и
- е) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК,
- ф) и необязательно элемент 3'-UTR.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится клипидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит катионный липид, выбранный из



и/или конъюгат PEG-липид со структурой

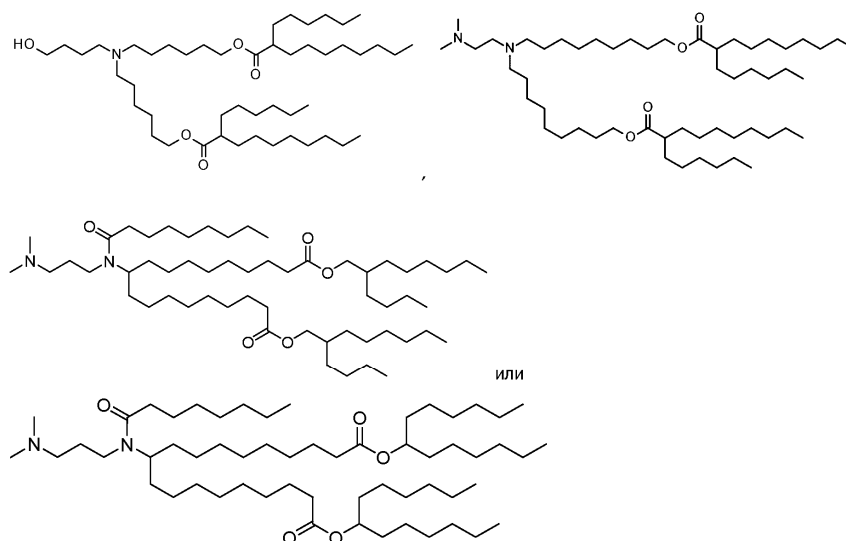


где n имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60, предпочтительно составляющее приблизительно 49, и соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую антигенный пептид или белок, где антигенный пептид или белок предпочтительно получен из патогенных антигенов, опухолевых антигенов, аллергенных антигенов или собственных аутоантигенов или их фрагмента или варианта, более предпочтительно антиген получен из вируса гриппа или бешенства, необязательно нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), и необязательно стероид, предпочтительно холестерин, где молярное соотношение катионного липида и DSPC необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 8:1, где молярное соотношение катионного липида и холестерина необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 1:1, где последовательность мРНК необязательно содержит:

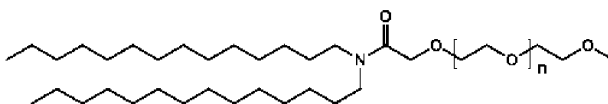
- 5'-кэп-структуру, и/или
- поли(А)-последовательность, и/или
- поли(С)-последовательность.

В более предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК содержит кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где последовательность мРНК содержит модификацию последовательности, выбранную из модификации содержания G/C, модификации кодонов, оптимизации кодонов или С-оптимизации последовательности.

В конкретном предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к липидной наночастице, содержащей мРНК, которая содержит катионный липид, выбранный из



необязательно конъюгат PEG-липид со структурой



где n имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60, предпочтительно составляющее приблизительно 49, и соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, необязательно нейтральный липид, предпочтительно 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), и необязательно стероид, предпочтительно холестерин, где молярное соотношение катионного липида и DSPC необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 8:1, где молярное соотношение катионного липида и холестерина необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 1:1, где последовательность мРНК дополнительно содержит, предпочтительно в направлении 5'-3', следующие элементы:

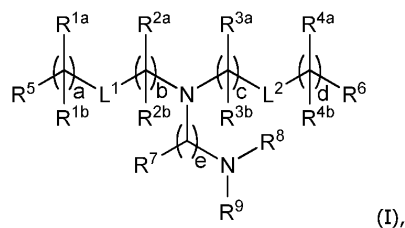
- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN,
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую антигенный пептид или белок, при этом предпочтительно антигенный пептид или белок получен из патогенных антигенов, опухолевых антигенов, аллергенных антигенов или собственных аутоантигенов или их фрагмента или варианта, более предпочтительно патогенный антиген получен из вируса гриппа или бешенства;
- в) поли(A)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов,
- г) необязательно поли(C)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов, и
- е) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК,
- ф) и необязательно элемент 3'-UTR.

В особенно предпочтительном варианте осуществления (фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением, содержащая мРНК, содержит липидные наночастицы, которые имеют молярное соотношение, составляющее примерно 50:10:38,5:1,5, предпочтительно 47,5:10:40,8:1,7 или более предпочтительно 47,4:10:40,9:1,7 (т.е. относительное содержание (мол. %) катионного липида, DSPC, холестерина и конъюгата PEG-липид; солюбилизированных в этаноле).

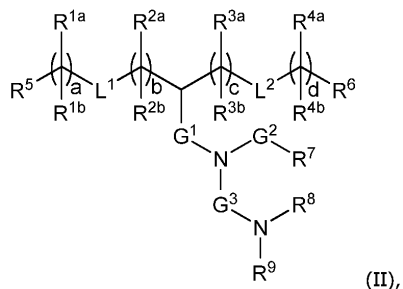
В особенно предпочтительных вариантах осуществления липидная наночастица представляет собой липидную наночастицу, содержащую мРНК, определенную выше, где антигенный пептид или белок предпочтительно получен из гемагглютинина (HA), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), белка матрикса 1 (M1), белка матрикса 2 (M2), неструктурного белка 1 (NS1), неструктурного белка 2 (NS2), белка ядерного экспорта (NEP), кислого полимеразного белка (PA), основного полимеразного белка PB1, PB1-F2 или основного полимеразного белка 2 (PB2) вируса гриппа или их фрагмента или варианта. Антигенный пептид или белок более предпочтительно получен из гемагглютинина (HA) или нейраминидазы (NA) вируса гриппа или их фрагмента или варианта. Антигенный пептид или белок еще более предпочтительно представляет собой по меньшей мере один полноразмерный белок гемагглютинин (HA) и/или по меньшей мере один полноразмерный белок нейраминидазу (NA) вируса гриппа или их вариант. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления вирус гриппа выбран из вируса гриппа А, В или С. В особенно предпочтительном варианте осуществления вирус гриппа А выбран из вируса гриппа, характеризующегося наличием гемагглютинина (HA), выбранного из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 и H18, и/или вирус гриппа А выбран из вируса гриппа, характеризующегося наличием нейраминидазы (NA), выбранной из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10 и N11. Вирус гриппа А предпочтительно выбран из группы, состоящей из H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N7, предпочтительно из H1N1, H3N2, H5N1. Последовательность мРНК наиболее предпочтительно содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) вируса гриппа или его фрагмента или варианта, и по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа или ее фрагмента или варианта. В особо предпочтительном варианте осуществления последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA), и/или по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, выбранного из группы, состоящей из H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N7, предпочтительно из H1N1, H3N2, H5N1, или их фрагмент или вариант.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения указанных липидных наночастиц, включающему стадии:

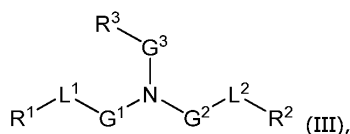
- (i) получения катионного липида формулы (I):



определенной выше, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера, и/или формулы (II)

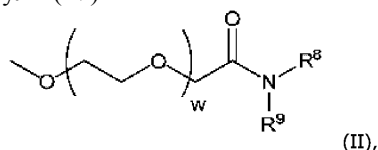


определенной выше, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера, и/или формулы III



определенной выше, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера; и/или

b) конъюгата PEG-липид формулы (IV)



определенной выше;

c) по меньшей мере одного соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок; и

d) необязательно стероида; и

e) необязательно нейтрального липида;

(ii) солюбилизации катионного липида и/или конъюгата PEG-липид и необязательно нейтрального липида и/или стероида или производного стероида в этаноле;

(iii) смешивания этанольного раствора липидов с водным раствором, содержащим полинуклеотид мРНК;

(iv) удаления этанола с образованием липидных наночастиц, инкапсулирующих полинуклеотид мРНК или связанных с ним; и необязательно

(v) отделения или очистки липидных наночастиц.

Этанол можно удалить любым подходящим способом, который не оказывает отрицательного влияния на липиды или образование липидных наночастиц. В одном варианте осуществления настоящего изобретения этанол удаляют путем диализа. В альтернативном варианте осуществления этанол удаляют путем диалфильтрации.

Отделение и необязательную очистку липидных наночастиц также можно выполнять любым подходящим способом. Липидные наночастицы предпочтительно фильтруют, более предпочтительно липидные наночастицы отделяют или очищают посредством фильтрации через стерильный фильтр.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну липидную наночастицу в соответствии с настоящим изобретением. Липидная наночастица может содержать соединение мРНК, содержащее последовательность, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, определенный в данном документе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность мРНК кодирует один антигенный пептид или белок. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность мРНК кодирует более одного антигенного пептида или белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит липидную наночастицу в соответствии с настоящим изобретением, где липидная наночастица содержит более одного соединения мРНК, каждое из которых содержит отличную от других последовательность

мРНК, кодирующую антигенный пептид или белок.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит вторую липидную наночастицу, где соединение мРНК, содержащееся во второй липидной наночастице, отличается от соединения мРНК, содержащегося в первой липидной наночастице.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей липидные наночастицы, содержащие мРНК, где мРНК содержит последовательность мРНК, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, определенную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Композиция в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представлена в виде фармацевтической композиции или в виде вакцины.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления (фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая область по меньшей мере одной последовательности мРНК кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, предпочтительно из любого из белков гемагглютинаина (НА) или нейраминидазы (NA) или гликопротеинов, раскрытых в перечне последовательностей в настоящем изобретении или соответственно в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любого из этих белков.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в по меньшей мере одной последовательности мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа, предпочтительно из любого из белков гемагглютинаина (НА) или нейраминидазы (NA), определенных в перечне последовательностей или соответственно в табл. 1-4 или на фиг. 20-23 в РСТ/EP2016/075843, или его фрагмент или вариант, или состоит из нее, где белок, полученный из белка вируса гриппа, предпочтительно содержит любую из аминокислотных последовательностей, определенных в перечне последовательностей или соответственно в табл. 1-4 или на фиг. 20-23 в РСТ/EP2016/075843, предпочтительно под SEQ ID NO: 1-30504 в перечне последовательностей или соответственно в табл. 1-4 или на фиг. 20-23 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них. В качестве альтернативы, антигенный пептид или белок получен из вируса бешенства, предпочтительно из гликопротеина вируса бешенства, предпочтительно содержащего любую из аминокислотных последовательностей, раскрытых в перечне последовательностей или соответственно в табл. 5 или на фиг. 24 в РСТ/EP2016/075843, предпочтительно под SEQ ID NO: 30505-32012 в перечне последовательностей, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоящего из них.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в последовательности мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, или состоит из нее, где антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в перечне последовательностей, предпочтительно под SEQ ID NO: 1-32012, или соответственно в "столбце А" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением более предпочтительно содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в по меньшей мере одной последовательности мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, или состоит из нее, где антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в перечне последовательностей, предпочтительно под SEQ ID NO: 1-32012, или соответственно в "столбце А" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фраг-

мент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В предпочтительных вариантах осуществления (фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в по меньшей мере одной последовательности мРНК содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, предпочтительно под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или в столбцах "B" или "C" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с другим вариантом осуществления (фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в по меньшей мере одной последовательности мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, 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% идентичностью последовательности с любой из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, предпочтительно под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или соответственно в "столбце B" или "столбце C" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления (фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в по меньшей мере одной последовательности мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с любой из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, предпочтительно под SEQ ID NO: 32013-64024 или SEQ ID NO: 64025-224084, или соответственно в "столбце B" или "столбце C" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением более предпочтительно содержит липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную выше, где по меньшей мере одна кодирующая последовательность в по меньшей мере одной последовательности мРНК содержит любую из последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в перечне последовательностей, или соответственно в "столбце C" в табл. 1-5 или на фиг. 20-24 в РСТ/EP2016/075843, или под SEQ ID NO: 64025-224084, или фрагмент или вариант любой из этих последовательностей или состоит из них.

В контексте настоящего изобретения (фармацевтическая) композиция или вакцина может содержать липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат мРНК, кодирующую один или несколько антигенных пептидов или белков, определенных в данном документе, предпочтительно полученных из белка вируса гриппа или вируса бешенства, определенных в данном документе, или их фрагмент или вариант.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением может, таким образом, содержать липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одну мРНК, содержащую по меньшей мере одну последовательность мРНК, содержащую по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или вируса бешенства, или его фрагмент или вариант, где по меньшей мере одна кодирующая область по меньшей мере одной последовательности мРНК кодирует один конкретный антигенный пептид или белок, например, полученный из белка вируса гриппа, определенного в данном документе, или его фрагмент или вариант.

В качестве альтернативы, (фармацевтическая) композиция или вакцина согласно настоящему изобретению может содержать липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат по меньшей мере одно соединение мРНК, содержащее по меньшей мере одну последовательность мРНК в соответствии с настоящим изобретением, где по меньшей мере одна последовательность мРНК кодирует по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать различных антигенных пептидов или белков, например, полученных из белка вируса гриппа, определенного в данном документе, или их фрагмент или вариант.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы по меньшей мере одно соединение мРНК, содержащееся в (фармацевтической) композиции или вакцине, представляло собой би- или полидис-

тронную мРНК, определенную в данном документе, которая кодирует по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать различных антигенных пептидов или белков, например, полученных из белка вируса гриппа. Также предусмотрены комбинации этих вариантов осуществления, такие как композиции, содержащие более одной последовательности мРНК, где по меньшей мере одна последовательность мРНК может являться моноцистронной, тогда как по меньшей мере одна другая последовательность мРНК может являться би- или полицистронной.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно по меньшей мере одна кодирующая последовательность в последовательности мРНК, содержащаяся в ней, может, таким образом, содержать любую комбинацию последовательностей нуклеиновых кислот, определенных в данном документе.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина предпочтительно содержит липидную наночастицу, содержащую мРНК, которая содержит множество последовательностей мРНК в соответствии с настоящим изобретением или более одной такой последовательности, где каждая последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа, или его фрагмент или вариант.

В особенно предпочтительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 или 100 различных последовательностей мРНК, каждая из которых кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или его фрагмента или варианта, определенного выше, предпочтительно полученный из гемагглютинина (HA) или нейраминидазы (NA) вируса гриппа или их фрагмента или варианта.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления композиция содержит 4 различных последовательности мРНК, каждая из которых кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из белка вируса гриппа или его фрагмента или варианта, определенного выше, предпочтительно полученный из гемагглютинина (HA) или нейраминидазы (NA) вируса гриппа или их фрагмента или варианта.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы каждая последовательность мРНК кодировала по меньшей мере один отличный от других антигенный пептид или белок, полученный из белков одного и того же патогена, например, вируса гриппа, при этом особенно предпочтительно, чтобы антигенные пептиды или белки были получены из различных белков одного и того же патогена, например, вируса гриппа. Композиция предпочтительно содержит по меньшей мере две последовательности мРНК, где по меньшей мере одна последовательность мРНК кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) вируса гриппа, и по меньшей мере одна последовательность мРНК кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) того же самого вируса гриппа.

В другом предпочтительном варианте осуществления каждая последовательность мРНК кодирует по меньшей мере один отличный от других антигенный пептид или белок, полученный из белков различных патогенов, например, вирусов гриппа. Каждая последовательность мРНК предпочтительно кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA) различных вирусов гриппа.

(Фармацевтическая) композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит множество последовательностей мРНК, каждая из которых кодирует по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA) вируса гриппа, где по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 или 100 различных вирусов гриппа, кодируется множеством последовательностей мРНК.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы (фармацевтическая) композиция или вакцина содержала по меньшей мере одну липидную наночастицу, содержащую мРНК, которая содержит соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа A H1, предпочтительно из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA), по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа A H3, предпочтительно из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA), по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа A H5, предпочтительно из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA), и необязательно по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа A H7, предпочтительно из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA), и/или необязательно по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из белка вируса гриппа A H9, предпочтительно из гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA).

(Фармацевтическая) композиция или вакцина предпочтительно содержит по меньшей мере одну

липидную наночастицу, содержащую мРНК, которая содержит соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н1, по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н3, по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н5, и необязательно по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н7, и/или необязательно по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, предпочтительно полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н9.

В конкретном варианте осуществления (фармацевтическая) композиция или вакцина содержит по меньшей мере одну липидную наночастицу, содержащую мРНК, которая содержит соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н1Н1, по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н3Н2, по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А Н5Н1.

Дополнительно, (фармацевтическая) композиция или вакцина предпочтительно дополнительно содержит по меньшей мере одну липидную наночастицу, содержащую мРНК, которая содержит соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере одну последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА), по меньшей мере одного вируса гриппа В, инкапсулированное в липидные наночастицы, содержащие мРНК в соответствии с настоящим изобретением, или связанное с ними.

В данном контексте особенно предпочтительно, чтобы (фармацевтическая) композиция или вакцина содержала липидные наночастицы, содержащие мРНК, которые содержат мРНК, содержащую множество последовательностей мРНК, кодирующих по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 и/или А/Калифорния/7/2009, А/Гонконг/4801/2014, В/Брисбен/60/2008 и А/Вьетнам/1203/2004; или вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (Н1Н1), А/Гонконг/4801/2014 (Н3Н2), В/Брисбен/60/2008, В/Пхукет/3073/2013 и необязательно вируса, подобного А/Мичиган/45/2015 (Н1Н1)pdm09.

В более предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция или вакцина содержит по меньшей мере 4 различных последовательности мРНК, полученные из антигенов вируса гриппа, определенных выше, инкапсулированные в липидные наночастицы, содержащие мРНК в соответствии с настоящим изобретением, или связанные с ними.

Последовательность(последовательности) мРНК в данном контексте предпочтительно содержат следующие последовательности РНК из табл. 11 ("Предпочтительные последовательности РНК") или состоят из них.

Таблица 11. Предпочтительные последовательности РНК

Штамм/Организм	HA	NA
A/Нидерланды/602/2009	SEQ ID NO: 224163	SEQ ID NO: 224326
A/Калифорния/7/2009	SEQ ID NO: 224117	SEQ ID NO: 224318
A/Гонконг/4801/2014	SEQ ID NO: 224181	SEQ ID NO: 224336
A/Вьетнам/1203/2004 или A/Вьетнам/1194/2004	SEQ ID NO: 224198	SEQ ID NO: 224342 или SEQ ID NO: 224344
B/Брисбен/60/2008	SEQ ID NO: 224236	SEQ ID NO: 224348
B/Пхукет/3073/2013	SEQ ID NO: 224246	SEQ ID NO: 224350
Вирус, подобный A/Мичиган/45/2015 (H1N1)pdm09	SEQ ID NO: 224133	SEQ ID NO: 224324

В особенно предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция или вакцина представляет собой тетравалентную вакцину от гриппа, содержащую липидные наночастицы, которые содержат соединения мРНК, определенные выше.

Особенно предпочтительной в данном контексте является комбинация мРНК, кодирующих последовательности следующих белков (т.е. для получения тетравалентного коктейля):

белка HA вируса гриппа A/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13853, 13854, 13855 и 13856); и/или

белка HA вируса гриппа A/Калифорния/07/2009 (H1N1) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13836, 13837, 13838, 13839, 13840, 13841, 13842, 13843 и 13844); и/или белка HA вируса гриппа B/Пхукет/3073/2013 (EPI540671) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28530, 28531 и 28532); и/или

белка HA вируса гриппа B/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28524, 28525, 28526, 28527, 28528 и 28529).

Более особенно предпочтительной в данном контексте является комбинация мРНК, кодирующих последовательности следующих белков (т.е. для получения тривалентного коктейля):

белка NA вируса гриппа A/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26251, 26252, 26253 и 26254); и/или

белка NA вируса гриппа A/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26238, 26239, 26240, 26241, 26242 и 26243); и/или

белка NA вируса гриппа B/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30455, 30456, 30457, 30458, 30459 и 30460).

Еще более особенно предпочтительной в данном контексте является комбинация мРНК, кодирующих последовательности следующих белков (т.е. для получения тетравалентного коктейля):

белка HA вируса гриппа A/Нидерланды/602/2009 (H1N1) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13848, 13849 и 13850); и/или

белка HA вируса гриппа A/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13853, 13854, 13855 и 13856); и/или

белка HA вируса гриппа B/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28524, 28525, 28526, 28527, 28528 и 28529); и/или

белка HA вируса гриппа A/Вьетнам/1194/2004 (H5N1) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13859 и 13860).

Также особенно предпочтительной в данном контексте является комбинация мРНК, кодирующих последовательности следующих белков (т.е. для получения гептавалентного коктейля):

белка HA вируса гриппа A/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13853, 13854, 13855 и 13856); и/или

белка HA вируса гриппа A/Калифорния/07/2009 (H1N1) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13836, 13837, 13838, 13839, 13840, 13841, 13842, 13843 и 13844); и/или

белка HA вируса гриппа B/Пхукет/3073/2013 (EPI540671) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28530, 28531 и 28532); и/или

белка HA вируса гриппа B/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28524, 28525, 28526, 28527, 28528 и 28529); и/или

белка NA вируса гриппа A/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26251, 26252, 26253 и 26254); и/или

белка NA вируса гриппа A/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26238, 26239, 26240, 26241, 26242 и 26243); и/или

белка NA вируса гриппа B/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30455, 30456, 30457, 30458, 30459 и 30460).

Композиция в соответствии с настоящим изобретением также может содержать подходящие фар-

мацевтически приемлемые адъюванты и наполнители. В предпочтительных вариантах осуществления адъювант предпочтительно добавляют с целью усиления иммуностимулирующих свойств композиции. В данном контексте адъювант может пониматься как любое соединение, подходящее для содействия введению и доставке композиции в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, такой адъювант может, без ограничения, инициировать или усиливать иммунный ответ врожденной иммунной системы, т.е. неспецифический иммунный ответ. Другими словами, при введении композиции в соответствии с настоящим изобретением, как правило, инициирует адаптивный иммунный ответ в результате воздействия антигена, определенного в данном документе, или его фрагмента или варианта, кодируемых по меньшей мере одной кодирующей последовательностью мРНК в соответствии с настоящим изобретением, содержащейся в композиции согласно настоящему изобретению. Дополнительно, композиция в соответствии с настоящим изобретением может вызывать (поддерживающий) врожденный иммунный ответ вследствие добавления адъюванта, определенного в данном документе, в композицию в соответствии с настоящим изобретением.

Такой адъювант может быть выбран из любого адъюванта, известного специалисту в данной области и подходящего для рассматриваемого случая, т.е. содействующего индукции иммунного ответа у млекопитающего. Адъювант предпочтительно может быть выбран из группы, состоящей из, без ограничения, TDM, MDP, мурамилдипептида, плороников, раствора квасцов, гидроксида алюминия, ADJUMERTM (полифосфазена); алюмофосфатного геля; глюканов водорослей; альгаммулина; алюмогидроксидного геля (квасцов); алюмогидроксидного геля с высокой адсорбцией белка; алюмогидроксидного геля с низкой вязкостью; AF или SPT (эмульсии сквалана (5%), Tween 80 (0,2%), Pluronic L121 (1,25%), фосфатно-солевого буферного раствора, pH 7,4); AVRIDINETM (пропандиамина); BAY R1005TM (гидроацетата N-(2-дезоксид-2-L-лейциламино-b-D-глюкопиранозил)-N-октадецилдодеканоиламида); CALCITRIOLTM (1-альфа,25-дигидроксивитамина D3); кальций-фосфатного геля; CAPTM (наночастиц фосфата кальция); холерного холотоксина, слитого белка A1-субъединица холерного токсина-D-фрагмент белка A, B-субъединицы холерного токсина; CRL 1005 (блок-сополимера P1205); липосом, содержащих цитокины; DDA (бромид диметилдиоктадециламмония); DHEA (дегидроэпиандростерона); DMPC (димиристоилфосфатидилхолина); DMPG (димиристоилфосфатидилглицерина); комплекса DOC/квасцы (натриевой соли дезоксихолевой кислоты); полного адъюванта Фрейнда; неполного адъюванта Фрейнда; гамма-инулина; адъюванта Gerbu (смеси i) N-ацетилглюкозаминил-(P1-4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутамин (GMDP), ii) хлорида диметилдиоктадециламмония (DDA), iii) комплекса цинковой соли L-пролина (ZnPro-8)); GM-CSF; GMDP (N-ацетилглюкозаминил-(b1-4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин); имиквимод (1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-4-амин); ImmTherTM (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Ala-D-изо-Glu-L-Ala-глицерилдипальмитата); DRV (иммунолипосом, образованных из везикул, полученных методом дегидратации/регидратации); интерферона гамма; интерлейкина-1 бета; интерлейкина-2; интерлейкина-7; интерлейкина-12; ISCOMSTM; ISCOMPREP 7.0.3.TM; липосом; LOXORIBINETM (7-аллил-8-оксогуанозина); адъюванта LT для перорального введения (лабильного энтеротоксина-протоксина E. coli); микросфер и микрочастиц любого состава; MF59TM (водной эмульсии сквалена); MONTANIDE ISA 51TM (очищенного неполного адъюванта Фрейнда); MONTANIDE ISA 720TM (адъюванта на основе метаболизируемого масла); MPLTM (3-Q-дезацил-4'-монофосфориллипида A); MTP-PE и липосом с MTP-PE ((N-ацетил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1,2-дипальмитойл-sn-глицеро-3-(гидроксифосфорилокси))-этиламида, моносодовой соли); MURAMETIDETM (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURAPALMITINETM и D-MURAPALMITINETM (Nac-Mur-L-Thr-D-изо-Gln-sn-дипальмитойлглицерина); NAGO (смеси нейраминидазы и галактозооксидазы); наносфер или наночастиц любого состава; NISV (везикул из неионогенных поверхностно-активных веществ); PLEURANTM (β -глюкана); PLGA, PGA и PLA (гомо- и сополимеров молочной кислоты и гликолевой кислоты; микросфер/наносфер); PLURONIC L121TM; PMMA (полиметилметакрилата); PODDSTM (протеноидных микросфер); карбаматных производных полиэтилена; поли-rA:поли-rU (комплекса полиадениловой кислоты и полиуридиловой кислоты); полисорбата 80 (Tween 80); белоксодержащих кохлеатов (Avanti Polar Lipids, Inc., Алабастер, Алабама); STIMULONTM (QS-21); Quil-A (сапонина Quil-A); S-28463 (4-амино- α,α -диметил-2-этоксиметил-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-1-этанола); SAF-1TM ("адъювантного состава Syntex"); протеолипосом, слитых с вирусом Сендай, и липидных матриц, содержащих вирус Сендай; Span-85 (сорбитантриолеата); Specol (эмульсии Marcol 52, Span 85 и Tween 85); сквалена или Robane® (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракозана и 2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексана); стеарилтирозина (гидрохлорида октадецилтирозина); Theramid® (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-Ala-D-изо-Glu-L-Ala-дипальмитоксипропиламида); треонил-MDP (TermurtideTM или [thr 1]-MDP; N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин); частиц Ty (Ty-VLP или вирусоподобных частиц); липосом Уолтера Рида (липосом, содержащих липид A, адсорбированный на гидроксиде алюминия) и липопептидов, в том числе Pam3Cys, в частности солей алюминия, таких как Adju-phos, Alhydrogel, Rehydralgel; эмульсий, в том числе CFA, SAF, IFA, MF59, Provax, TiterMax, Montanide, Vaxfectin; сополимеров, в том числе Optivax (CRL1005), L121, Poloxamer 4010 и т.д.; липосом, в том числе липосом-невидимок, кохлеатов, в том числе BIORAL; адъювантов растительного происхожде-

ния, в том числе QS21, Quil A, Iscomatrix, ISCOM; адъювантов, подходящих для костимуляции, в том числе томатина, биополимеров, в том числе PLG, PMM, инулина; адъювантов микробного происхождения, в том числе ромуртида, DETOX, MPL, CWS, маннозы, CpG-содержащих последовательностей нуклеиновых кислот, CpG7909, лигандов TLR 1-10 человека, лигандов TLR 1-13 мыши, ISS-1018, IC31, имидазохинолинов, Ampligen, Ribi529, IMOxine, IRIV, VLP, холерного токсина, термолабильного токсина, Pam3Cys, флагеллина, GPI-якоря, LNFPIII/антигена X системы Льюис, противомикробных пептидов, UC-1V150, слитого белка RSV, cdiGMP и адъювантов, подходящих в качестве антагонистов, в том числе нейропептида CGRP.

Адъювант особенно предпочтительно может быть выбран из адъювантов, которые содействуют индукции иммунного ответа Th1-типа или созреванию "необученных" Т-клеток, таких как GM-CSF, IL-12, IFN γ , любой иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты, определенной выше, предпочтительно иммуностимулирующей РНК, CpG-содержащей ДНК и т.д.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления также возможно, чтобы композиция в соответствии с настоящим изобретением содержала, помимо мРНК, обеспечивающей образование антигена, дополнительные компоненты, выбранные из группы, включающей дополнительные антигены (например, в форме пептида или белка) или дополнительные нуклеиновые кислоты, кодирующие антигены; дополнительное иммунотерапевтическое средство; одно или несколько вспомогательных веществ или любое дополнительное соединение, известное как иммуностимулирующее благодаря его свойству связывания (в качестве лигандов) с Toll-подобными рецепторами человека; и/или адъювантную нуклеиновую кислоту, предпочтительно иммуностимулирующую РНК (isRNA).

Композиция согласно настоящему изобретению при необходимости может дополнительно содержать одно или несколько вспомогательных веществ для увеличения ее иммуногенности или иммуностимулирующей способности. Тем самым предпочтительно достигается синергическое действие мРНК, определенной в данном документе, и вспомогательного вещества, которое может необязательно содержаться в композиции в соответствии с настоящим изобретением. В этом отношении в зависимости от различных типов вспомогательных веществ можно принимать во внимание различные механизмы. Например, соединения, обеспечивающие созревание дендритных клеток (DC), например, липополисахариды, TNF-альфа или лиганд для CD40, образуют первый класс подходящих вспомогательных веществ. В большинстве случаев в качестве вспомогательного вещества возможно применять любое средство, влияющее на иммунную систему наподобие "сигнала опасности" (LPS, GP96 и т.д.), или цитокины, такие как GM-CSF, которые обеспечивают возможность усиления иммунного ответа и/или целенаправленного влияния на него. Особенно предпочтительными вспомогательными веществами являются цитокины, такие как монокины, лимфокины, интерлейкины или хемокины, которые дополнительно стимулируют врожденный иммунный ответ, 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, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-бета или TNF-альфа, факторы роста, такие как hGH.

Подходящие адъюванты могут, кроме того, быть выбраны из нуклеиновых кислот, характеризующихся формулой GIXmGn, где G представляет собой гуанозин, урацил или аналог гуанозина или урацила; X представляет собой гуанозин, урацил, аденозин, тимидин, цитозин или аналог вышеуказанных нуклеотидов; l представляет собой целое число от 1 до 40, где если l=1, то G представляет собой гуанозин или его аналог, если l>1, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой гуанозин или его аналог; m представляет собой целое число и равняется по меньшей мере 3; где если m=3, то X представляет собой урацил или его аналог, если m>3, то встречаются по меньшей мере 3 последовательно расположенных урациловых нуклеотида или аналога урациловых нуклеотидов; n представляет собой целое число от 1 до 40, где если n=1, то G представляет собой гуанозин или его аналог, если n>1, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой гуанозин или его аналог, или формулой: (NuGIXmGnNv)a, где G представляет собой гуанозин (гуанин), уридин (урацил) или аналог гуанозина (гуанина) или уридина (урацила), предпочтительно гуанозин (гуанин) или его аналог; X представляет собой гуанозин (гуанин), уридин (урацил), аденозин (аденин), тимидин (тимин), цитидин (цитозин) или аналог этих нуклеотидов (нуклеозидов), предпочтительно уридин (урацил) или его аналог; N представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую длину, составляющую приблизительно 4-50, предпочтительно приблизительно 4-40, более предпочтительно приблизительно 4-30 или 4-20 нуклеиновых кислот, при этом каждый N независимо выбран из гуанозина (гуанина), уридина (урацила), аденозина (аденина), тимидина (тимина), цитидина (цитозина) или аналога этих нуклеотидов (нуклеозидов); a представляет собой целое число от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 15, наиболее предпочтительно от 1 до 10; l представляет собой целое число от 1 до 40, где если l=1, то G представляет собой гуанозин (гуанин) или его аналог, если l>1, то по меньшей мере 50% этих нуклеотидов (нуклеозидов) представляют собой гуанозин (гуанин) или его аналог; m представляет собой целое число и равняется по меньшей мере 3; где если m=3, то X представляет собой уридин (урацил) или его аналог, а если m>3, то встречаются по меньшей мере 3 последовательно расположенных уридиновых (урациловых) нуклеотида (нуклеозидов) или аналога уридиновых (урациловых) нуклеотидов (нуклеозидов); n представляет собой

целое число от 1 до 40, где если $n=1$, то G представляет собой гуанозин (гуанин) или его аналог, если $n>1$, то по меньшей мере 50% этих нуклеотидов (нуклеозидов) представляют собой гуанозин (гуанин) или его аналог; u, v независимо друг от друга могут представлять собой целые числа от 0 до 50, при этом предпочтительно где $u=0$, $v\geq 1$ или где $v=0$, $u\geq 1$; где молекула нуклеиновой кислоты формулы $(NuGlXmGnNv)_a$ имеет длину, составляющую по меньшей мере 50 нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 100 нуклеотидов, более предпочтительно по меньшей мере 150 нуклеотидов, еще более предпочтительно по меньшей мере 200 нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 250 нуклеотидов.

Другие подходящие адъюванты могут, кроме того, быть выбраны из нуклеиновых кислот, характеризующихся формулой $CIXmCn$, где C представляет собой цитозин, урацил или аналог цитозина или урацила; X представляет собой гуанозин, урацил, аденозин, тимидин, цитозин или аналог вышеуказанных нуклеотидов; l представляет собой целое число от 1 до 40, где если $l=1$, то C представляет собой цитозин или его аналог, если $l>1$, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой цитозин или его аналог; m представляет собой целое число и равняется по меньшей мере 3; где если $m=3$, то X представляет собой урацил или его аналог, если $m>3$, то встречаются по меньшей мере 3 последовательно расположенных урациловых нуклеотида или аналога урациловых нуклеотидов; n представляет собой целое число от 1 до 40, где если $n=1$, то C представляет собой цитозин или его аналог, если $n>1$, то по меньшей мере 50% нуклеотидов представляют собой цитозин или его аналог.

В данном контексте раскрытие WO 2008/014979 и WO 2009/095226 также включено в данный документ посредством ссылки.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении представлена вакцина, в основе которой лежат липидные наночастицы, содержащие мРНК, в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат по меньшей мере одно соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, содержащую кодирующую область, определенную в данном документе. Вакцина в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой (фармацевтическую) композицию, определенную в данном документе.

Соответственно, в основе вакцины в соответствии с настоящим изобретением лежат те же компоненты, что и в (фармацевтической) композиции, описанной в данном документе. В такой степени это может относиться к описанию (фармацевтической) композиции, представленному в данном документе. Вакцина в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит липидные наночастицы, содержащие по меньшей мере одну мРНК, которые содержат по меньшей мере одну последовательность мРНК, определенную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В вариантах осуществления, в которых вакцина содержит более одной последовательности мРНК (как, например, множество последовательностей РНК в соответствии с настоящим изобретением, где каждая из них предпочтительно кодирует отличный от других антигенный пептид или белок), инкапсулированной в липидные наночастицы, содержащие мРНК, вакцина может быть представлена в физически разделенной форме и может вводиться в ходе отдельных стадий введения. Вакцина в соответствии с настоящим изобретением может соответствовать (фармацевтической) композиции, описанной в данном документе, особенно в тех случаях, когда последовательности мРНК представлены в одной-единственной композиции. Однако вакцина в соответствии с настоящим изобретением также может быть представлена физически разделенной. Например, в вариантах осуществления, в которых вакцина содержит более одной последовательности/молекулы мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы, содержащие мРНК, определенные в данном документе, эти молекулы РНК могут быть представлены таким образом, чтобы были представлены, например, две, три, четыре, пять или шесть отдельных композиций, каждая из которых может содержать по меньшей мере одну молекулу/последовательность мРНК (например, три различных молекулы/последовательности мРНК), каждая из которых кодирует отличный от других антигенный пептид или белок, которые могут быть или могут не быть объединены. Вакцина в соответствии с настоящим изобретением также может представлять собой комбинацию по меньшей мере из двух различных композиций, при этом каждая композиция содержит по меньшей мере одну мРНК, кодирующую по меньшей мере один из антигенных пептидов или белков, определенных в данном документе. В качестве альтернативы, вакцина может быть представлена в виде комбинации по меньшей мере из одной мРНК, предпочтительно по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести или более мРНК, каждая из которых кодирует один из антигенных пептидов или белков, определенных в данном документе. Вакцину можно объединить с получением одной-единственной композиции до ее применения, или ее можно применять таким образом, чтобы для введения различных последовательностей/молекул мРНК, кодирующих любой из антигенных пептидов или белков, инкапсулированных в липидные наночастицы, содержащие мРНК, определенные в данном документе, требовалось более одного введения. Если вакцина содержит липидные наночастицы, содержащие по меньшей мере одну мРНК, как правило, содержащие по меньшей мере две последовательности мРНК, кодирующие комбинации антигенов, определенные в данном документе, то ее можно, например, вводить за одно-единственное введение (при объединении всех молекул/последовательностей мРНК), за по меньшей мере два отдельных введения. Соответственно; любая комбинация моно-, би- или полицистронных мРНК, кодирующих по меньшей мере один антигенный пептид или белок или любую

комбинацию антигенов, определенных в данном документе (и необязательно дополнительных антигенов), представленная в виде отдельных структурных единиц (содержащих одну молекулу мРНК) или в виде объединенной структурной единицы (содержащей более одной молекулы мРНК), понимается как вакцина в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления вакцины в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере один антиген, предпочтительно комбинация, определенная в данном документе, по меньшей мере из двух, трех, четырех, пяти, шести или более антигенов, кодируемых композицией в соответствии с настоящим изобретением как единое целое, представлены в виде отдельной (моноцистронной) мРНК, которую вводят в отдельности.

Как и в случае с (фармацевтической) композицией в соответствии с настоящим изобретением, структурные единицы вакцины могут быть представлены в жидкой и/или в сухой (например, лиофилизированной) форме. Они могут содержать дополнительные компоненты, в частности дополнительные компоненты, обеспечивающие возможность ее фармацевтического применения. Вакцина или (фармацевтическая) композиция может, например, дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, и/или дополнительные вспомогательные вещества и добавки, и/или адъюванты.

Вакцина или (фармацевтическая) композиция, как правило, содержит безопасное и эффективное количество соединения мРНК в соответствии с настоящим изобретением, определенного в данном документе, кодирующего антигенный пептид или белок, определенный в данном документе, или его фрагмент или вариант или комбинацию антигенов, инкапсулированного в липидные наночастицы и/или связанного с ними. Как используется в данном документе, "безопасное и эффективное количество" означает количество мРНК, достаточное для значительного индуцирования положительного изменения в отношении рака или заболевания или нарушения, связанных с раком. В то же время, однако, "безопасное и эффективное количество" является достаточно небольшим для того, чтобы избежать серьезных побочных эффектов, иными словами, для обеспечения разумного соотношения между пользой и риском. Определение этих пределов, как правило, находится в рамках здравого медицинского суждения. Применительно к вакцине или (фармацевтической) композиции согласно настоящему изобретению выражение "безопасное и эффективное количество" предпочтительно означает количество мРНК (и, соответственно, кодируемого антигена), подходящее для стимуляции адаптивной иммунной системы таким образом, чтобы не достигались избыточные или повреждающие иммунные реакции, но при этом также предпочтительно не наблюдались такие иммунные реакции ниже измеримого уровня. Такое "безопасное и эффективное количество" мРНК в (фармацевтической) композиции или вакцине, определенной в данном документе, может быть, кроме того, выбрано в зависимости от типа мРНК, например моноцистронной, би- или даже полицистронной мРНК, поскольку применение би-или даже полицистронной мРНК может приводить к значительно более высокому уровню экспрессии кодируемого(кодируемых) антигена(антигенов), чем применение равного количества моноцистронной мРНК. "Безопасное и эффективное количество" мРНК в (фармацевтической) композиции или вакцине, определенной выше, будет, кроме того, варьироваться с учетом конкретного состояния, подлежащего лечению, а также возраста и физического состояния пациента, подлежащего лечению, степени тяжести состояния, продолжительности лечения, природы сопутствующей терапии, конкретного применяемого фармацевтически приемлемого носителя и подобных факторов в рамках знаний и опыта сопровождающего врача. Вакцину или композицию в соответствии с настоящим изобретением можно применять в соответствии с настоящим изобретением для целей медицины человека, а также ветеринарной медицины в качестве фармацевтической композиции или в качестве вакцины.

В предпочтительном варианте осуществления липидная наночастица, содержащая мРНК, в (фармацевтической) композиции, вакцине или наборе из частей в соответствии с настоящим изобретением представлена в лиофилизированной форме. Лيوфилизированные липидные наночастицы, содержащие мРНК, перед введением предпочтительно разводят в подходящем буфере, преимущественно на основе водного носителя, например, в лактатном растворе Рингера, растворе Рингера, фосфатно-буферном растворе. В предпочтительном варианте осуществления (фармацевтическая) композиция, вакцина или набор из частей в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять, шесть или более соединений мРНК, которые могут быть представлены в виде одной молекулы в липидных наночастицах или в виде отдельных молекул в каждой LNP, необязательно в лиофилизированной форме (необязательно вместе с по меньшей мере одной дополнительной добавкой), и которые предпочтительно разводят по отдельности в подходящем буфере (таком как лактатный раствор Рингера) перед их применением для того, чтобы обеспечить возможность отдельного введения каждой из (моноцистронных) мРНК.

Вакцина или (фармацевтическая) композиция в соответствии с настоящим изобретением может, как правило, содержать фармацевтически приемлемый носитель. Выражение "фармацевтически приемлемый носитель", используемое в данном документе, предпочтительно включает жидкую или нежидкую основу вакцины в соответствии с настоящим изобретением. Если вакцина в соответствии с настоящим изобретением представлена в жидкой форме, то носитель будет представлять собой воду, как правило, апиrogenную воду; изотонический солевой раствор или буферные (водные) растворы, например, фосфатные, цит-

ратные и т.д. буферные растворы. В частности, для инъекции вакцины в соответствии с настоящим изобретением можно использовать воду или предпочтительно буфер, более предпочтительно водный буфер, содержащий соль натрия, предпочтительно по меньшей мере 50 мМ соли натрия, соль кальция, предпочтительно по меньшей мере 0,01 мМ соли кальция, и необязательно соль калия, предпочтительно по меньшей мере 3 мМ соли калия. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления соли натрия, кальция и необязательно калия могут встречаться в форме их галогенидов, например, хлоридов, йодидов или бромидов, в форме их гидроксидов, карбонатов, гидрокарбонатов или сульфатов и т.д. Примеры солей натрия включают без ограничения, например, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, примеры необязательных солей калия включают, например, KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, а примеры солей кальция включают, например, CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. Кроме того, в буфере могут содержаться органические анионы вышеуказанных катионов. В соответствии с более предпочтительным вариантом осуществления буфер, подходящий для целей инъекции, определенный выше, может содержать соли, выбранные из хлорида натрия (NaCl), хлорида кальция (CaCl₂) и необязательно хлорида калия (KCl), где в дополнение к хлоридам могут присутствовать дополнительные анионы. CaCl₂ также может быть заменен другой солью, такой как KCl. Как правило, соли в буфере для инъекций присутствуют в концентрации, составляющей по меньшей мере 50 мМ хлорида натрия (NaCl), по меньшей мере 3 мМ хлорида калия (KCl) и по меньшей мере 0,01 мМ хлорида кальция (CaCl₂). Буфер для инъекций может быть гипертоническим, изотоническим или гипотоническим по отношению к конкретной эталонной среде, т.е. буфер может иметь более высокое, идентичное или более низкое содержание солей относительно конкретной эталонной среды, где предпочтительно можно использовать такие концентрации вышеуказанных солей, которые не приводят к повреждению клеток вследствие осмоса или других концентрационных эффектов. Эталонные среды представляют собой, например, жидкости, используемые в способах "in vivo", такие как кровь, лимфа, цитозольные жидкости или другие биологические жидкости, или, например, жидкости, которые можно использовать в качестве эталонных сред в способах "in vitro", такие как общепринятые буферы или жидкости. Такие общепринятые буферы или жидкости известны специалисту в данной области.

Однако также можно использовать один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей или разбавителей или инкапсулирующих соединений, которые подходят для введения человеку. Термин "совместимый", используемый в данном документе, означает, что составляющие вакцины в соответствии с настоящим изобретением могут быть смешаны с мРНК в соответствии с настоящим изобретением, определенной в данном документе, таким образом, чтобы не происходило взаимодействие, которое могло бы в значительной степени снизить фармацевтическую эффективность вакцины в соответствии с настоящим изобретением в типичных условиях применения. Фармацевтически приемлемые носители, наполнители и разбавители должны, разумеется, характеризоваться достаточно высокой степенью чистоты и достаточно низкой токсичностью, что делает их подходящими для введения человеку, подлежащему лечению. Некоторыми примерами соединений, которые можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или их составляющих, являются сахара, такие как, например, лактоза, глюкоза, трегалоза и сахароза; крахмалы, такие как, например, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; декстроза; целлюлоза и ее производные, такие как, например, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этил целлюлоза, ацетилцеллюлоза; порошкообразный трагакант; солод; желатин; твердый животный жир; твердые вещества, способствующие скольжению, такие как, например, стеариновая кислота, стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как, например, арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; полиолы, такие как, например, полипропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгинатная кислота.

Выбор фармацевтически приемлемого носителя определяется в основном способом введения фармацевтической композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением. Композицию или вакцину можно вводить, например, системно или локально. Пути системного введения обычно включают, например, трансдермальный, пероральный, парентеральный пути, в том числе подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, внутрикожные и внутрибрюшинные инъекции, и/или пути интраназального введения. Пути локального введения обычно включают, например, пути местного введения, а также внутрикожные, трансдермальные, подкожные или внутримышечные инъекции или внутриочаговые, внутричерепные, внутрилегочные, внутрисердечные и сублингвальные инъекции. Композицию или вакцины в соответствии с настоящим изобретением более предпочтительно можно вводить с помощью внутрикожного, подкожного или внутримышечного путей, предпочтительно с помощью инъекции, которая может являться безыгольной и/или игольной инъекцией. Композиции/вакцины, следовательно, предпочтительно составляют в жидкой или твердой форме. Подходящее количество вакцины или композиции в соответствии с настоящим изобретением, подлежащей введению, можно определить с помощью стандартных экспериментов, например, путем использования животных моделей. Такие модели включают, не предполагая какого-либо ограничения, модели на кроликах, овцах, мышах, крысах, собаках и приматах, отличных от человека. Предпочтительные лекарственные формы с однократной дозировкой для инъекции включают стерильные водные растворы, физиологический солевой раствор или их смеси.

Значения pH таких растворов следует доводить до физиологически переносимого значения pH, такого как приблизительно 7,4. Подходящие носители для инъекции включают гидрогели, устройства для контролируемого или отсроченного высвобождения, полимолочную кислоту и коллагеновые матрицы. Подходящие фармацевтически приемлемые носители для местного применения включают носители, которые подходят для применения в лосьонах, кремах, гелях и т.п. Если композиция или вакцина в соответствии с настоящим изобретением подлежит пероральному введению, то предпочтительной лекарственной формой с однократной дозировкой являются таблетки, капсулы и т.п.

Фармацевтически приемлемые носители для получения лекарственных форм с однократной дозировкой, которые можно применять для перорального введения, широко известны из предшествующего уровня техники. Их выбор будет зависеть от вторичных критериев, таких как вкус, стоимость и пригодность к хранению, которые не являются критически важными для целей настоящего изобретения, и он может быть без труда сделан специалистом в данной области.

Вакцина или композиция в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать одно или несколько вспомогательных веществ в целях дополнительного увеличения иммуногенности. Тем самым предпочтительно достигается синергическое действие мРНК, содержащейся в композиции в соответствии с настоящим изобретением, и вспомогательного вещества, которое может необязательно быть составлено совместно с вакциной или композицией в соответствии с настоящим изобретением, описанной выше (или составлено отдельно от нее). В этом отношении в зависимости от различных типов вспомогательных веществ роль могут играть различные механизмы. Например, соединения, обеспечивающие созревание дендритных клеток (DC), например, липополисахариды, TNF-альфа или лиганд для CD40, образуют первый класс подходящих вспомогательных веществ. В большинстве случаев в качестве вспомогательного вещества возможно применять любое средство, влияющее на иммунную систему наподобие "сигнала опасности" (LPS, GP96 и т.д.), или цитокины, такие как GM-CSF, которые обеспечивают возможность усиления иммунного ответа, вызываемого иммуностимулирующим адъювантом в соответствии с настоящим изобретением, и/или целенаправленного влияния на него. Особенно предпочтительными вспомогательными веществами являются цитокины, такие как монокины, лимфокины, интерлейкины или хемокины, которые в дополнение к индукции адаптивного иммунного ответа по меньшей мере одним кодируемым антигеном стимулируют врожденный иммунный ответ, 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-альфа, IFN-бета, INF-гамма, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-бета или TNF-альфа, факторы роста, такие как hGH. Такие средства или соединения, увеличивающие иммуногенность, предпочтительно представлены в отдельности (не составлены совместно с вакциной или композицией в соответствии с настоящим изобретением) и вводятся по отдельности.

Дополнительными добавками, которые могут быть включены в вакцину или композицию в соответствии с настоящим изобретением, являются эмульгаторы, такие как, например, Tween; смачивающие средства, такие как, например, лаурилсульфат натрия; красители; средства, придающие вкус, фармацевтические носители; таблеткообразующие средства; стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты.

Вакцина или композиция в соответствии с настоящим изобретением может также дополнительно содержать любое дополнительное соединение, известное как иммуностимулирующее благодаря его сродству связывания (в качестве лигандов) с Toll-подобными рецепторами человека TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 или благодаря его сродству связывания (в качестве лигандов) с Toll-подобными рецепторами мыши TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 или TLR13.

Другим классом соединений, которые могут быть добавлены в вакцину или композицию в соответствии с настоящим изобретением в данном контексте, могут являться CpG-содержащие нуклеиновые кислоты, в частности CpG-содержащая РНК или CpG-содержащая ДНК. CpG-содержащая РНК или CpG-содержащая ДНК может представлять собой однонитевую CpG-содержащую ДНК (CpG-содержащую ssDNA), двухнитевую CpG-содержащую ДНК (dsDNA), однонитевую CpG-содержащую РНК (CpG-содержащую ssRNA) или двухнитевую CpG-содержащую РНК (CpG-содержащую dsRNA). CpG-содержащая нуклеиновая кислота предпочтительно находится в форме CpG-содержащей РНК, более предпочтительно в форме однонитевой CpG-содержащей РНК (CpG-содержащей ssRNA). CpG-содержащая нуклеиновая кислота предпочтительно содержит по меньшей мере одну или несколько (митогенных) динуклеотидных последовательностей цитозин/гуанин (CpG-мотивов). В соответствии с первой предпочтительной альтернативой по меньшей мере один CpG-мотив, содержащийся в этих последовательностях, иными словами, С (цитозин) и G (гуанин) в CpG-мотиве, является неметилованным. Все дополнительные цитозиновые или гуаниновые основания, необязательно содержащиеся в этих последовательностях, могут быть метилированными либо неметилованными. Однако в соответствии с дополнительной предпочтительной альтернативой С (цитозин) и G (гуанин) в CpG-мотиве может также присутствовать в метилированной форме.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения в настоящем изобретении также представлен набор, в частности набор из частей, который содержит соединение мРНК, содержащее последо-

вательность мРНК, определенную в данном документе, и по меньшей мере один липид в соответствии с формулой (I), (II), (III) или (IV), определенной выше. В дополнительном варианте осуществления набор содержит липидную наночастицу, определенную выше, или (фармацевтическую) композицию, содержащую липидную наночастицу, определенную выше, и/или вакцину в соответствии с настоящим изобретением, необязательно жидкую инертную среду для солюбилизации и необязательно технические инструкции с информацией о введении и дозировке липидных наночастиц, содержащих мРНК, композиции и/или вакцины. Технические инструкции могут содержать информацию о введении и дозировке липидных наночастиц, содержащих мРНК, композиции и/или вакцины. Такие наборы, предпочтительно наборы из частей, можно применять, например, в любом из вышеуказанных путей или вариантов применения, предпочтительно при применении липидной наночастицы в соответствии с настоящим изобретением (для получения лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно вакцины) для лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, или заболеваний или нарушений, связанных с ними. Данные наборы также можно применять при применении липидной наночастицы, композиции или вакцины, определенной в данном документе (для получения вакцины в соответствии с настоящим изобретением), для лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, или заболеваний или нарушений, связанных с ними, где липидная наночастица, композиция и/или вакцина может быть способна индуцировать или усиливать иммунный ответ у млекопитающего, как определено выше. Такие наборы можно дополнительно применять при применении липидной наночастицы, композиции или вакцины, определенной в данном документе (для получения вакцины в соответствии с настоящим изобретением), для модулирования, предпочтительно для вызывания, например, для индукции или усиления, иммунного ответа у млекопитающего, как определено выше, и предпочтительно для содействия лечению или профилактике инфекций, вызываемых вирусом гриппа, или заболеваний или нарушений, связанных с ними. Наборы из частей в качестве специальной формы наборов могут содержать одну или несколько идентичных или различных композиций и/или одну или несколько идентичных или различных вакцин, описанных в данном документе, в различных частях набора.

Наборы из частей также могут содержать (например, одну) композицию, (например, одну) вакцину и/или липидные наночастицы, содержащие мРНК, в соответствии с настоящим изобретением в различных частях набора, при этом, например, каждая часть набора содержит липидные наночастицы, определенные в данном документе, содержащие мРНК, предпочтительно кодирующую отличный от других антиген. Набор или набор из частей предпочтительно содержит в качестве части инертную среду для солюбилизации мРНК в соответствии с настоящим изобретением, при этом инертная среда необязательно представляет собой лактатный раствор Рингера. Любой из вышеупомянутых наборов можно применять в лечении или профилактике, как определено выше.

В другом варианте осуществления данного аспекта набор в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать по меньшей мере один адъювант. В дополнительном варианте осуществления набор в соответствии с настоящим изобретением может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный фармацевтически активный компонент, предпочтительно терапевтическое соединение, подходящее для лечения и/или профилактики рака или связанного с ним нарушения. Более того, в другом варианте осуществления набор может дополнительно содержать части и/или устройства, необходимые или подходящие для введения композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением, в том числе иглы, аппликаторы, пластыри, инъекционные устройства.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению липидных наночастиц, содержащих мРНК, или фармацевтической композиции в качестве лекарственного препарата. В альтернативном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции или липида, содержащего мРНК, в изготовлении лекарственного препарата. В частности, указанный лекарственный препарат предназначен для терапевтической или профилактической индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом.

В предпочтительном варианте осуществления лекарственный препарат предназначен для предупреждения или лечения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними.

В частности, лекарственный препарат предназначен для лечения субъекта, предпочтительно позвоночного. В предпочтительном варианте осуществления субъектом является млекопитающее, предпочтительно выбранное из группы, включающей козу, крупный рогатый скот, свинью, собаку, кошку, осла, нечеловекообразную обезьяну, человекообразную обезьяну, грызуна, такого как мышь, хомяк, кролика и, в частности, человека.

В особенно предпочтительном варианте осуществления лекарственный препарат представляет собой вакцину, предпочтительно противоопухолевую вакцину, вакцину от гриппа или бешенства. В конкретном варианте осуществления лекарственный препарат представляет собой вакцину от бешенства, применяемую в лечении бешенства.

Лекарственный препарат можно вводить любым подходящим способом. Лекарственный препарат предпочтительно предназначен для парентерального введения, в частности инъекции.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу индукции иммунного ответа у субъек-

та, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту липидной наночастицы, определенной выше, или фармацевтической композиции, определенной выше.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту липидной наночастицы, определенной выше, или фармацевтической композиции, определенной выше.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения липидные наночастицы, содержащие мРНК, (фармацевтическую) композицию или вакцину можно применять в соответствии с настоящим изобретением (для получения лекарственного препарата) для лечения или профилактики раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними. В данном контексте особенно предпочтительным является лечение или профилактика инфекций, вызываемых вирусом гриппа или вирусом бешенства.

Кроме того, в настоящее изобретение также включены способы лечения или предупреждения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними, предпочтительно определенных в данном документе, посредством введения субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически эффективного количества липидных наночастиц, содержащих мРНК, (фармацевтической) композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением. Такой способ, как правило, включает необязательную первую стадию, предусматривающую получение липидных наночастиц, содержащих мРНК, композиции или вакцины согласно настоящему изобретению, и вторую стадию, предусматривающую введение (фармацевтически эффективного количества) указанной композиции или вакцины пациенту/субъекту, нуждающемуся в этом. Субъектом, нуждающимся в этом, как правило, является млекопитающее. В контексте настоящего изобретения млекопитающее предпочтительно выбрано из группы, включающей, без ограничения, например, козу, крупный рогатый скот, свинью, собаку, кошку, осла, нечеловекообразную обезьяну, человекообразную обезьяну, грызуна, такого как мышь, хомяк, кролика и, в частности, человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является птица, предпочтительно курица.

В данном контексте в настоящее изобретение предпочтительно включены способы лечения или предупреждения инфекций, вызываемых вирусом гриппа или вирусом бешенства, или нарушений, связанных с ними.

Настоящее изобретение также относится к применению липидных наночастиц, содержащих мРНК, композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно для вызывания иммунного ответа у млекопитающего, предпочтительно для лечения или профилактики раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними, предпочтительно инфекций, вызываемых вирусом гриппа или вирусом бешенства, или связанного с ними состояния, определенного в данном документе.

Настоящее изобретение, кроме того, включает применение липидных наночастиц, содержащих мРНК, (фармацевтической) композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением, определенных в данном документе, для модулирования, предпочтительно для индукции или усиления, иммунного ответа у млекопитающего, как определено в данном документе, более предпочтительно для предупреждения и/или лечения инфекций, вызываемых вирусом гриппа, или заболеваний или нарушений, связанных с ними. В данном контексте содействие лечению или профилактике инфекций, вызываемых вирусом гриппа, может представлять собой любую комбинацию традиционного способа терапии гриппа, такого как терапия противовирусными препаратами, такими как ингибиторы нейраминидазы (например, озельтамивир и занамивир) и ингибиторы белка М2 (например, производные адамантана), и терапии с помощью РНК или фармацевтической композиции, определенной в данном документе. Содействие лечению или профилактике инфекций, вызываемых вирусом гриппа, может быть также предусмотрено в любом из других вариантов осуществления, определенных в данном документе. Соответственно, любое применение липидных наночастиц, содержащих мРНК, (фармацевтической) композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением в рамках совместной терапии с любым другим подходом, предпочтительно одним или несколькими вышеупомянутыми терапевтическими подходами, в частности в комбинации с противовирусными препаратами, находится в пределах объема настоящего изобретения.

Для введения предпочтительно можно применять любой из путей введения, определенных в данном документе. В частности, применяется путь введения, подходящий для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа, определенной в данном документе, или заболеваний или нарушений, связанных с ней, посредством индукции или усиления адаптивного иммунного ответа с помощью антигена, кодируемого мРНК, содержащейся в липидных наночастицах в соответствии с настоящим изобретением. Введение композиции и/или вакцины в соответствии с настоящим изобретением может, таким образом, происходить до введения другой композиции и/или вакцины, определенной в данном документе, которая может, кроме того, содержать другую липидную наночастицу, содержащую мРНК, или липидные наночастицы, содержащие комбинацию мРНК, кодирующие другой антиген или комбинацию

антигенов, параллельно с этим и/или после этого, где каждый антиген, кодируемый последовательностью мРНК в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно подходит для лечения или профилактики инфекций, вызываемых вирусом гриппа, и заболеваний или нарушений, связанных с ними. В данном контексте лечение, определенное в данном документе, также может включать модулирование заболевания, ассоциированного с инфекцией, вызываемой вирусом гриппа, и заболеваний или нарушений, связанных с ним.

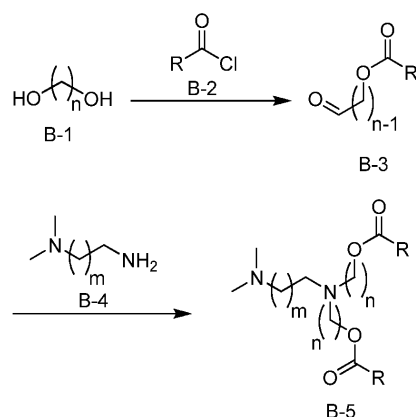
В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления данного аспекта настоящего изобретения (фармацевтическую) композицию или вакцину в соответствии с настоящим изобретением вводят с помощью инъекции. Можно использовать любую подходящую методику инъекции, известную из уровня техники. Композицию в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно вводят с помощью инъекции, предпочтительно с помощью безыгольной инъекции, например, с помощью струйной инъекции.

В одном варианте осуществления композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более мРНК, определенных в данном документе, каждая из которых предпочтительно вводится по отдельности с помощью инъекции, предпочтительно с помощью безыгольной инъекции. В качестве альтернативы, композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более мРНК, где по меньшей мере одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более мРНК предпочтительно вводятся с помощью инъекции, определенной в данном документе, в виде смеси.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу иммунизации субъекта против антигена или комбинации антигенов.

Протокол иммунизации для иммунизации субъекта против антигена или комбинации по меньшей мере из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати или более антигенов, определенных в данном документе, как правило, включает серию однократных доз или дозирования (фармацевтической) композиции или вакцины в соответствии с настоящим изобретением. Как используется в данном документе, однократное дозирование относится к начальной/первой дозе, второй дозе или соответственно любым дополнительным дозам, которые предпочтительно вводят с целью "стимуляции" иммунной реакции. В данном контексте каждое однократное дозирование предпочтительно включает введение одного и того же антигена или одной и той же комбинации антигенов, определенных в данном документе, где интервал между введением двух однократных 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 однократными дозированиями могут быть постоянными или варьироваться в течение выполнения протокола иммунизации, например, интервалы могут быть более короткими в начале и более длинными ближе к концу выполнения протокола. В зависимости от общего количества однократных дозирования и интервала между однократными дозированиями выполнение протокола иммунизации может занимать период времени, продолжительность которого составляет предпочтительно 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). Каждое однократное дозирование предпочтительно охватывает введение антигена, предпочтительно комбинации по меньшей мере из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати или более антигенов, определенных в данном документе, и может, следовательно, предусматривать по меньшей мере одну инъекцию, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 инъекций. В некоторых случаях композицию или вакцину в соответствии с настоящим изобретением вводят в качестве однократного дозирования, как правило, за одну инъекцию. В случае, когда вакцина в соответствии с настоящим изобретением содержит отдельные составы на основе мРНК, кодирующих различные антигены, определенные в данном документе, то минимальное количество инъекций, проводимых в ходе введения однократной дозы, соответствует количеству отдельных компонентов вакцины. В определенных вариантах осуществления введение однократной дозы может охватывать более одной инъекции каждого компонента вакцины (например, конкретного состава на основе мРНК, содержащего мРНК, кодирующую, например, один антигенный пептид или белок, определенный в данном документе). Например, части общего объема отдельного компонента вакцины можно инъектировать в различные части тела, что, таким образом, предусматривает более одной инъекции. В более конкретном примере однократное дозирование вакцины, содержащей четыре отдельных состава на основе мРНК, каждый из которых вводят в две разные части тела, включает восемь инъекций. Как правило, однократное дозирование включает все инъекции, требуемые для введения всех компонентов вакцины, где для одного компонента может быть предусмотрено более одной инъекции, как указано в общих чертах выше. В случае, когда введение однократной дозы вакцины в соответствии с настоящим изобретением охватывает более одной инъекции, то инъекции проводят, по сути, одновременно или параллельно, т.е., как правило, с разнесением по времени в рамках временного интервала, который требуется практикующему специалисту для проведения отдельных стадий инъекции одна за

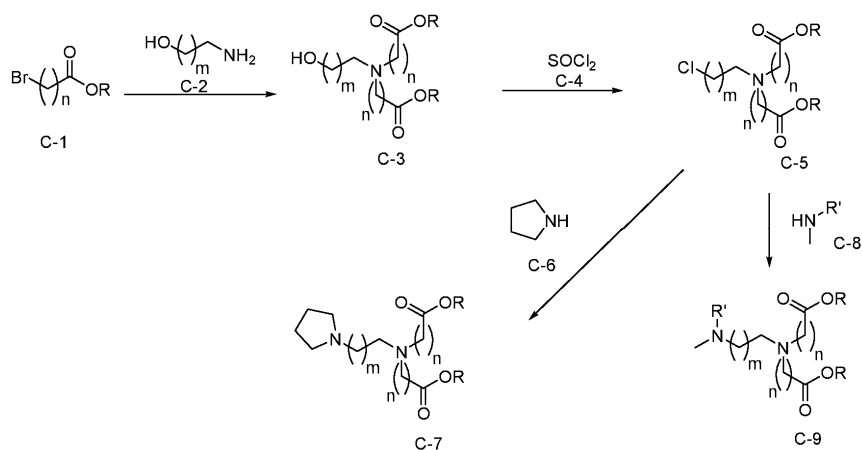
Общая схема реакций 2



Другие варианты осуществления соединения формулы (I) (например, соединение B-5) могут быть получены в соответствии с общей схемой реакций 2 ("способом B"), где R представляет собой насыщенный или ненасыщенный C_1 - C_{24} алкил или насыщенный или ненасыщенный циклоалкил, m равняется 0 или 1, и n представляет собой целое число от 1 до 24. Как показано на общей схеме реакций 2, соединения структуры B-1 могут быть приобретены из коммерческих источников или получены в соответствии со способами, знакомыми среднему специалисту в данной области. Раствор B-1 (1 эквивалент) обрабатывают хлорангидридом B-2 (1 эквивалент) и основанием (например, триэтиламино). Неочищенный продукт обрабатывают окислителем (например, хлорхроматом пиридиния) и извлекают промежуточный продукт B-3. Раствор неочищенного соединения B-3, кислоты (например, уксусной кислоты) и N,N-диметиламиноамина B-4 затем обрабатывают восстановителем (например, триацетоксиборгидридом натрия) с получением B-5 после какой-либо необходимой обработки и/или очистки.

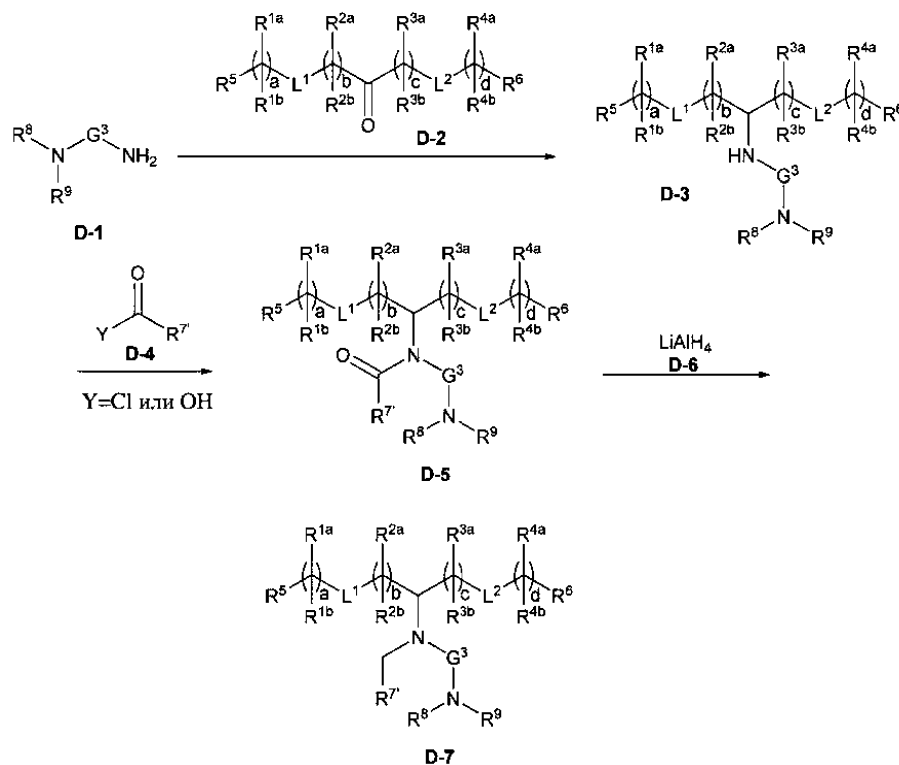
Следует отметить, что, хотя исходные материалы A-1 и B-1 изображены выше как содержащие только насыщенные метиленовые атомы углерода, исходные материалы, содержащие углерод-углеродные двойные связи, также можно использовать для получения соединений, содержащих углерод-углеродные двойные связи.

Общая схема реакций 3



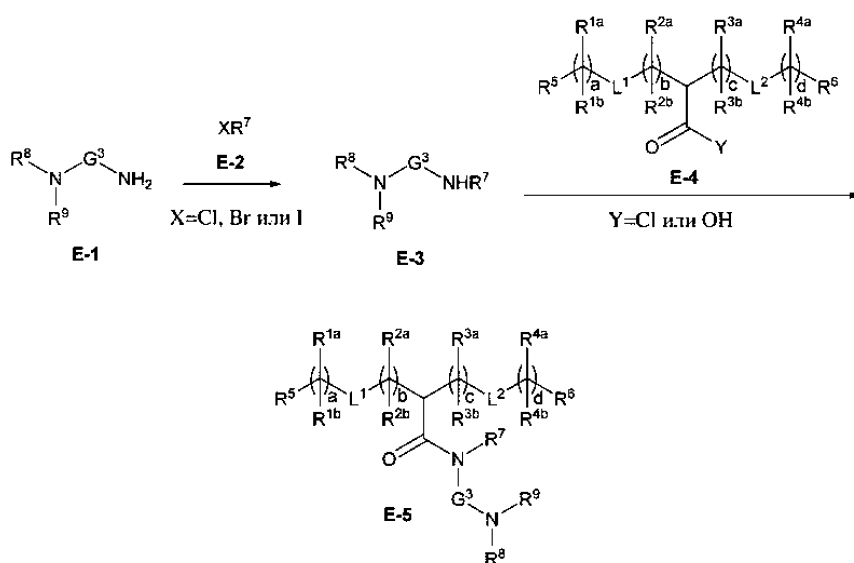
Различные варианты осуществления липида формулы (I) (например, соединения C-7 или C-9) могут быть получены в соответствии с общей схемой реакций 3 ("способом C"), где R представляет собой насыщенный или ненасыщенный C_1 - C_{24} алкил или насыщенный или ненасыщенный циклоалкил, m равняется 0 или 1, и n представляет собой целое число от 1 до 24. Как видно из общей схемы реакций 3, соединения структуры C-1 могут быть приобретены из коммерческих источников или получены в соответствии со способами, знакомыми среднему специалисту в данной области.

Общая схема реакций 4



Варианты осуществления соединения формулы (II) (например, соединения D-5 и D-7) могут быть получены в соответствии с общей схемой реакций 4 ("способом D"), где $R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R^5, R^6, R^8, R^9, L^1, L^2, G^1, G^2, G^3, a, b, c$ и d определены в данном документе, а R^7 представляет собой R^7 или C_3 - C_{19} алкил. Как видно из общей схемы реакций 1, соединения структуры D-1 и D-2 могут быть приобретены из коммерческих источников или получены в соответствии со способами, знакомыми среднему специалисту в данной области. Раствор D-1 и D-2 обрабатывают восстановителем (например, триацетоксиборгидридом натрия) с получением D-3 после какой-либо необходимой обработки. Раствор D-3 и основания (например, триметиламина, DMAP) обрабатывают хлорангидридом D-4 (или карбоновой кислотой и DCC) с получением D-5 после какой-либо необходимой обработки и/или очистки. D-5 можно восстановить с помощью $LiAlH_4$ D-6 с получением D-7 после какой-либо необходимой обработки и/или очистки.

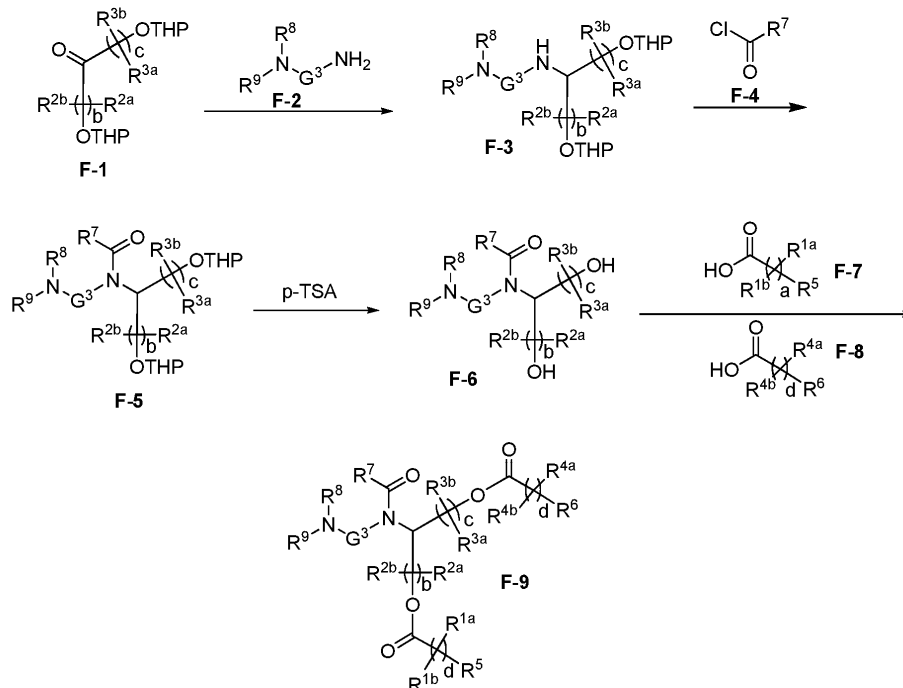
Общая схема реакций 5



Варианты осуществления липида формулы (II) (например, соединение E-5) могут быть получены в соответствии с общей схемой реакций 5 ("способом E"), где $R^{1a}, R^{1b}, R^{2a}, R^{2b}, R^{3a}, R^{3b}, R^{4a}, R^{4b}, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, L^1, L^2, G^3, a, b, c$ и d определены в данном документе. Как видно из общей схемы реакций 2, соединения структуры E-1 и E-2 могут быть приобретены из коммерческих источников или получены в

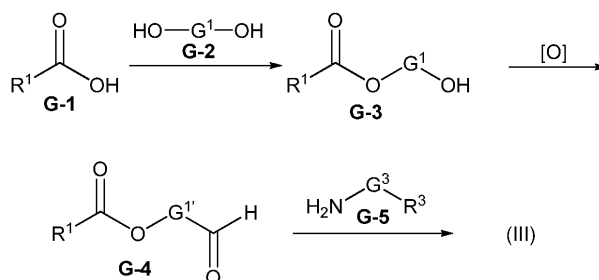
соответствии со способами, знакомыми среднему специалисту в данной области. Смесь E-1 (в избытке), E-2 и основания (например, карбоната калия) нагревают с получением E-3 после какой-либо необходимой обработки. Раствор E-3 и основания (например, триметиламина, DMAP) обрабатывают хлорангидридом E-4 (или карбоновой кислотой и DCC) с получением E-5 после какой-либо необходимой обработки и/или очистки.

Общая схема реакций 6



Другие варианты осуществления соединения формулы (II) (например, F-9) получают в соответствии с общей схемой реакций 6 (способом F). Как проиллюстрировано на общей схеме реакций 6, соответствующим образом защищенный кетон (F-1) подвергают реакции в условиях восстановительного аминирования с амином F-2 с получением F-3. В результате ацилирования F-3 хлорангидридом F-4 образуется ацилированный продукт F-5. В результате удаления защитной группы для спиртов с F-5 с последующей реакцией с F-7 и/или F-8 и подходящим активирующим реагентом (например, DCC) образуется необходимое соединение F-9.

Общая схема реакций 7



На общей схеме реакций 7 представлен иллюстративный способ (способ G) получения липидов формулы (III). G¹, G³, R¹ и R³ на общей схеме реакций 7 определены в данном документе для формулы (III), а G¹ относится к гомологу G1, более короткому на один атом углерода. Соединения структуры G-1 приобретают или получают в соответствии со способами, известными из уровня техники. В результате реакции G-1 с диолом G-2 в подходящих условиях конденсации (например, под действием DCC) образуется сложный эфир/спирт G-3, который затем можно окислить (например, под действием PCC) до альдегида G-4. В результате реакции G-4 с амином G-5 в условиях восстановительного аминирования образуется липид формулы (III).

Следует отметить, что среднему специалисту в данной области доступны различные альтернативные стратегии получения липидов формулы (III). Например, другие липиды формулы (III), где L¹ и L² являются отличными от сложного эфира, могут быть получены в соответствии с аналогичными способами при использовании соответствующего исходного материала. Кроме того, на общей схеме реакций 6 изображено получение липидов формулы (III), где G¹ и G² являются одинаковыми; однако это не является необходимым аспектом настоящего изобретения, и возможны модификации вышеуказанной схемы реакций для получения соединений, где G¹ и G² являются разными.

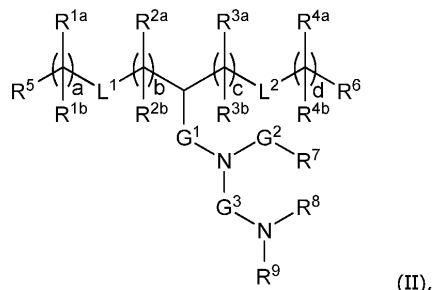
е равняется 1 или 2;

(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК необязательно не содержит модификации нуклеотида, в частности не содержит модификации азотистого основания,

где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

Пункт 2. Липидная наночастица, содержащая:

(i) катионный липид формулы II



или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $O(C=O)$, $(C=O)O$, $C(=O)$, O , $S(O)_x$, $S-S$, $C(=O)S$, $SC(=O)$, $NRaC(=O)$, $C(=O)NRa$, $NRaC(=O)NRa$, $OC(=O)NRa$, $NRaC(=O)O$ или прямую связь; G^1 представляет собой C_1 - C_2 -алкилен, $-(C=O)$, $-O(C=O)$, $SC(=O)$, $-NRaC(=O)-$ или прямую связь; G^2 представляет собой $-C(=O)$, $(C=O)O-$, $C(=O)S-$, $C(=O)NRa$ или прямую связь; G^3 представляет собой C_1 - C_6 -алкилен; R^a представляет собой H или C_1 - C_{12} -алкил;

R^{1a} и R^{1b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} -алкил; либо (b) R^{1a} представляет собой H или C_1 - C_{12} -алкил, а R^{1b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{1b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{2a} и R^{2b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} -алкил; либо (b) R^{2a} представляет собой H или C_1 - C_{12} -алкил, а R^{2b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{2b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{3a} и R^{3b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} -алкил; либо (b) R^{3a} представляет собой H или C_1 - C_{12} -алкил, а R^{3b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{3b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

R^{4a} и R^{4b} в каждом случае независимо представляют собой либо (a) H или C_1 - C_{12} -алкил; либо (b) R^{4a} представляет собой H или C_1 - C_{12} -алкил, а R^{4b} вместе с атомом углерода, с которым он связан, будучи взятым вместе со смежным R^{4b} и атомом углерода, с которым он связан, образует углерод-углеродную двойную связь;

каждый из R^5 и R^6 независимо представляет собой H или метил;

R^7 представляет собой C_4 - C_{20} -алкил;

каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой C_1 - C_{12} -алкил; или R^8 и R^9 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5-, 6- или 7-членное гетероциклическое кольцо;

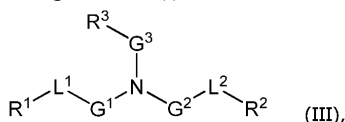
каждое из a, b, c и d независимо представляет собой целое число от 1 до 24; и

x равняется 0,1 или 2;

(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК необязательно не содержит модификации нуклеотида, в частности не содержит модификации азотистого основания;

где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

Пункт 3. Липидная наночастица, содержащая: (i) катионный липид формулы III



или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер, пролекарство или стереоизомер, где каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x-$, $-S-S-$, $C(=O)S-$, $SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a$, $-OC(=O)NR^a-$ или $NR^aC(=O)O-$, при этом L^1 или L^2 предпочтительно представляет собой $-O(C=O)-$ или $-(C=O)O-$;

каждый из G^1 и G^2 независимо представляет собой незамещенный C_1 - C_{12} -алкилен или C_1 - C_{12} -алкенилен;

G^3 представляет собой C_1 - C_{24} -алкилен, C_1 - C_{24} -алкенилен, C_3 - C_8 -циклоалкилен или C_3 - C_8 -циклоалкенилен;

R^a представляет собой H или C_1 - C_{12} -алкил;

каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой C_6 - C_{24} -алкил или C_6 - C_{24} -алкенил;

R^3 представляет собой H, OR^5 , CN, $C(=O)OR^4$, $OC(=O)R^4$ или $-NR^5C(=O)R^4$;

R^4 представляет собой C_1 - C_{12} -алкил;

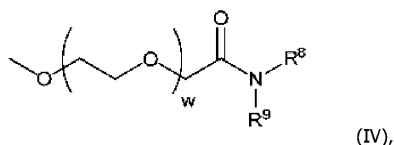
R^5 представляет собой H или C_1 - C_6 -алкил; и

x равняется 0, 1 или 2;

(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК необязательно не содержит модификации нуклеотида, в частности не содержит модификации азотистого основания;

где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

Пункт 4. Липидная наночастица, содержащая: (i) конъюгат PEG-липид формулы (IV)



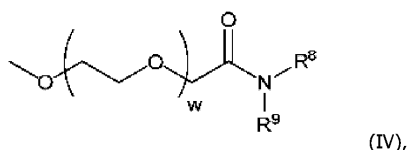
где каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 10-30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями;

и w имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60; и

(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК необязательно не содержит модификации нуклеотида, в частности не содержит модификации азотистого основания;

где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

Пункт 5. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-3, дополнительно содержащая (iii) конъюгат PEG-липид формулы (IV)



где каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную или ненасыщенную алкильную цепь, содержащую 10-30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями; и w имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60.

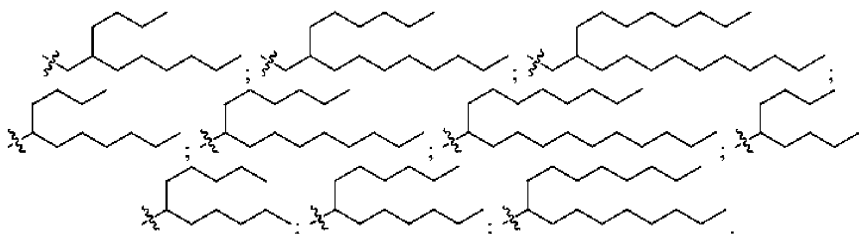
Пункт 6. Липидная наночастица в соответствии с п.3 или 5, где катионный липид представляет собой соединение формулы III, и где каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$ или $(C=O)-O-$;

G^3 представляет собой C_1 - C_{24} -алкилен или C_1 - C_{24} -алкенилен; и

R^3 представляет собой H или OR^5 .

Пункт 7. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.3, 5 или 6, где катионный липид представляет собой соединение формулы III, и где каждый из L^1 и L^2 независимо представляет собой $-O(C=O)-$ или $(C=O)-O-$;

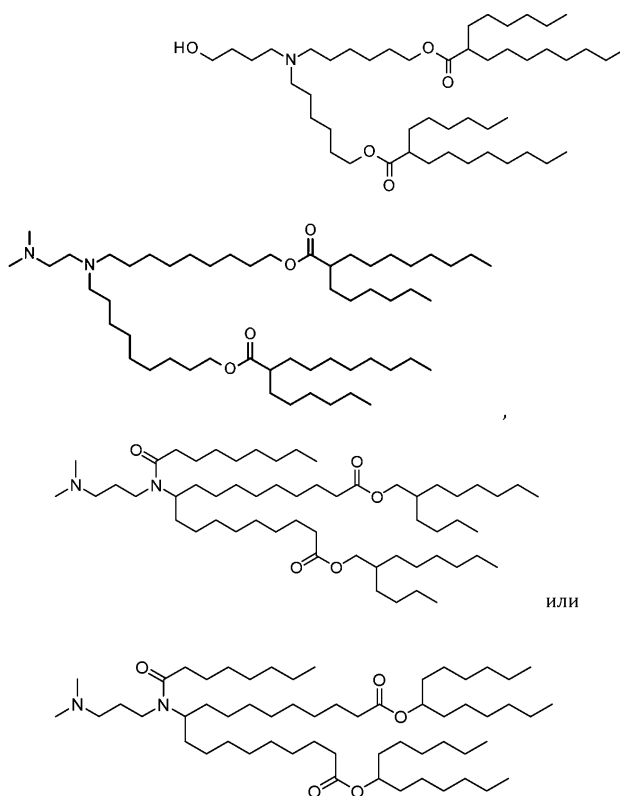
каждый из R^1 и R^2 независимо характеризуется одной из следующих структур:



Пункт 8. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.3, или 5, или 7, где катионный липид представляет собой соединение формулы III, и где R^3 представляет собой OH.

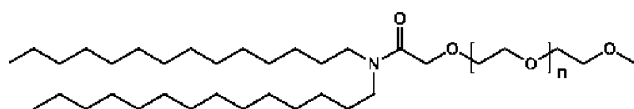
Пункт 9. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-3 или 5-8, где катионный липид выбран из структур I-1 - I-41, II-1 - II-34 или III-1 - III-36 или иллюстративных липидов формулы (I) из табл. 7, иллюстративных липидов формулы (II) из табл. 8 или иллюстративных липидов формулы (III) из табл. 9.

Пункт 10. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-3 или 5-9, где катионный липид выбран из



Пункт 11. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.4-10, где в конъюгате PEG-липид R^8 и R^9 представляют собой насыщенные алкильные цепи.

Пункт 12. Липидная наночастица в соответствии с п.11, где конъюгат PEG-липид представляет собой



где p имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60.

Пункт 13. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-12, где соединение мРНК содержит по меньшей мере одну химическую модификацию, и где соединение мРНК предпочтительно не содержит модификации нуклеозида, где указанная модификация нуклеозида необязательно представляет собой модификацию азотистого основания, и где указанная модификация азотистого основания необязательно представляет собой 1-метилпсевдоуридиновую модификацию.

Пункт 14. Липидная наночастица в соответствии с п.13, где химическая модификация выбрана из группы, включающей модификации сахарного компонента, модификации остова и липидные модификации.

Пункт 15. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-14, где последовательность мРНК представляет собой искусственную последовательность мРНК.

Пункт 16. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-15, где кодирующая область последовательности мРНК, кодирующая по меньшей мере один антигенный пептид или белок, содержит модификацию последовательности.

Пункт 17. Липидная наночастица в соответствии с п.16, где модификация последовательности выбрана из модификации содержания G/C, модификации кодонов, оптимизации кодонов или C-оптимизации последовательности.

Пункт 18. Липидная наночастица в соответствии с п.17, где содержание G/C в кодирующей области последовательности мРНК увеличено по сравнению с содержанием G/C в соответствующей кодирующей последовательности мРНК дикого типа, или где содержание C в кодирующей области последовательности мРНК увеличено по сравнению с содержанием C в соответствующей кодирующей последовательности мРНК дикого типа, или где частота использования кодонов в кодирующей области последовательности мРНК адаптирована в соответствии с частотой использования кодонов у человека, или где индекс адаптации кодонов (CAI) является увеличенным или максимально увеличенным в кодирующей области последовательности мРНК, где аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой мРНК дикого типа.

Пункт 19. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-18, где последовательность мРНК

дополнительно содержит:

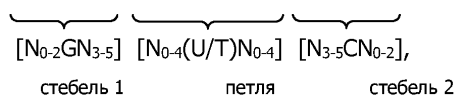
- а) 5'-кэп-структуру, и/или
- б) поли(А)-последовательность, и/или
- с) поли(С)-последовательность.

Пункт 20. Липидная наночастица в соответствии с п.19, где последовательность мРНК содержит поли(А)-последовательность, где поли(А)-последовательность предусматривает последовательность из от приблизительно 25 до приблизительно 400 аденозиновых нуклеотидов, предпочтительно последовательность из от приблизительно 50 до приблизительно 400 аденозиновых нуклеотидов, более предпочтительно последовательность из от приблизительно 50 до приблизительно 300 аденозиновых нуклеотидов, еще более предпочтительно последовательность из от приблизительно 50 до приблизительно 250 аденозиновых нуклеотидов, наиболее предпочтительно последовательность из от приблизительно 60 до приблизительно 250 аденозиновых нуклеотидов.

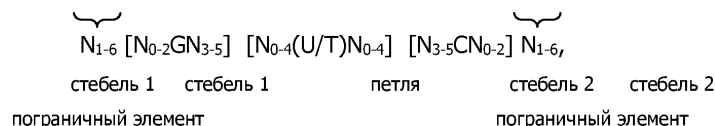
Пункт 21. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-19, где последовательность мРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК.

Пункт 22. Липидная наночастица в соответствии с п.21, где по меньшей мере одна структура типа "стебель-петля" гистоновых мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты следующих формул (V) или (VI):

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



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



где пограничные элементы N_{1-6} стебля 1 или стебля 2 представляют собой непрерывную последовательность из 1-6, предпочтительно 2-6, более предпочтительно 2-5, еще более предпочтительно 3-5, наиболее предпочтительно 4-5 или 5 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида;

стебель 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ является обратно-комплементарным или частично обратно-комплементарным элементу, представляющему собой стебель 2, и представляет собой непрерывную последовательность из 5-7 нуклеотидов;

где N_{0-2} представляет собой непрерывную последовательность из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида;

где N_{3-5} представляет собой непрерывную последовательность из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида, и последовательность петли $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ расположена между элементами, представляющими собой стебель 1 и стебель 2, и представляет собой непрерывную последовательность из 3-5 нуклеотидов, более предпочтительно из 4 нуклеотидов;

где каждый N_{0-4} независимо от других представляет собой непрерывную последовательность из 0-4, предпочтительно 1-3, более предпочтительно 1-2 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида; и

где U/T представляет собой уридин или необязательно тимидин;

стебель 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ является обратно-комплементарным или частично обратно-комплементарным элементу, представляющему собой стебель 1, и представляет собой непрерывную последовательность из 5-7 нуклеотидов;

где N_{3-5} представляет собой непрерывную последовательность из 3-5, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида;

где N_{0-2} представляет собой непрерывную последовательность из 0-2, предпочтительно 0-1, более предпочтительно 1 N, где каждый N независимо от других выбран из нуклеотида, выбранного из A, U, T, G и C, или аналога этого нуклеотида; и

где C представляет собой цитидин или его аналог и может быть необязательно заменен гуанозином или его аналогом, при условии, что комплементарный ему нуклеотид гуанозин в стебле 1 заменен цитидином.

Пункт 23. Липидная наночастица в соответствии с пп.21 или 22, где по меньшей мере одна структу-

ра типа "стебель-петля" гистоновых мРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224305 и/или наиболее предпочтительно последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

Пункт 24. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.19-23, где последовательность мРНК содержит поли(А)-последовательность, предпочтительно содержащую 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов, и/или поли(С)-последовательность, предпочтительно содержащую 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов.

Пункт 25. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-24, где последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3', следующие элементы:

- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN,
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,
- в) поли(А)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов,
- г) необязательно поли(С)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов, и
- е) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

Пункт 26. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-25, где последовательность мРНК содержит элемент 3'-UTR.

Пункт 27. Липидная наночастица в соответствии с п.26, где по меньшей мере один элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена, при экспрессии которого образуется стабильная мРНК, или из ее гомолога, фрагмента или варианта, или состоит из нее.

Пункт 28. Липидная наночастица в соответствии с п.26 или 27, где элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена α-глобина, при этом предпочтительно содержит последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, ее гомолог, фрагмент или вариант.

Пункт 29. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.26-28, где по меньшей мере один элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена альбумина позвоночного или из ее варианта, предпочтительно из 3'-UTR гена альбумина млекопитающего или из ее варианта, более предпочтительно из 3'-UTR гена альбумина человека или из ее варианта, еще более предпочтительно из 3'-UTR гена альбумина человека в соответствии с номером доступа в GenBank NM_000477.5 или из ее фрагмента или варианта.

Пункт 30. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.26-29, где элемент 3'-UTR получен из последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224301 или 224303, предпочтительно из соответствующей последовательности РНК или ее гомолога, фрагмента или варианта.

Пункт 31. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-30, где последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3', следующие элементы:

- а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m⁷GpppN,
- б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,
- в) элемент 3'-UTR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альфа-глобина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, ее гомолог, фрагмент или вариант;
- г) поли(А)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов,
- д) необязательно поли(С)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов, и
- е) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

Пункт 32. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-31, где последовательность мРНК содержит элемент 5'-UTR.

Пункт 33. Липидная наночастица в соответствии с п.32, где элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, предпочтительно из соответствующей последовательности РНК, ее гомолога, фрагмента или варианта, предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее.

Пункт 34. Липидная наночастица в соответствии с п.33, где элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего рибосомный белок, предпочтительно из соответствующей последовательности РНК или из ее гомолога, фрагмента или варианта, предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее.

Пункт 35. Липидная наночастица в соответствии с п.34, где элемент 5'-UTR содержит последова-

тельность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего белок большой субъединицы рибосомы (RPL), или из ее гомолога, фрагмента или варианта, предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее, и более предпочтительно содержит последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287, или состоит из нее.

Пункт 36. Липидная наночастица в соответствии с п.35, где элемент 5'-UTR, полученный из 5'-UTR TOP-содержащего гена, содержит последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287 или 224289, или состоит из нее.

Пункт 37. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-36, где последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3', следующие элементы:

- a) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN,
- b) элемент 5'-UTR, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, или состоит из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287 или 224289, ее гомолог, фрагмент или вариант, или состоящий из нее;
- c) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок;
- d) элемент 3'-UTR, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из гена альбумина, или состоящий из нее, предпочтительно содержащий последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224303, ее гомолог, фрагмент или вариант;
- e) поли(А)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов,
- f) необязательно поли(С)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов, и
- g) необязательно структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК, предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

Пункт 38. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-37, где антигенный пептид или белок получен из патогенных антигенов, опухолевых антигенов, аллергенных антигенов или собственных аутоантигенов или их фрагмента или варианта.

Пункт 39. Липидная наночастица в соответствии с п.38, где патогенный антиген получен из вируса гриппа или бешенства.

Пункт 40. Липидная наночастица в соответствии с п.39, где антигенный пептид или белок получен из гемагглютинина (НА), нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), белка матрикса 1 (M1), белка матрикса 2 (M2), неструктурного белка 1 (NS1), неструктурного белка 2 (NS2), белка ядерного экспорта (NEP), кислого полимеразного белка (РА), основного полимеразного белка PB1, PB1-F2 или основного полимеразного белка 2 (PB2) вируса гриппа или их фрагмента или варианта.

Пункт 41. Липидная наночастица в соответствии с п.40, где антигенный пептид или белок получен из гемагглютинина (НА) или нейраминидазы (NA) вируса гриппа или их фрагмента или варианта.

Пункт 42. Липидная наночастица в соответствии с п.41, где антигенный пептид или белок представляет собой по меньшей мере один полноразмерный белок гемагглютинин (НА) и/или по меньшей мере один полноразмерный белок нейраминидазу (NA) вируса гриппа или их вариант.

Пункт 43. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-41, где вирус гриппа выбран из вируса гриппа А, В или С.

Пункт 44. Липидная наночастица в соответствии с п.43, где вирус гриппа А выбран из вируса гриппа, характеризующегося наличием гемагглютинина (НА), выбранного из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 и H18.

Пункт 45. Липидная наночастица в соответствии с п.43 или 44, где вирус гриппа А выбран из вируса гриппа, характеризующегося наличием нейраминидазы (NA), выбранной из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10 и N11.

Пункт 46. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.43-45, где вирус гриппа А выбран из группы, состоящей из H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N7, предпочтительно из H1N1, H3N2, H5N1.

Пункт 47. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-46, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа или его фрагмента или варианта, и по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа или ее фрагмента или варианта.

Пункт 48. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-47, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А, выбранного из группы,

состоящей из H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N7, предпочтительно из H1N1, H3N2, H5N1, или их фрагмент или вариант.

Пункт 49. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-48, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 1-14031, или его фрагмент или вариант.

Пункт 50. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-49, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 32013-46043, 64025-78055, 96037-110067, 128049-142079, 160061-174091, 192073-206103, или ее фрагмент или вариант.

Пункт 51. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-50, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (HA) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 26398-28576, или его фрагмент или вариант.

Пункт 52. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-51, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 58410-60588, 90422-92600, 122434-124612, 154446-156624, 186458-188636, 218470-220648, или ее фрагмент или вариант.

Пункт 53. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-52, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 14032-26397, или его фрагмент или вариант.

Пункт 54. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-53, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 46044-58409, 78056-90421, 110068-122433, 142080-154445, 174092-186457, 206104-218469, или ее фрагмент или вариант.

Пункт 55. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-54, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (NA) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 28577-30504, или его фрагмент или вариант.

Пункт 56. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-55, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК или комбинацию последовательностей РНК, выбранных из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 60589-62516, 92601-94528, 124613-126540, 156625-158552, 188637-190564, 220649-222576, или их фрагмент или вариант.

Пункт 57. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-56, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G (RAV-G, RAVBV-G или RABV-G), нуклеопротеина N (RAV-N), фосфопротеина Р (RAV-P), белка матрикса М (RAV-M) или РНК-полимеразы L (RAV-L) вируса бешенства, или его фрагмент, вариант.

Пункт 58. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-57, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G (RAV-G, RAVBV-G или RABV-G) вируса бешенства в соответствии с SEQ ID NO: 30505-32012, или его фрагмент или вариант.

Пункт 59. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.39-58, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 62517-64024, 94529-96036, 126541-128048, 158553-160060, 190565-192072, 222577-224084, или ее фрагмент или вариант.

Пункт 60. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-59, где соединение мРНК содержит по меньшей мере две последовательности мРНК, где по меньшей мере две последовательности мРНК кодируют два разных антигенных пептида и/или белка.

Пункт 61. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-59, содержащая по меньшей мере два разных соединения мРНК, при этом каждое соединение содержит последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок.

Пункт 62. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-61, дополнительно содержащая: (iv) нейтральный липид и/или (v) стероид или аналог стероида.

Пункт 63. Липидная наночастица в соответствии с п.62, где нейтральный липид выбран из группы, включающей дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтанолламин (POPE) и 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат диолеилфосфатидилэтанолламина (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-момометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеилфосфатидилэтанолламин (SOPE) и 1,2-диэлаидоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтанолламин (транс-DOPE).

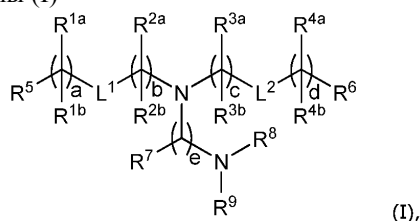
Пункт 64. Липидная наночастица в соответствии с п.63, где нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), и где молярное соотношение катионного липида и DSPC необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 8:1.

Пункт 65. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.62-64, где стероид представляет собой холестерин, и где молярное соотношение катионного липида и холестерина необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 1:1.

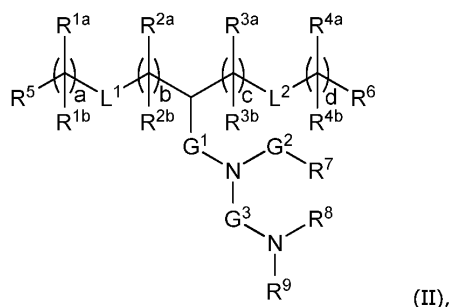
Пункт 66. Способ получения липидной наночастицы в соответствии с любым из пп.5-67, включающий стадии:

(i) получения:

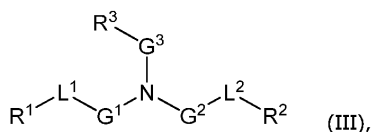
а) катионного липида формулы (I)



определенной выше, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера, и/или формулы (II)

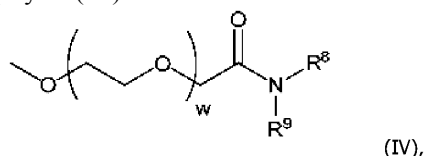


определенной выше, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера, и/или формулы III



определенной выше, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера, пролекарства или стереоизомера; и/или

б) конъюгата PEG-липид формулы (IV)



определенной выше;

с) по меньшей мере одного соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, где соединение мРНК необязательно не содержит модификации нуклеозида, в частности не содержит модификации азотистого основания; и

д) необязательно стероида; и

е) необязательно нейтрального липида;

(ii) солюбилизации катионного липида и/или конъюгата PEG-липид и необязательно нейтрального липида и/или стероида или производного стероида в этаноле;

(iii) смешивания этанольного раствора липидов с водным раствором, содержащим полинуклеотид

мРНК;

(iv) удаления этанола и необязательно

(v) отделения или очистки липидных наночастиц.

Пункт 67. Способ в соответствии с п.66, где на стадии (iv) этанол удаляют посредством диализа или диафильтрации.

Пункт 68. Способ в соответствии с п.66 или 67, где на стадии (v) липидные наночастицы очищают посредством фильтрации, предпочтительно посредством фильтрации через стерильный фильтр.

Пункт 69. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну липидную наночастицу в соответствии с любым из пп.1-65.

Пункт 70. Фармацевтическая композиция в соответствии с п.69, содержащая по меньшей мере первую и вторую липидные наночастицы в соответствии с любым из пп.1-65, где соединение мРНК, содержащееся во второй липидной наночастице, отличается от соединения мРНК, содержащегося в первой липидной наночастице.

Пункт 71. Фармацевтическая композиция в соответствии с пунктами 69 или 70, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый адъювант или наполнитель.

Пункт 72. Липидная наночастица в соответствии с любым из пп.1-65 или фармацевтическая композиция в соответствии с любым из пп.69-71 для применения в качестве лекарственного препарата.

Пункт 73. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с п.72, где лекарственный препарат предназначен для терапевтической или профилактической индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом.

Пункт 74. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с пунктами 72 или 73, где лекарственный препарат предназначен для предупреждения или лечения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними.

Пункт 75. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из пп.72-74, где лекарственный препарат представляет собой вакцину.

Пункт 76. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с п.75, где лекарственный препарат представляет собой противоопухолевую вакцину, вакцину от гриппа или бешенства.

Пункт 77. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с п.76, где лекарственный препарат представляет собой вакцину от бешенства, применяемую при лечении бешенства.

Пункт 78. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из пп.72-77, где субъектом является позвоночное, предпочтительно млекопитающее.

Пункт 79. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из пп.72-78, где лекарственный препарат предназначен для парентерального введения, и где парентеральное введение предусматривает инъекцию.

Пункт 80. Липидная наночастица или фармацевтическая композиция для применения в соответствии с любым из пп.78-79, где субъектом является птица, предпочтительно курица, или млекопитающее, предпочтительно выбранное из группы, включающей козу, крупный рогатый скот, свинью, собаку, кошку, осла, нечеловекообразную обезьяну, человекообразную обезьяну, грызуна, такого как мышь, хомяк, кролика и, в частности, человека.

Пункт 81. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы в соответствии с любым из пп.1-65 или фармацевтической композиции в соответствии с любым из пп.69-72.

Пункт 82. Способ предупреждения или лечения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы в соответствии с любым из пп.1-65 или фармацевтической композиции в соответствии с любым из пп.69-72.

Фигуры

Показанные ниже фигуры являются лишь иллюстративными и предназначены для дополнительного описания настоящего изобретения. Эти фигуры не следует считать ограничивающими настоящее изобретение.

На фиг. 1А - 1В показаны результаты анализов биолуминесцентной визуализации мышей после внутрибрюшинной инъекции люциферина через 24 ч (фиг. 1А) и через 48 ч (фиг. 1В). Состав на основе мРНК в LNP приводил к значительно увеличенной и дозозависимой экспрессии белка после внутримышечного применения по сравнению с тем же количеством несоставленной мРНК.

На фиг. 2А - 2G показана экспрессия RpLuc, измеренная в лизатах органов через 48 ч после i.m. инъекции. Для каждой группы регистрировали относительные световые единицы люциферазной активности (RLU) в отдельных органах (фиг. 2А=головной мозг, фиг. 2В=сердце, фиг. 2С=почка, фиг. 2D=печень, фиг. 2Е=легкое, фиг. 2F=мышца, фиг. 2G=селезенка).

На фиг. 3А - 3В показаны титры HI через 21 день после первичной вакцинации с использованием

трех различных мРНК, кодирующих НА, составленных в LNP (фиг. 3А), и через 14 дней после бустерной вакцинации (фиг. 3В). Пунктирной линией указан традиционно определяемый защитный титр HI, составляющий 1:40.

На фиг. 4А - 4D показаны результаты анализов ELISA через 21 день после первичной вакцинации и через 14 дней после бустерной вакцинации с использованием трех различных мРНК, кодирующих НА, составленных в LNP, и через 14 дней после бустерной вакцинации (подтипы IgG1 через 21 день после первичной вакцинации показаны на фиг. 4А, подтипы IgG1 через 14 дней после бустерной вакцинации показаны на фиг. 4В, подтипы IgG2a через 21 день после первичной вакцинации показаны на фиг. 4С, подтипы IgG2a через 14 дней после бустерной вакцинации показаны на фиг. 4D).

На фиг. 5А - 5С показаны результаты анализов Т-клеток после индукции антигенспецифических Т-клеток с использованием внутриклеточного окрашивания цитокинов. На фиг. 5А показаны CD4 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /TNF α , на фиг. 5В показаны CD8 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /TNF α , и на фиг. 5С показаны CD8 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /CD107⁺.

На фиг. 6А - 6В показаны титры HI через 21 день после первичной вакцинации с использованием трех различных мРНК, кодирующих НА, составленных в LNP (фиг. 6А), и через 14 дней после бустерной вакцинации (фиг. 6В). Пунктирной линией указан традиционно определяемый защитный титр HI, составляющий 1:40.

На фиг. 7А - 7D показаны результаты анализов ELISA через 21 день после первичной вакцинации и через 14 дней после бустерной вакцинации с использованием трех различных мРНК, кодирующих НА, составленных в LNP, и через 14 дней после бустерной вакцинации (подтипы IgG1 через 21 день после первичной вакцинации показаны на фиг. 7А, подтипы IgG1 через 14 дней после бустерной вакцинации показаны на фиг. 7В, подтипы IgG2a через 21 день после первичной вакцинации показаны на фиг. 7С, подтипы IgG2a через 14 дней после бустерной вакцинации показаны на фиг. 7D).

На фиг. 8А - 8С показаны результаты анализов Т-клеток после индукции антигенспецифических Т-клеток с использованием внутриклеточного окрашивания цитокинов. На фиг. 8А показаны CD4 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /TNF α , на фиг. 8В показаны CD8 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /TNF α , и на фиг. 8С показаны CD8 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /CD107⁺.

На фиг. 9А - 9В показаны титры HI через 21 день после первичной вакцинации с использованием трех различных мРНК, кодирующих НА, составленных в LNP (фиг. 6А), и через 14 дней после бустерной вакцинации (фиг. 6В) с использованием всего лишь 1 мкг мРНК, кодирующей НА, составленной в LNP. Пунктирной линией указан традиционно определяемый защитный титр HI, составляющий 1:40.

На фиг. 10А - 10D показаны результаты анализов ELISA через 21 день после первичной вакцинации и через 14 дней после бустерной вакцинации тремя различными мРНК, кодирующими НА, составленными в LNP, и через 14 дней после бустерной вакцинации (подтипы IgG1 через 21 день после первичной вакцинации показаны на фиг. 10А, подтипы IgG1 через 14 дней после бустерной вакцинации показаны на фиг. 10В, подтипы IgG2a через 21 день после первичной вакцинации показаны на фиг. 10С, подтипы IgG2a через 14 дней после бустерной вакцинации показаны на фиг. 10D).

На фиг. 11 показаны Т-клеточные иммунные ответы, измеренные по выработке IFN γ с использованием Elispot.

На фиг. 12 показаны результаты анализа титров антител после внутримышечной вакцинации NHP с использованием мРНК, кодирующей НА, составленной в LNP-III-3.

На фиг. 13 показаны титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) после внутримышечной вакцинации NHP с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3.

На фиг. 14 показан анализ титров HI после вакцинации с использованием мРНК, кодирующей НА, составленной в LNP-III-3.

На фиг. 15А - 15D показаны результаты анализа цитокинов после вакцинации с использованием мРНК, составленной в LNP-III-3 (фиг. 15А=IFN γ , фиг. 15В=IL-6, фиг. 15С=IL-8, фиг. 15D=TNF).

На фиг. 16А - 16В показаны титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) после внутримышечной вакцинации мышей с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (фиг. 16А=VNT в день 21; фиг. 16В=VNT в день 35).

На фиг. 17А - 17С показаны результаты анализов Т-клеток у мышей, дважды иммунизированных с использованием 5 мкг, 1 мкг и 0,5 мкг мРНК, составленной в LNP, в день 35 (на фиг. 17А показаны CD4 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /TNF α , на фиг. 17В показаны CD8 Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /TNF α , а на фиг. 17С показаны CD8⁺ Т-клетки, вырабатывающие IFN γ /CD107⁺). Отрицательный контроль в виде DMSO указан пунктирной линией на графиках.

На фиг. 18А - 18D показаны результаты анализа поражения печени, т.е. определение уровней AST в день 1 и 21 (фиг. 18А - 18В) и уровней ALT в день 1 и 21 (фиг. 18С - 18D).

На фиг. 19А - 19D показано выявление специфического иммунного ответа на НА (В-клеточного иммунного ответа) путем выявления антител IgG2a, направленных против конкретного вируса гриппа, т.е. вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1; фиг. 19А), вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2; фиг. 19В), вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (В; фиг. 19С) и вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1;

фиг. 19D).

На фиг. 20 показаны иллюстративные белки гемагглютинины (HA) вируса гриппа А (см. раздел "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"; обозначения: первый столбец: № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank); второй столбец (A): SEQ ID NO последовательности белка дикого типа; третий столбец (B): SEQ ID NO нуклеотидной последовательности дикого типа; четвертый столбец (C): SEQ ID NO оптимизированной нуклеотидной последовательности).

На фиг. 21 показаны иллюстративные белки гемагглютинины (HA) вируса гриппа В (см. раздел "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"; обозначения: первый столбец: № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank); второй столбец (A): SEQ ID NO последовательности белка дикого типа; третий столбец (B): SEQ ID NO нуклеотидной последовательности дикого типа; четвертый столбец (C): SEQ ID NO оптимизированной нуклеотидной последовательности).

На фиг. 22 показаны иллюстративные белки нейраминидазы (NA) вируса гриппа А (см. раздел "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"; обозначения: первый столбец: № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank); второй столбец (A): SEQ ID NO последовательности белка дикого типа; третий столбец (B): SEQ ID NO нуклеотидной последовательности дикого типа; четвертый столбец (C): SEQ ID NO оптимизированной нуклеотидной последовательности).

На фиг. 23 показаны иллюстративные белки нейраминидазы (NA) вируса гриппа А (см. раздел "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"; обозначения: первый столбец: № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank); второй столбец (A): SEQ ID NO последовательности белка дикого типа; третий столбец (B): SEQ ID NO нуклеотидной последовательности дикого типа; четвертый столбец (C): SEQ ID NO оптимизированной нуклеотидной последовательности).

На фиг. 24 показаны иллюстративные гликопротеины вируса бешенства (см. раздел "Предпочтительные последовательности согласно настоящему изобретению"; обозначения: первый столбец: № доступа белка или нуклеиновой кислоты (GenBank); второй столбец (A): SEQ ID NO последовательности белка дикого типа; третий столбец (B): SEQ ID NO нуклеотидной последовательности дикого типа; четвертый столбец (C): SEQ ID NO оптимизированной нуклеотидной последовательности).

На фиг. 25 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа H1N1 (А/Калифорния/7/2009), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (С-Е) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (А) или Influsplit (В). Для каждой ситуации (А-Е) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 26 показаны титры HI, специфичных к вирусу гриппа H1N1 (А/Калифорния/7/2009), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (С-Е) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (А) или Influsplit (В). Для каждой ситуации (А-Е) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 27 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа H3N2 (А/Гонконг/4801/2014), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (С-Е) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (А) или Influsplit (В). Для каждой ситуации (А-Е) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 28 показаны титры HI, специфичных к вирусу гриппа H3N2 (А/Гонконг/4801/2014), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (С-Е) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (А) или Influsplit (В). Для каждой ситуации (А-Е) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 29 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа В (В/Брисбен/60/2008), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (С-Е) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (А) или Influsplit (В). Для каждой ситуации (А-Е) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 30 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа В (В/Пхукет/3073/2013), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (С-Е) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (А) или Influsplit (В). Для каждой ситуации (А-Е) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 31 показано, что вакцинация мышей комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены вируса гриппа (С-Е), индуцировала ответы, опосредованные CD4⁺ Т-клетками, на H1N1 (А/Калифорния/7/2009), H3N2 (А/Гонконг/4801/2014), вирус гриппа В (В/Брисбен/60/2008), вирус гриппа В (В/Пхукет/3073/2013) (1-4 соответственно). В качестве контроля клетки стимулировали буфером (5). В

качестве дополнительных контролей мышам инъецировали RiLa (A) или Influsplit (B). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 32 показано, что вакцинация мышей комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены вируса гриппа (C-F), индуцировала ответы, опосредованные $CD8^+$ Т-клетками, на H1N1 (А/Калифорния/7/2009) (1). В качестве контроля клетки стимулировали буфером (5). В качестве дополнительных контролей мышам инъецировали RiLa (A) или Influsplit (B). Схему вакцинации см. в табл. А. Подробное описание эксперимента представлено в примере 12.

На фиг. 33 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа H1N1 (А/Калифорния/7/2009), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (C-E) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Fluarix (B). Для каждой ситуации (A-E) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 34 показаны титры HI, специфичных к вирусу гриппа H1N1 (А/Калифорния/7/2009), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (C-E) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Fluarix (B). Для каждой ситуации (A-E) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 35 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа H3N2 (А/Гонконг/4801/2014), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (C-E) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Fluarix (B). Для каждой ситуации (A-E) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 36 показаны титры HI, специфичных к вирусу гриппа H3N2 (А/Гонконг/4801/2014), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (C-E) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Fluarix (B). Для каждой ситуации вакцинации (A-E) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 37 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа В (В/Брисбен/60/2008), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (C-E) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Fluarix (B). Для каждой ситуации (A-E) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 38 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2, специфичных к вирусу гриппа H5N1 (А/Вьетнам/1203/2004), у мышей, вакцинированных комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены (C-E) вируса гриппа, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Fluarix (B). Для каждой ситуации (A-E) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 39 показано, что вакцинация мышей комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены вируса гриппа (C-E), индуцировала ответы, опосредованные $CD4^+$ Т-клетками, на H1N1 (А/Калифорния/7/2009), H3N2 (А/Гонконг/4801/2014), вирус гриппа В (В/Брисбен/60/2008), H5N1 (А/Вьетнам/1203/2004) (1-4 соответственно). В качестве контроля клетки стимулировали буфером (5). В качестве дополнительных контролей мышам инъецировали RiLa (A) или Influsplit (B). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 40 показано, что вакцинация мышей комбинацией из четырех мРНК, кодирующих различные антигены вируса гриппа (C-F), индуцировала ответы, опосредованные $CD8^+$ Т-клетками, на H1N1 (А/Калифорния/7/2009), H5N1 (А/Вьетнам/1203/2004) (1 и 2). В качестве контроля клетки стимулировали буфером (3). В качестве дополнительных контролей мышам инъецировали RiLa (A) или Influsplit (B). Схему вакцинации см. в табл. В. Подробное описание эксперимента представлено в примере 13.

На фиг. 41 показано присутствие связывающих антител, специфичных к нейраминидазе N1 вируса гриппа (А/Калифорния/7/2009), и титров согласно ELLA (титр 50% ингибирования) в образцах сыворотки крови мышей, которых вакцинировали с использованием мРНК, кодирующей нейраминидазу N1 вируса гриппа (А/Калифорния/7/2009) (C и D), составленной в LNP, по сравнению с контрольными особями, которым инъецировали RiLa (A) или Influsplit® (B). Схему вакцинации см. в табл. С. Подробное описание эксперимента представлено в примере 14.

На фиг. 42 показано, что вакцинация мышей с использованием мРНК, кодирующих нейраминидазу N1 вируса гриппа (А/Калифорния/7/2009), индуцировала ответы, опосредованные $CD4^+$ Т-клетками, на нейраминидазу (C и D). В качестве контролей мышам инъецировали RiLa (A) или Influsplit® (B). Схему вакцинации см. в табл. С. Подробное описание эксперимента представлено в примере 14.

На фиг. 43 показано, что вакцинация мышей с использованием мРНК, кодирующих нейраминидазу N1 вируса гриппа (А/Калифорния/7/2009), индуцировала ответы, опосредованные $CD8^+$ Т-клетками, на нейраминидазу (C и D). В качестве контролей мышам инъецировали RiLa (A) или Influsplit® (B). Схему

вакцинации см. в табл. С. Подробное описание эксперимента представлено в примере 14.

На фиг. 44 показано, что мРНК, кодирующие RAVBV-G, составленные в LNP, индуцируют формирование провоспалительной среды. Показаны уровни цитокинов в мышцах в четыре различных момента времени (4, 14, 24 и 96 ч) (TNF, IL6). Стрелкой указана серия данных для мышей, вакцинированных с использованием мРНК, составленной в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 45 показано, что мРНК, кодирующие RAVBV-G, составленные в LNP, индуцируют формирование провоспалительной среды. Показаны уровни цитокинов в dLN в четыре различных момента времени (4, 14, 24 и 96 ч) (TNF, IL6). Стрелкой указана серия данных для мышей, вакцинированных с использованием мРНК, составленной в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 46 показано отсутствие системного высвобождения TNF после i.m. вакцинации с использованием мРНК, кодирующих RAVBV-G, составленных в LNP. Показаны уровни цитокинов в сыворотке крови в четыре различных момента времени (4, 14, 24 и 96 ч) (TNF, IL6). Стрелкой указана серия данных для мышей, вакцинированных с использованием мРНК, составленной в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 47 показано, что мРНК, кодирующие RAVBV-G, составленные в LNP, индуцируют формирование провоспалительной среды. Показаны уровни хемокинов в мышцах в четыре различных момента времени (4, 14, 24 и 96 ч) (MIP-1 бета, CXCL9). Стрелкой указана серия данных для мышей, вакцинированных с использованием мРНК, составленной в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 48 показано, что мРНК, кодирующие RAVBV-G, составленные в LNP, индуцируют формирование провоспалительной среды. Показаны уровни хемокинов в dLN в четыре различных момента времени (4, 14, 24 и 96 ч) (MIP-1 бета, CXCL9). Стрелкой указана серия данных для мышей, вакцинированных с использованием мРНК, составленной в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 49 показано, что мРНК, кодирующие RAVBV-G, составленные в LNP, индуцируют формирование провоспалительной среды. Показаны уровни хемокинов в сыворотке крови в четыре различных момента времени (4, 14, 24 и 96 ч) (MIP-1 бета, CXCL9). Стрелкой указана серия данных для мышей, вакцинированных с использованием мРНК, составленной в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 50А - 50В показано, что F*мРНК, составленные в LNP, индуцируют увеличение количества и активацию клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы в dLN. На фиг. 50А показано количество CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, CD11b⁺ Gr1⁺ клеток (моноцитов и гранулоцитов) и общее количество клеток в dLN в три различных момента времени (4, 24 и 48 ч). На фиг. 50В приведены значения частоты встречаемости CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, В-клеток и NK-клеток, экспрессирующих маркер активации CD69, в три различных момента времени (4, 24 и 48 ч). Стрелкой указана серия данных для мышей, которым инъецировали мРНК, составленную в LNP. Значения представляют среднее значение для 6 образцов с SD. Подробное описание эксперимента представлено в примере 15.

На фиг. 51 показано, что вакцинация обезьян с использованием мРНК, кодирующих RABV-G, составленных в LNP, индуцирует образование титров нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) после однократной i.m. вакцинации. Показаны две концентрации мРНК (1 мкг и 10 мкг) до вакцинации ("перед введением дозы") и после первой вакцинации ("после первичной вакцинации"). Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры VNT. Подробное описание эксперимента представлено в примере 16.

На фиг. 52 показана кинетика VNT после вакцинации (первичная вакцинация в день 0, бустерная вакцинация в день 28) у обезьян, вакцинированных с использованием мРНК, кодирующих RABV-G, составленных в LNP. Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры VNT. Подробное описание эксперимента представлено в примере 16.

На фиг. 53 показаны две концентрации мРНК (1 мкг и 10 мкг) до бустерной вакцинации ("до вторичной вакцинации") и после бустерной вакцинации ("после вторичной вакцинации"). Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры VNT. Подробное описание эксперимента представлено в примере 16.

На фиг. 54 - вакцины на основе мРНК, кодирующих RAVBV-G, составленных в LNP, индуцируют у NHP более сильные функциональные иммунные ответы на вирус бешенства, чем утвержденная к применению вакцина. VNT антител к вирусу бешенства в образцах сыворотки крови у NHP (n=2 самца, 2 самки в каждой группе), вакцинированных с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, в дни 0 и 28, или с использованием инактивированной вакцины от бешенства Rabipur®, в дни 0 и 28 (одна бустерная вакцинация). Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры VNT. Подробное описание эксперимента представлено в примере 16.

На фиг. 55 - вакцины на основе мРНК, кодирующей RAVBV-G, составленной в LNP, индуцируют RABV-G-специфические CD4⁺ Т-клетки у обезьян. Показаны значения частоты встречаемости RABV-G-

специфических $\text{IFN}\gamma^+/\text{IL-2}^+ \text{CD4}^+$ клеток в крови через 7 дней после последней вакцинации (день 35). PBMC были стимулированными с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов, охватывающей белок RABV-G (пептиды RABV-G), либо нестимулированными (среды), и их анализировали посредством ICS. Подробное описание эксперимента представлено в примере 16.

На фиг. 56 - вакцины на основе мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, индуцируют RABV-G-специфические CD8^+ Т-клетки у обезьян. Показаны значения частоты встречаемости RABV-G-специфических $\text{IFN}\gamma^+/\text{GrzB}^+ \text{CD8}^+$ Т-клеток в крови через 7 дней после последней вакцинации (день 35). PBMC были стимулированными с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов, охватывающей белок RABV-G (пептиды RABV-G), либо нестимулированными (среды), и их анализировали посредством ICS. Подробное описание эксперимента представлено в примере 16.

На фиг. 57 показано, что вакцинация обезьян с использованием мРНК, кодирующих антигены НА вируса гриппа штаммов H1N1 или H3N2, составленных в LNP, индуцирует выработку функциональных антител после однократной i.m. вакцинации. Показаны титры HI перед вакцинацией ("перед введением дозы") и после первой вакцинации ("после первичной вакцинации"). Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры HI. Подробное описание эксперимента представлено в примере 17.

На фиг. 58 показана кинетика титров HI (среднее значение с SEM) после вакцинации (первичная вакцинация в день 0, бустерная вакцинация в день 28) обезьян с использованием мРНК, кодирующих НА H1N1, составленных в LNP. Изменение титров HI со временем показано в течение периода длительностью до 544 дней. Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры HI. Треугольники: точки данных для обезьян, вакцинированных с использованием 10 мкг; прямоугольники: точки данных для обезьян, вакцинированных с использованием 1 мкг. Подробное описание эксперимента представлено в примере 17.

На фиг. 59 - вакцина на основе мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, индуцировала у NHP более сильные функциональные иммунные ответы на вирус гриппа, чем утвержденная к применению вакцина. Показаны титры HI в отношении H3N2 в образцах сыворотки крови у NHP, вакцинированных в дни 0 и 28 с использованием мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, или адъювантной вакцины Flud®. Пунктирной линией указаны традиционно определяемые защитные титры HI. Подробное описание эксперимента представлено в примере 17.

На фиг. 60 - вакцины на основе мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, индуцируют H3N2-специфические CD4^+ Т-клетки у обезьян. PBMC были стимулированными с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов, охватывающей белок H3N2-НА (пептиды H3N2-НА), либо нестимулированными (среды), и их анализировали посредством ICS. Фиг. 60А: показаны значения частоты встречаемости H3N2-НА-специфических $\text{IFN}\gamma^+/\text{IL-2}^+ \text{CD4}^+$ клеток в крови через 7 дней после последней вакцинации (день 35). Фиг. 60В: показаны значения частоты встречаемости H3N2-НА-специфических $\text{TNF}\alpha^+/\text{IL-2}^+ \text{CD4}^+$ клеток в крови через 7 дней после последней вакцинации (день 35). Подробное описание эксперимента представлено в примере 17.

На фиг. 61А - 61В показаны титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) после внутримышечной вакцинации мышей с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (фиг. 60А=VNT в день 21; фиг. 60В=VNT в день 35). Подробное описание эксперимента представлено в примере 7.

На фиг. 62А - 62В показаны титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) после внутримышечной вакцинации мышей с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (фиг. 60А=VNT в день 21; фиг. 60В=VNT в день 35), при применении LNP, которые хранили при 5°C в течение трех месяцев. Подробное описание эксперимента представлено в примере 20.

На фиг. 63А - 63D показано, что вакцинация хорьков с использованием тетравалентной вакцины на основе мРНК, составленной в LNP, индуцирует выработку функциональных антител. Данные показаны для указанных групп (группы А-D) с измерением в день 0, день 21, день 35 и день 49 соответственно. Фиг. 63А: титры HI к НА А/Калифорния/07/09; фиг. 63А: титры HI к НА А/Гонконг/4801/2014; фиг. 63С: титры HI к НА В/Брисбен/60/2008; фиг. 63D: титры MN к НА В/Пхукет/3073/2013. Положительный контроль (группа D, Flud) не показан, поскольку Flud не содержит НА В/Пхукет. Подробное описание эксперимента представлено в примере 22.

На фиг. 64 показано, что вакцинация мышей с использованием трехвалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей NA, составленной в LNP, индуцирует выработку связывающих антител к NA вируса гриппа. Показаны результаты ELLA (титр 50% ингибирования). На фигуре 64А показаны титры антител к N1 вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 для указанных групп согласно ELLA; на фиг. 64В показаны титры антител к N1 вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 для указанных групп согласно ELLA; на фиг. 64С показаны титры антител к NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 для указанных групп согласно ELLA. 1=вакцина на основе мРНК, 2=контроль; 3=контрольный буфер. Подробное описание эксперимента представлено в примере 24.

На фиг. 65 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2a, специфичных к НА H1N1 А/Калифорния/7/2009, у мышей, вакцинированных семивалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей

щей HA/NA, составленной в LNP. Для каждой ситуации (группы 1-6) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49) (ELISA). Подробное описание эксперимента представлено в примере 25.

На фиг. 66 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2a, специфичных к HA H3N2 A/Гонконг/4801/2014, у мышей, вакцинированных семивалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP. Для каждой ситуации (группы 1-6) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49) (ELISA). Подробное описание эксперимента представлено в примере 25.

На фиг. 67 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2a, специфичных к HA В/Брисбен/60/2008, у мышей, вакцинированных семивалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей HA/NA (ELISA). Для каждой ситуации (группы 1-6) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Подробное описание эксперимента представлено в примере 25.

На фиг. 68 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2a к HA В/Пхукет/3073/2013 у мышей, вакцинированных семивалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP (ELISA). Для каждой ситуации (группа 1 - группа 6) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Подробное описание эксперимента представлено в примере 25.

На фиг. 69 показано присутствие специфичных антител к NA H1N1 A/Калифорния/7/2009 у мышей, вакцинированных семивалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP (ELISA). Для каждой ситуации (группа 1 - группа 6) показаны три различных момента времени (d21, d35 и d49). Фиг. 69А: специфичные антитела к NA H1N1 A/Калифорния/7/2009; фиг. 69В: специфичные антитела к NA H3N2 A/Гонконг/4801/2014; фиг. 69С: специфичные антитела к NA В/Брисбен/60/2008. Подробное описание эксперимента представлено в примере 25.

На фиг. 70 показано, что вакцинация мышей с использованием семивалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP, индуцирует выработку функциональных антител. Данные показаны для указанных групп (группы 1 - группы 6) с измерением в день 49. Фиг. 63А: титры HI к HA А/Калифорния/07/09; фиг. 63А: титры HI к HA А/Гонконг/4801/2014. Подробное описание эксперимента представлено в примере 25.

На фиг. 71 показано, что вакцина на основе мРНК, кодирующей GP (вируса Эбола), составленной в LNP, индуцирует сильные иммунные ответы с образованием антител IgG1 и IgG2a у мышей. Подробное описание эксперимента представлено в примере 26.

На фиг. 72 показано, что вакцина на основе мРНК, составленной в LNP, индуцирует образование высоких и устойчивых титров HI при подкожном введении. Подробное описание эксперимента представлено в примере 27.

На фиг. 73 показано сравнение Ова-специфических CD8-положительных Т-клеток в крови в день 7 после вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонента А), и 32 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной с протамином (компонента В). 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонент А), индуцирует образование более высоких уровней циркулирующих в крови антигенспецифических CD8-положительных Т-клеток после внутрикожного применения. Подробное описание эксперимента представлено в примере 28.

На фиг. 74 показано сравнение Ова-специфических CD8-положительных Т-клеток в крови в день 21 после бустерной вакцинации животных с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонента А), и 32 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной с протамином (компонента В). 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонент А), индуцирует образование уровней циркулирующих в крови антигенспецифических CD8-положительных Т-клеток, способных повышаться, после внутрикожного применения. Подробное описание эксперимента представлено в примере 28.

На фиг. 75 показано сравнение Ова-специфических полифункциональных CD8-положительных Т-клеток в крови после вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонента А), и 32 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной с протамином (компонента В). 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонент А), индуцирует высокие уровни полифункциональных CD8-положительных Т-клеток после внутрикожного применения. Подробное описание эксперимента представлено в примере 28.

На фиг. 76 показано сравнение титров IgG2с, специфичных к ОВА, после вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонента А), и 32 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной с протамином (компонента В). 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонент А), приводит к увеличению титров IgG2с, специфичных к ОВА, после внутрикожного применения. Подробное описание эксперимента представлено в примере 28.

На фиг. 77 показано сравнение медианного роста опухоли у мышей, несущих опухоль, после вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонента А), и нецелевой мРНК, кодирующей РрLuc, составленной в LNP (компонента В). 1 мкг мРНК, кодирующей Ова, составленной в LNP (компонент А), существенно уменьшал медианный объем опухоли по сравнению с другим видом обработки с использованием нецелевой мРНК (компонента В). Подробное описание эксперимента представлено в примере 29.

На фиг. 78 показано сравнение общей выживаемости мышей с имплантированной опухолью после

вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Ova, составленной в LNP (компонента А), и нецелевой мРНК, кодирующей PpLuc, составленной в LNP (компонента В). 1 мкг мРНК, кодирующей Ova, составленной в LNP (компонент А), существенно увеличивал выживаемость мышей с имплантированной опухолью по сравнению с другими видами обработки (с использованием компонента В и буфера). Подробное описание эксперимента представлено в примере 29.

На фиг. 79 показано сравнение медианного роста опухоли у мышей, несущих опухоль, после вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Trp2, составленной в LNP (компонента А), и нецелевой мРНК, кодирующей PpLuc, составленной в LNP (компонента В), в комбинации с двумя ингибиторами контрольных точек иммунного ответа антителом к PD1 и антителом к CTLA4. 1 мкг мРНК, кодирующей Trp2, составленной в LNP (компонент А), существенно уменьшал медианный объем опухоли по сравнению с другим видом обработки с использованием нецелевой мРНК (компонента В) в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа или контрольным антителом. Подробное описание эксперимента представлено в примере 30.

На фиг. 80 показано сравнение выживаемости мышей с имплантированной опухолью после вакцинации с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей Trp2, составленной в LNP (компонента А), и нецелевой мРНК, кодирующей PpLuc, составленной в LNP (компонента В), в комбинации с двумя ингибиторами контрольных точек иммунного ответа антителом к PD1 и антителом к CTLA4. 1 мкг мРНК, кодирующей Trp2, составленной в LNP (компонент А), увеличивал выживаемость мышей с имплантированной опухолью по сравнению с другими видами обработки (с использованием компонента В в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа или контрольным антителом). Подробное описание эксперимента представлено в примере 30.

Примеры

Настоящее изобретение подробно описано далее посредством ссылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры представлены лишь с иллюстративной целью, но не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, настоящее изобретение ни в коей мере не следует истолковывать как ограниченное следующими примерами, а скорее следует истолковывать как охватывающее все без исключения варианты, которые становятся очевидными как результат идеи, представленной в данном документе.

Без дополнительного описания предполагается, что средний специалист в данной области может, используя предшествующее описание и следующие иллюстративные примеры, создать и использовать настоящее изобретение и осуществить на практике заявляемые способы. Следовательно, следующие практические примеры, в частности, указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом остальную часть изобретения.

Пример 1. Получение конструкций мРНК.

В данном примере получали последовательности ДНК, кодирующие различные белки, и их использовали для дальнейших реакций транскрипции РНК *in vitro*. Последовательности ДНК, кодирующие белки, получали путем осуществления модификации кодирующей последовательности ДНК дикого типа путем введения GC-оптимизированной последовательности с целью стабилизации. Последовательности вводили в вектор, полученный из pUC19. С целью дополнительной стабилизации и/или увеличения уровня трансляции элементы UTR вводили в 5'- и/или 3'-направлении от кодирующей области.

В данных примерах использовали следующие конструкции мРНК.

Люцифераза *Photinus pyralis*.

5'-TOP-содержащая UTR, полученная из рибосомного белка 32L4 - GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая PpLuc - 3'-UTR, полученная из гена альбумина - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224286).

Гемагглютинин вируса гриппа (HA).

5'-TOP-содержащая UTR, полученная из рибосомного белка 32L4 - GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая HA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) - 3'-UTR, полученная из гена альбумина - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224118). GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая HA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (muag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224117).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая HA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (muag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224181).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая HA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 -3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (muag) - отрезок из 64 аденози-

новых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224236).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая НА вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224200).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая НА вируса гриппа А/Нидерланды/602/2009 (H1N1) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224166).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая НА вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 -3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224236).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая НА вируса гриппа В/Пхукет/3073/2013 -3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224246).

Нейраминидаза вируса гриппа (NA).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая NA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224318).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая NA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224336).

GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 -3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов -отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224348).

Вирус бешенства.

RABV-G A: GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая гликопротеин (RABV-G) пастеровского штамма (номер доступа в GenBank: AAA47218.1) - 3'-UTR, полученная из гена альфа-глобина человека (nuag) - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224276).

RABV-G B: 5'-TOP-содержащая UTR, полученная из рибосомного белка 32L4 - GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая гликопротеин (RABV-G) пастеровского штамма (номер доступа в GenBank: AAA47218.1) - 3'-UTR, полученная из гена альбумина - отрезок из 64 аденозиновых нуклеотидов - отрезок из 30 цитозиновых нуклеотидов - последовательность структуры типа "стебель-петля" гистоновых мРНК (SEQ ID NO: 224280).

Вирус Эбола.

GP вируса Эбола: GC-обогащенная кодирующая последовательность, кодирующая гликопротеин ZEBOV/Сьерра-Леоне/2014; 5'-TOP-содержащая UTR, полученная из рибосомного белка 32L4 - 3'-UTR, полученная из гена альбумина (SEQ ID NO: 224362).

Полученные конструкции плазмидных ДНК подвергали трансформации и размножали в бактериях (*Escherichia coli*) с использованием традиционных протоколов, известных из уровня техники. Затем плазмидные ДНК линейаризовали ферментативным путем с использованием *EcoRI* и транскрибировали *in vitro* с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 в ходе "прерванной" транскрипции *in vitro* в присутствии смеси нуклеотидов и аналога кэп-структуры (m7GpppG) в условиях подходящего буфера. Полученные мРНК очищали с использованием PureMessenger® (CureVac, Тюбинген, Германия; WO 2008/077592 A1), и их использовали с целью проведения дополнительных экспериментов. NHP вводили RABV-G A в виде состава, содержащего протамин, и RABV-G B в виде состава, содержащего LNP. Композиции, содержащие более одной мРНК, кодирующей различные белки/антигены вируса гриппа, также могут быть получены в соответствии с процедурами, которые раскрываются в заявке согласно РСТ РСТ/EP2016/082487.

Пример состава, содержащего LNP.

Липидные наночастицы, катионные липиды и липиды, конъюгированные с полимером (конъюгаты PEG-липид), получали и тестировали в соответствии с общими процедурами, описанными в публикациях заявок согласно РСТ № WO 2015/199952, WO 2017/004143 и WO 2017/075531, раскрытие которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. мРНК, составленную в липидных наночастицах (LNP), получали с использованием ионизируемого аминокислотного липида (катионного липида), фосфолипидов,

холестерина и пегилированного липида. LNP получали следующим образом. Катионный липид, DSPC, холестерин и конъюгат PEG-липид солюбилизировали в этаноле при молярном соотношении, составляющем примерно 50:10:38,5:1,5 или 47,5:10:40,8:1,7. LNP для данных примеров содержат, например, катионное липидное соединение III-3 и вышеуказанные компоненты. Липидные наночастицы (LNP), содержащие соединение III-3, получали при соотношении мРНК и общих липидов, составляющем 0,03-0,04 вес./вес. Вкратце, мРНК разбавляли до 0,05-0,2 мг/мл в 10-50 мМ цитратном буфере, pH 4. Шприцевые насосы использовали для смешивания этанольного раствора липидов с водным раствором мРНК в соотношении от приблизительно 1:5 до 1:3 (об./об.) при суммарных значениях расхода выше 15 мл/мин. Затем этанол удаляли и внешний буфер заменяли на PBS посредством диализа. И наконец, липидные наночастицы фильтровали через стерильный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Размер липидных наночастиц составлял 60-90 нм в диаметре, что определили с помощью квазиупругого рассеяния света с использованием Malvern Zetasizer Nano (Malvern, Великобритания). Что касается других катионных липидных соединений, упоминаемых в настоящем описании, то способ их составления является аналогичным.

Пример 2. Экспрессия Ppluc после i.m. применения мРНК, составленной в LNP.

Экспрессию люциферазы (Ppluc) у мышей BALB/c определяли через 24 и 48 ч после внутримышечной инъекции (i.m.) в m. tibialis.

Таким образом, 0,1, 1 и 10 мкг мРНК, кодирующей Ppluc, составляли в LNP с получением соответствующего состава, содержащего LNP, в соответствии с табл. I. В качестве контроля служила несоставленная мРНК, кодирующая Ppluc (10 и 1 мкг). В момент времени 0 ч четырем мышам в каждой группе вводили путем трансфекции мРНК, кодирующую Ppluc, в соответствии со схемой, показанной в табл. I.

Таблица I (пример 2). Схема трансфекции

Группа	Обработка	Доза мРНК [мкг]	Путь введения (объем)	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-II-9	10	i.m. (25 мкл)	4
B	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-II-9	1	i.m. (25 мкл)	4
C	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-II-9	0,1	i.m. (25 мкл)	4
D	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-II-10	10	i.m. (25 мкл)	4
E	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-II-10	1	i.m. (25 мкл)	4
F	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-II-10	0,1	i.m. (25 мкл)	4
G	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-III-3	10	i.m. (25 мкл)	4
H	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-III-3	1	i.m. (25 мкл)	4
I	мРНК, кодирующая Ppluc, составленная в LNP-III-3	0,1	i.m. (25 мкл)	4
J	Несоставленная мРНК, кодирующая Ppluc	10	i.m. (25 мкл)	4
K	Несоставленная мРНК, кодирующая Ppluc	1	i.m. (25 мкл)	5

Через 24 и 48 ч проводили биолюминесцентную визуализацию мышей *in vivo* с использованием системы визуализации IVIS Lumina II через 10 мин после внутрибрюшинного введения люциферина при времени воздействия 60 с. Показатели биолюминесценции количественно определяли путем измерения фотонного потока (фотоны/секунда) в представляющей интерес области. Через 48 ч мышей умерщвляли, и отбирали мышцы, легкое, печень, селезенку, головной мозг, почку и сердце, подвергали шоковой заморозке на сухом льду и хранили при -80°C для дальнейшего анализа. Образцы органов лизировали в течение 3 мин при максимальной скорости в устройстве для лизиса тканей (Qiagen, Хильден, Германия). После этого добавляли 800 мкл лизирующего буфера, и полученные растворы подвергали воздействию в течение дополнительных 6 мин при максимальной скорости в устройстве для лизиса тканей. После 10 мин центрифугирования при 13500 об/мин при 4°C образцы надосадочной жидкости смешивали с буфером с люциферинном (25 мМ глицилглицина, 15 мМ MgSO₄, 5 мМ АТФ, 62,5 мкМ люциферина), и люминесценцию выявляли с помощью планшет-ридера Chameleon (Hidex).

Результаты.

На фиг. 1А и 1В можно увидеть, что мРНК, составленная в LNP, приводила к значительному увеличению уровня экспрессии белка после внутримышечного применения по сравнению с тем же количеством несоставленной мРНК через 24 ч (фиг. 1А) и 48 ч. (фиг. 1В). Наблюдалась дозозависимая экспрессия РрLuc.

Как показано на фиг. 2А - 2G, экспрессию РрLuc измеряли в лизатах органов через 48 ч после i.m. инъекции. Для каждой группы регистрировали относительные световые единицы люциферазной активности (RLU) в отдельных органах. Как и ожидалось, в месте инъекции наблюдалась сильная экспрессия люциферазы. Примечательно, что лишь при наивысшей дозе 10 мкг мРНК, составленной в LNP, экспрессию люциферазы выявляли в селезенке и в незначительной степени в печени, почке и легком (фиг. 2А - головной мозг, фиг. 2В - сердце, фиг. 2С - почка, фиг. 2D - печень, фиг. 2Е - легкое, фиг. 2F - мышца, фиг. 2G - селезенка).

Пример 3. Иммуногенность после внутримышечного (i.m.) применения мРНК, составленной в LNP мРНК, кодирующую HA, составленную в LNP, применяли для тестирования иммуногенности после внутримышечного (i.m.) применения. В частности, применяли GC-обогащенную последовательность мРНК, кодирующую HA H1N1 (Нидерланды/2009), составленную в LNP, как описано выше. Вакцинацию у 8 мышей BALB/c осуществляли путем внутримышечной инъекции в m. tibialis обеих задних конечностей (25 мкл на заднюю конечность) в соответствии со схемой вакцинации, показанной в табл. II. Согласно изложенному выше 10 мкг мРНК, кодирующей HA вируса гриппа, составляли в LNP (как описано выше) с получением соответствующего состава, содержащего LNP, для вакцинации; несоставленная мРНК (10 мкг) служила в качестве контроля.

Таблица II (пример 3). Схема вакцинации

Группа	Обработка	Доза РНК	Путь введения (объем)	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-II-9	10мкг	i.m. 25 мкл на заднюю конечность	8
B	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-II-10	10мкг	i.m. 25 мкл на заднюю конечность	8
C	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-III-3	10мкг	i.m. 25 мкл на заднюю конечность	8
D	Несоставленная мРНК, кодирующая HA	10мкг	i.m. 25 мкл на заднюю конечность	8
E	Буфер RiLa	-	i.m. 25 мкл на заднюю конечность	8

В день 0 проводили первичную вакцинацию. Животных вакцинировали буфером, служившим в качестве отрицательного контроля. В день 21 образец крови отбирали из ретробульбарного синуса, и проводили бустерную вакцинацию. Через 35 дней мышей умерщвляли, и отбирали образцы крови и органов (селезенки) для дальнейшего анализа. Спленоциты выделяли в день 35, и их стимулировали с использованием библиотеки пептидов HA с целью анализа Т-клеток.

При проведении анализов иммуногенности анализировали титры ингибирования гемагглютинации (HI) в образцах сыворотки крови через 3 недели после первичной вакцинации и через 2 недели после бустерной вакцинации. Значения частоты встречаемости активированных, HA-специфических, полифункциональных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (IFN- γ ⁺/TNF⁺) измеряли с помощью внутриклеточного окрашивания и проточной цитометрии. Для определения титров антител применяли ELISA.

Анализ ингибирования гемагглютинации.

Анализ ингибирования гемагглютинации (HI) применяли для анализа титров функциональных антител к HA. Образцы сыворотки крови мышей инактивировали нагреванием (56°C, 30 мин), инкубировали с каолином (Carl Roth, Германия) и предварительно адсорбировали на эритроцитах цыплят (CRBC; Lohmann Tierzucht, Германия). 50 мкл 2-кратных разведений предварительно обработанных образцов сыворотки крови инкубировали в течение 45 мин с 4 гемагглютинирующими единицами (HAU) инактивированного вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1) (NIBSC, Великобритания), и добавляли 50 мкл 0,5% CRBC. Титры HI определяли по величине, обратной наивысшему разведению сыворотки крови, способному ингибировать гемагглютинацию.

ELISA.

Выявление антигенспецифического иммунного ответа (В-клеточного иммунного ответа) проводили путем выявления антител IgG1 и IgG2a, специфичных к вирусу гриппа. Соответственно, образцы крови отбирали у вакцинированных мышей через 21 день после первичной вакцинации и через 14 дней после бустерной вакцинации, и из них получали образцы сыворотки крови. Планшеты MaxiSorb (Nalgene Nunc International) покрывали инактивированным вирусом. После блокирования с помощью 1×PBS, содержащего 0,05% Tween-20 и 1% BSA, планшеты инкубировали с разбавленной сывороткой крови мышей (как указано). Затем добавляли вторичное антитело, связанное с биотином (антитело к IgG1 и IgG2a мыши, Pharmingen). После промывания планшет инкубировали с конъюгатом пероксидазы хрена-стрептавидин, а затем измеряли превращение субстрата ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты)). Внутриклеточное окрашивание цитокинов

Индукцию антигенспецифических Т-клеток определяли через 14 дней после бустерной вакцинации с использованием внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). Спленоциты от вакцинированных и контрольных мышей выделяли и стимулировали с помощью библиотеки пептидов HA (PerMix™ вируса гриппа А (HA /Калифорния (H1N1)), JPT) и антитела к CD28 (BD Biosciences) в течение 6 ч при 37°C в присутствии ингибитора транспорта белков GolgiPlug, содержащего брэфельдин А (BD Biosciences). После стимуляции клетки промывали и окрашивали на внутриклеточные цитокины с помощью реагента Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для окрашивания применяли следующие антитела: CD8-APC H7 (1:100), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences), Thyl.2-FTTC (1:300), TNFα-PE (1:100), IFN-γ-APC (1:100) (eBioscience), и инкубировали с блокирующим антителом к FcγR в разведении 1:100. Для проведения различий между живыми и мертвыми клетками применяли краситель Aqua (Invitrogen). Клетки собирали с помощью проточного цитометра Canto II (BD Biosciences), и данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star).

Результаты.

Результаты анализов ингибирования гемагглютинации (HI).

мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP, приводила к образованию очень высоких титров HI уже после первичной вакцинации, что видно на фиг. 3А, т.е. все 3 различные LNP, содержащие мРНК, кодирующую HA, в дозе 10 мкг, индуцировали образование титров HI, превышающих пороговое значение 1:40, через 21 день после первичной вакцинации. В отличие от этого, несоставленная мРНК не обеспечивала достижение порогового значения 1:40. Титры HI увеличивались еще больше после бустерной вакцинации, что видно на фиг. 3В (14 дней после бустерной вакцинации). Пунктирной линией указан традиционно определяемый защитный титр HI, составляющий 1:40.

Результаты анализов ELISA.

мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP, индуцировала образование значительно более высоких титров функциональных антител как подтипа IgG1, так и подтипа IgG2a по сравнению с несоставленной мРНК уже после однократной i.m. инъекции, что видно на фиг. 4А - 4D, через 21 день после первичной вакцинации и через 14 дней после бустерной вакцинации.

Результаты анализов Т-клеток.

Как видно на фиг. 5А - 5С, наблюдалось, что мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP, в значительной степени индуцировала образование более высоких уровней антигенспецифических полифункциональных CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с несоставленной мРНК. Как и ожидалось, контрольная среда вообще не индуцировала ответ.

Пример 4. Иммуногенность после внутрикожного (i.d.) применения мРНК, составленной в LNP.

мРНК, кодирующую HA, составленную в LNP, применяли для тестирования иммуногенности после внутрикожного (i.d.) применения. В частности, применяли GC-обогащенную последовательность мРНК, кодирующую HA H1N1 (Нидерланды/2009), составленную в LNP, как описано выше.

Соответственно, 8 мышей в каждой группе вакцинировали внутрикожно в соответствии со схемой вакцинации, показанной в табл. III. Согласно изложенному выше 10 мкг мРНК, кодирующей HA, составляли в LNP (как описано выше) с получением соответствующего состава, содержащего LNP, для вакцинации; несоставленная мРНК, кодирующая HA (10 мкг), служила в качестве контроля.

Таблица III (пример 4). Схема вакцинации

Группа	Обработка	Доза РНК	Путь введения (объем)	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-II-9	10мкг	i.d. (25 мкл)	8
B	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-II-10	10мкг	i.d. (25 мкл)	8
C	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-III-3	10мкг	i.d. (25 мкл)	8
D	Несоставленная мРНК, кодирующая HA	10мкг	i.d. (25 мкл)	8
E	Буфер RiLa	-	i.d. (25 мкл)	8

В момент времени день 0 проводили первичную вакцинацию 8 мышей в каждой группе. В день 21 отбирали образец крови и проводили бустерную вакцинацию. Через 35 дней мышей умерщвляли, и отбирали образцы крови и органов (селезенки) для дальнейшего анализа.

При проведении анализов иммуногенности измеряли титр HI. Для определения титров антител применяли ELISA. Кроме того, через 14 дней после бустерной вакцинации оценивали иммунный ответ, опосредованный CD4 Т-клетками (CD4 Т-клетками, вырабатывающими IFN γ /TNF α), и иммунный ответ, опосредованный CD8 Т-клетками (CD8 Т-клетками, вырабатывающими IFN γ /TNF α , и CD8 Т-клетками, вырабатывающими CD107⁺ IFN γ). Индукцию антигенспецифических Т-клеток определяли с использованием внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). Анализы проводили так, как описано выше.

Результаты.

Результаты анализов ингибирования гемагглютинации (HI).

мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP, приводила к образованию очень высоких титров HI уже после первичной вакцинации по сравнению с несоставленной мРНК, что видно на фиг. 6A. Титры HI увеличивались еще больше после бустерной вакцинации, что видно на фиг. 6B.

Результаты анализов ELISA.

мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP, индуцировала образование значительно более высоких титров функциональных антител как подтипа IgG1, так и подтипа IgG2a по сравнению с несоставленной мРНК уже после однократной i.d. инъекции, что видно на фиг. 7A - 7D.

Результаты анализов Т-клеток.

Как видно на фиг. 8A - 8C, наблюдалось, что мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP, в значительной степени индуцировала образование более высоких уровней антигенспецифических полифункциональных CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с несоставленной мРНК. Как и ожидалось, контрольная среда вообще не индуцировала ответ.

Пример 5. Иммуногенность после внутримышечного (i.m.) применения 1 мкг мРНК, составленной в LNP.

В следующем примере последовательность мРНК, кодирующую HA (H1N1 (Нидерланды/2009)), в количестве 1 мкг в виде состава, содержащего LNP, применяли для тестирования иммуногенности после внутримышечного (i.m.) применения, как описано выше.

Соответственно, 8 мышей BALB/c в каждой группе вакцинировали внутримышечно в одну заднюю конечность в соответствии со схемой вакцинации, показанной в табл. IV. Согласно изложенному выше 1 мкг мРНК, кодирующей HA, составляли в LNP (как описано выше) с получением соответствующего состава, содержащего LNP, для вакцинации; несоставленная мРНК, кодирующая HA (10 мкг), служила в качестве контроля.

Таблица IV (пример 5). Схема вакцинации

Группа	Обработка	Доза РНК	Путь введения (объем)	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-III-3	1мкг	i.m. (25 мкл)	8
B	Несоставленная мРНК, кодирующая HA	10мкг	i.m. (25 мкл)	8
C	Буфер RiLa	-	i.m. (25 мкл)	8

В момент времени день 0 проводили первичную вакцинацию 8 мышей в каждой группе. В день 21 отбирали образец крови и проводили бустерную вакцинацию. Через 35 дней мышей умерщвляли и отбирали образцы крови и органов (селезенки) для дальнейшего анализа.

При проведении анализов иммуногенности измеряли титр HI. Для определения титров антител применяли ELISA. Кроме того, замороженные спленоциты стимулировали с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов HA, и Т-клеточные иммунные ответы оценивали путем измерения выработ-

ки IFN γ с использованием Elispot.

Результаты.

Результаты анализов иммуногенности.

1 мкг мРНК, кодирующей НА, составленной в LNP, индуцировал образование титров HI, превышающих пороговое значение 1:40, уже после первичной вакцинации, что видно на фиг. 9А. Титры HI увеличивались еще больше после бустерной вакцинации, что видно на фиг. 9В.

Результаты анализов ELISA.

1 мкг мРНК, кодирующей НА, составленной в LNP, индуцировал образование значительно более высоких титров функциональных антител как подтипа IgG1, так и подтипа IgG2a по сравнению с несоставленной мРНК уже после однократной i.m. инъекции (см. фиг. 10А- 10D).

Результаты анализов Т-клеток.

1 мкг мРНК, кодирующей НА, составленной в LNP, приводил к увеличению выработки IFN γ по сравнению с несоставленной мРНК. Как и ожидалось, контрольная среда вообще не индуцировала ответ (см. фиг. 11).

Пример 6. Вакцинация обезьян с использованием мРНК, кодирующей НА, и мРНК, кодирующей RABV-G.

В основе вакцины от бешенства лежала мРНК, кодирующая гликопротеин (RABV-G) пастеровского штамма (номер доступа BGenBank: AAA47218.1). Применяли оптимизированные конструкции мРНК (кодирующие RABV-G А и В), которые содержат идентичные ORF, но разные UTR. Вакцины на основе мРНК, кодирующей RABV-G, составленной с протамином, содержали мРНК, кодирующую RABV-G А. Вакцины на основе несоставленной или составленной в LNP мРНК, кодирующей RABV-G, содержали мРНК, кодирующую RABV-G В (как описано выше), если не указано иное.

Состав на основе РНК с протамином.

Для получения мРНК в комплексе с протамином ("состава RNActive®") полученные конструкции мРНК, кодирующих антигены, связывали в комплекс с протамином перед использованием в экспериментах по вакцинации *in vivo*. Образование комплекса мРНК предусматривает смесь из 50% свободной мРНК и 50% мРНК в комплексе с протамином при весовом соотношении 2:1. Сначала мРНК связывали в комплекс с протамином путем добавления лактатного раствора Рингера, содержащего протамин, к мРНК. После инкубирования в течение 10 мин, после образования стабильных комплексов, добавляли свободную мРНК, и конечную концентрацию вакцины регулировали с помощью лактатного раствора Рингера.

Для вакцинации применяли вакцины на основе мРНК, кодирующих НА, и мРНК, кодирующих RABV-G, составленных в LNP, полученные в предыдущем примере. Четверых нерожавших и небеременных макаков-крабоедов (*Macaca fascicularis*) вакцинировали путем внутримышечной инъекции в двуглавую мышцу бедра (500 мкл) в дни 1 и 29 с использованием мРНК, кодирующей НА, или мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (1 мкг или 10 мкг мРНК, описанной выше), или мРНК, кодирующей НА, или мРНК, кодирующей RABV-G, составленной с протамином (240 мкг). В качестве отрицательного контроля инъектировали буфер. Образцы сыворотки крови отбирали из бедренной вены в дни 0, 29 и 50.

Выявление антигенспецифического иммунного ответа проводили в дни 0, 29 и 50.

Анализ ингибирования гемагглютинации.

Анализ ингибирования гемагглютинации (HI) применяли для анализа титров функциональных антител к НА. Образцы сыворотки крови от приматов, отличных от человека (NHP), инкубировали с ферментом, разрушающим рецепторы (RDEII, Denka Seiken, Япония), при 37°C в течение ночи, инактивировали (56°C, 60 мин) и инкубировали с каолином. 50 мкл 2-кратных разведений предварительно обработанных образцов сыворотки крови инкубировали в течение 45 мин с 4 гемагглютинирующими единицами (HAU) инактивированного вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1) (NIBSC, Великобритания), и добавляли 50 мкл 0,5% CRBC. Титры HI определяли по величине, обратной наивысшему разведению сыворотки крови, способному ингибировать гемагглютинацию.

Анализ антител.

Титры НА-специфичных IgG в образцах сыворотки крови от NHP измеряли с помощью ELISA с использованием инактивированного вируса А/Калифорния/7/2009 (H1N1), предназначенного для покрытия (1 мкг/мл), и антитела к общему IgG человека, конъюгированного с HRP (ImmunoResearch), в качестве детектирующего антитела. Титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) в сыворотке крови анализировали в Eurovir® Hygiene-Labor GmbH, Германия, используя тест FAVN (тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами) и стандартный вирус для контрольного заражения CVS-11 в соответствии с протоколом WHO.

Анализ цитокинов.

Образцы крови NHP отбирали в дни 1 и 29 в случае иммунизации НА и в день 1 в случае иммунизации RABV-G у всех NHP до введения и через 6 и 24 ч после введения доз для определения биомаркеров воспаления (G-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 и TNF). Образцы плазмы крови анализи-

ровали с использованием набора PRCYTOMAG-40K на основе технологии Luminex (MD MILLIPORE).

Температура тела.

Температуру тела у NHP определяли путем ректального измерения непосредственно перед введением и через 0,5, 2, 6 и 24 ч после введения каждой дозы.

Результаты.

В качестве общего результата, однократное внутримышечное введение мРНК, составленной в LNP-III-3, в дозе 1 мкг неожиданно индуцировало образование титров защитных антител у всех вакцинированных приматов, отличных от человека, в двух случаях показаний - при бешенстве и гриппе.

Результаты анализа титров антител.

Результаты анализа титров нейтрализующих антител показаны на фиг. 12. Внутримышечная вакцинация NHP с использованием мРНК, кодирующей HA, составленной в LNP-III-3, неожиданно приводила к сильной индукции выработки нейтрализующих антител дозозависимым образом уже после первичной вакцинации с использованием мРНК, кодирующей HA, составленной в LNP-III-3.

Результаты анализа титров нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT).

Как показано на фиг. 13, внутримышечная вакцинация NHP с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, неожиданно приводила к сильной индукции выработки нейтрализующих антител дозозависимым образом уже после первичной вакцинации при использовании только 1 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, при этом демонстрировалось VNT > 1 МЕ/мл (медианное значение) после первичной вакцинации и примерно 50 МЕ/мл (медианное значение) после бустерной вакцинации (VNT, равные установленному WHO титру антител в 0,5 МЕ/мл или превышающие его, считаются коррелятом защиты). Однократная вакцинация с использованием 10 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, индуцировала образование медианного титра антител, составляющего 17 МЕ/мл. После второй вакцинации титры достигали медианного значения, составляющего 419 МЕ/мл.

Результаты анализа титров HI.

мРНК, кодирующая HA, составленная в LNP-III-3, приводила к образованию очень высоких титров HI уже после первичной вакцинации, что видно на фиг. 14. Более подробно, вакцинация с использованием 10 мкг мРНК, кодирующей HA, составленной в LNP-III-3, индуцировала у всех животных образование титров HI на уровне или выше титра HI 1:40, который считается защитным у человека. В этом случае также титры HI увеличивались еще больше после второй (бустерной) вакцинации, что видно на фиг. 14.

Среди животных, которые получали 1 мкг мРНК, кодирующей HA, составленной в LNP-III-3, 3 из 4 животных требовалась вторая вакцинация для достижения защитного титра, тогда как ни одно из животных, получавших 240 мкг мРНК, кодирующей HA, составленной с протамином, не демонстрировало выявляемых титров HI.

Результаты анализа цитокинов.

Концентрации системных цитокинов после вакцинации с использованием мРНК, составленной в LNP-III-3, оставались ниже уровня выявления в случае с IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ и TNF или не увеличивались в случае с IL-2, IL-8 и G-CSF (фиг. 15A - 15D). Важно, что с помощью составов, содержащих LNP, индуцировались более низкие концентрации провоспалительных цитокинов TNF, IFN- γ и IL-6 по сравнению с составами, содержащими протамин, которые в целом хорошо переносятся людьми.

Результаты измерения температуры тела и другие результаты.

Внутримышечное применение мРНК, составленной в LNP-III-3, у приматов, отличных от человека, не оказывало влияния на температуру тела или массу тела [данные не показаны]. В местах инъекций появлялись лишь незначительные покраснение и/или отечность у 1 из 4 животных в каждой группе, получавшей мРНК, кодирующую HA, составленную в LNP-III-3, которые проходили в течение 24-96 ч после инъекции, а после вакцинации с использованием составов на основе мРНК, кодирующей RABV-G, поствакцинальные реакции в месте инъекции отсутствовали [данные не показаны]. Подводя итог, следует отметить, что мРНК, составленная в LNP-III-3, хорошо переносилась у NHP.

Пример 7. Иммуногенность после внутримышечного (i.m.) применения низких доз мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP.

мРНК, кодирующую RABV-G, составленную в LNP, в количестве 0,5 мкг применяли для тестирования иммуногенности после внутримышечного (i.m.) применения. Применяемая последовательность показана под SEQ ID NO: 224276.

Соответственно, каждую из мышей BALB/c вакцинировали в соответствии со схемой вакцинации, показанной в табл. Va, внутримышечно в одну заднюю конечность. Несоставленная мРНК, кодирующая RABV-G (40 мкг), служила в качестве контроля.

Таблица Va (пример 7). Схема вакцинации

Линия, пол	Количество мышей	Обработка, РНК/мышь	Путь введения, объем	Схема иммунизации	Отбор крови из ретробульбарного синуса
BALB/c, самки	10	5 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	10	1 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	10	0,5 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	10	0,1 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	10	0,05 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	10	0,01 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	10	40 мкг несоставленной мРНК, кодирующей RABV-G	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	6	PBS	i.m., 2 x 25 мкл	d0, d21	d1, d21, d35
BALB/c, самки	6	32 мкг RActive (состава, содержащего протамин)	i.d., 2 x 50 мкл	d0, d21	d1, d21, d35

В момент времени день 0 проводили первичную вакцинацию 8 мышей в каждой группе, а спустя день отбирали образцы крови. В день 21 отбирали образец крови и проводили бустерную вакцинацию. Первичную вакцинацию и бустерную вакцинацию проводили в разные задние конечности, т.е. соответственно в левую и правую задние конечности. Через 35 дней мышей умерщвляли и отбирали образцы крови и органов (селезенки и печени) для дальнейшего анализа.

При проведении анализов иммуногенности VNT измеряли так, как описано выше, т.е. титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT) в сыворотке крови анализировали в Eurovir® Hygiene-Labor GmbH, Германия, используя тест FAVN (тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами) и стандартный вирус для контрольного заражения CVS-11 в соответствии с протоколом WHO.

Оценивали иммунный ответ, опосредованный CD4 Т-клетками (CD4 Т-клетками, вырабатывающими IFN γ /TNF α), и иммунный ответ, опосредованный CD8 Т-клетками (CD8 Т-клетками, вырабатывающими IFN γ /TNF α , и CD8 Т-клетками, вырабатывающими CD107⁺ IFN γ). Анализы проводили так, как описано выше. Проводили гистологический анализ образцов печени от животных, вакцинированных 5 мкг LNP или контрольными буферами. Уровни ALT/AST в сыворотке крови исследовали в образцах сыворотки крови, полученных в d1 и d21. AST/ALT и печень анализировали в mfd Diagnostics GmbH, Германия.

Результаты.

Результаты анализа титров нейтрализующих антител к вирусу бешенства (VNT).

Как показано на фиг. 16A - 16B, внутримышечная вакцинация мышей с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, неожиданно приводила к сильной индукции выработки нейтрализующих антител дозозависимым образом уже после первичной вакцинации с использованием 0,5 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3. Стандартное значение согласно WHO, составляющее 0,5 МЕ/мл, на графиках указано пунктирной линией. Соответственно, дозы в 5 мкг, 1 мкг и неожиданно также 0,5 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, индуцировали ответы, которые были значительно более сильными по сравнению с 40 мкг несоставленной мРНК после первичной вакцинации (фиг. 16A). Индукция образования VNT после первичной вакцинации с использованием 0,05 мкг и 0,01 мкг мРНК, составленной в LNP-III-3, отсутствовала. 0,1 мкг мРНК, составленной в LNP-III-3, после первичной вакцинации у 5 из 10 животных индуцировала образование VNT, равных стандартному значению согласно WHO или превышающих его. VNT даже увеличивались после бустерной вакцинации (фиг. 16B). Поскольку уровни VNT на фиг. 16A/16B оказались еще более высокими, но

были ограничены вследствие экспериментального выявления VNT (разбавленные образцы все еще оказывались насыщенными), то проводили аналогичный эксперимент, и были разработаны новые анализы VNT (см. схему вакцинации, показанную в табл. Vb). Буфер PBS служил в качестве контроля.

Таблица Vb (пример 7). Схема вакцинации

Линия, пол	Количество мышей	Обработка, РНК/мышь	Путь введения, объем	Схема иммунизации	Отбор крови из ретробульбарного синуса
BALB/c, самки	14	0,1 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d21, d35
BALB/c, самки	14	0,3 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d21, d35
BALB/c, самки	14	0,9 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл	d0, d21	d21, d35
BALB/c, самки	6	PBS	i.m., 2 x 25 мкл	d0, d21	d21, d35

На фиг. 61A - 61B подтверждено, что внутримышечная вакцинация мышей с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, неожиданно приводила к очень сильной индукции выработки нейтрализующих антител дозозависимым образом уже после первичной вакцинации с использованием 0,1 мкг, 0,3 мкг и 0,9 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3. Стандартное значение согласно WHO, составляющее 0,5 МЕ/мл, на графиках указано пунктирной линией. Соответственно, дозы в 0,1 мкг, 0,3 мкг и 0,9 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, индуцировали ответы, которые были значительно более сильными по сравнению с предыдущими экспериментами с несоставленной мРНК после первичной вакцинации. VNT даже увеличивались после бустерной вакцинации (фиг. 60B; данные отображают медианное значение, с проверкой с помощью критерия Манна-Уитни).

Результаты.

Результаты анализов Т-клеток.

Т-клеточные ответы наблюдались у мышей, дважды иммунизированных 5, 1 и 0,5 мкг, что видно на фиг. 17A - 17C. Соответственно, уже 0,5 мкг мРНК, составленной в LNP, в значительной степени индуцировали высокие уровни антигенспецифических полифункциональных CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с несоставленной мРНК. Отрицательный контроль DMSO, как и ожидалось, вообще не индуцировал ответ, что указано в виде пунктирной линии на графиках.

Результаты анализа поражения печени.

Проводили гистологический анализ образцов от животных, которым вводили 5 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, в LNP и контрольный буфер. Ни у одного из протестированных животных каких-либо патологических результатов не наблюдали. Уровни AST увеличивались в день 1 после вакцинации с использованием наивысшей дозы LNP (5 мкг), но со временем уменьшались и возвращались к исходным уровням в день 21 (см. фигуры 18A - 18D). Пунктирными линиями указаны стандартные уровни AST/ALT у мышей. Лишь у некоторых животных в день 21 уровни AST были повышены, у всех же остальных животных уровни AST/ALT были без патологических изменений.

Пример 8. Эксперимент по вакцинации с использованием комбинации мРНК, кодирующих НА четырех различных вирусов гриппа С целью вакцинации 9 мышам в каждой группе дважды внутримышечно инъектировали композицию, содержащую мРНК, составленную в LNP, кодирующую НА 4 различных штаммов вируса гриппа: А/Калифорния/7/2009 (H1N1), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), В/Брисбен/60/2008 (В) и А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1). Соответственно, четыре мРНК смешивали при соотношении 1:1:1:1, а затем составляли так, как описано выше. В качестве контроля инъектировали четырехвалентную вакцину Fluagix 2015-2016, расщепленную вирусную вакцину, содержащую 4 различных инактивированных штамма вируса гриппа (А/Калифорния/7/2009, А/Швейцария/9715293/2013, В/Пхукет/3073/2013 и В/Брисбен/60/2008), предназначенную для активной иммунизации с целью предупреждения заболевания, вызываемого подтипами вируса гриппа А и вирусами типа В. В качестве отрицательного контроля инъектировали лактатный буферный раствор Рингера.

Выявление специфического иммунного ответа на НА (В-клеточного иммунного ответа) осуществляли путем выявления антител IgG2a, направленных против конкретного вируса гриппа. Соответственно, образцы крови отбирали у вакцинированных мышей через три недели после вакцинации, и получали образцы сыворотки крови. Планшеты MaxiSorb (Nalgene Nunc International) покрывали конкретным рекомбинантным белком НА. После блокирования с помощью 1xPBS, содержащего 0,05% Tween-20 и 1% BSA, планшеты инкубировали с разбавленной сывороткой крови мышей (как указано). Затем добавляли

вторичное антитело, связанное с биотином (антитело к IgG2a мыши, Pharmingen). После промывания планшет инкубировали с конъюгатом пероксидазы хрена-стрептавидин с последующим добавлением реагента Amplex UltraRed (Invitrogen) и дальнейшим количественным определением флуоресцентного продукта.

Результаты.

Результаты, показанные на фигурах 19A-19D, демонстрируют, что НА-специфичные антитела IgG, направленные против различных вирусов гриппа, могут быть выявлены после однократной внутримышечной вакцинации с использованием вакцины на основе LNP, содержащей четыре различных мРНК, каждая из которых кодирует антиген НА отличного от других вируса гриппа (вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1; фиг. 19A), вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2; фиг. 19B), вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (В, фиг. 19C) и вируса гриппа А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1, фиг. 19D).

Эти данные являются доказательством того, что антигены, кодируемые мРНК, например различных вирусов гриппа, могут быть объединены в одной композиции/вакцине.

В отличие от Fluarix, поливалентная вакцина на основе мРНК, составленной в LNP-III-3, индуцировала иммунные ответы с образованием антител IgG2a у ранее не подвергавшихся экспериментам животных в отношении всех подтипов, и при этом низкая доза мРНК неожиданно была иммуногенной у мышей уже после однократной внутримышечной инъекции.

Пример 9. Эксперимент по вакцинации с использованием комбинации мРНК, кодирующих НА и НА четырех различных вирусов гриппа.

С целью вакцинации 8 мышам в каждой группе внутримышечно инъецировали композицию, содержащую мРНК, составленную в LNP, кодирующую НА 4 различных штаммов вируса гриппа: А/Калифорния/7/2009 (H1N1) и/или А/Нидерланды/602/2009 (H1N1), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), В/Брисбен/60/2008 и А/Вьетнам/1203/2004 (H5N1) и НА 3 различных штаммов вируса гриппа: А/Калифорния/7/2009 (H1N1), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и В/Брисбен/60/2008.

В другом эксперименте по вакцинации 8 мышам в каждой группе внутримышечно инъецировали композицию, содержащую последовательности мРНК, кодирующие НА вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1) и/или А/Нидерланды/602/2009 (H1N1), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), В/Брисбен/60/2008 и В/Пхукет/3073/2013 и НА3 различных штаммов вируса гриппа: А/Калифорния/7/2009 (H1N1), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и В/Брисбен/60/2008.

В качестве контроля инъецировали тетравалентную вакцину Influvac® 2016-2017, расщепленную вирусную вакцину, содержащую 4 различных инактивированных штамма вируса гриппа (А/Калифорния/7/2009, А/Гонконг/4801/2014, В/Пхукет/3073/2013 и В/Брисбен/60/2008), предназначенную для активной иммунизации с целью предупреждения заболевания, вызываемого подтипами вируса гриппа А и вирусами типа В. В качестве отрицательного контроля инъецировали лактатный буферный раствор Рингера.

Выявление специфического иммунного ответа на НА (В-клеточного иммунного ответа) осуществляли путем выявления антител IgG2a, направленных против конкретного вируса гриппа, как описано выше.

Специфические иммунные ответы на НА (В-клеточные иммунные ответы), направленные против конкретного вируса гриппа, определяли с помощью анализа ингибирования НА (NAI).

Пример 10. Синтез соединения I-3.

Раствор 6-(2'-гексилдеканоилокси)гексан-1-оля (2,4 г), уксусной кислоты (0,33 г) и 4-аминобутан-1-оля (0,23 г) в метилхлориде (20 мл) обрабатывали триацетоксиборгидридом натрия (1,3 г) в течение двух часов. Раствор промывали водным раствором бикарбоната натрия. Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали, и растворитель удаляли. Остаток пропускали через колонку с силикагелем, используя градиент метанол/метилхлорид (0-8/100-92%), с получением соединения 3 в виде бесцветного масла (0,4 г).

Пример 11. Синтез иллюстративного конъюгата PEG-липид.

Получали пегилированный липид IVa ("PEG-DMA"), где n приблизительно соответствует среднему значению в диапазоне количества повторяющихся звеньев этиленоксида в пегилированном липиде.

Синтез IVa-1 и IVa-2.

К раствору миристиновой кислоты (6 г, 26 ммоль) в толуоле (50 мл) добавляли оксалилхлорид (39 ммоль, 1,5 эквивалента, 5 г) при к.т. Соответственно, 39 ммоль оксалилхлорида представляют собой 1,5 молярного эквивалента относительно исходного материала миристиновой кислоты (26 ммоль $\times$ 1,5=39 ммоль). После нагревания полученной смеси при 70°C в течение 2 ч данную смесь концентрировали. Остаток поглощали в толуоле и снова концентрировали. Остаточное масло добавляли посредством шприца к концентрированному раствору аммиака (20 мл) при 10°C. Реакционную смесь фильтровали и промывали водой. Белое твердое вещество высушивали под вакуумом. Необходимый продукт получали в виде белого твердого вещества (3,47 г, 15 ммоль, 58,7%).

Синтез IVa-3.

К суспензии 20-2 (3,47 г, 15 ммоль) в THF (70 мл) порциями добавляли алюмогидрид лития (1,14 г,

30 ммоль) при к.т. в течение периода времени 30 мин. Затем смесь осторожно нагревали с обратным холодильником (масляная баня при 65°C) в течение ночи. Смесь охлаждали до 5°C, и добавляли 9-гидрат сульфата натрия. Смесь перемешивали в течение 2 ч, фильтровали через слой целита, промывали с помощью 15% MeOH в DCM (200 мл). Фильтрат и полученные после промывания продукты объединяли и концентрировали. Остаточное твердое вещество высушивали под вакуумом. Необходимый продукт получали в виде белого твердого вещества (2,86 г, 13,4 ммоль, 89,5%).

Синтез IVa-4.

К раствору миристиновой кислоты (3,86 г, 16,9 ммоль) в бензоле (40 мл) и DMF (1 капля) добавляли оксалилхлорид (25,35 ммоль, 1,5 эквивалента, 3,22 г) при к.т. Соответственно, 25,35 ммоль оксалилхлорида представляют собой 1,5 молярного эквивалента относительно исходного материала миристиновой кислоты (16,9 ммоль $\times$ 1,5=25,35 ммоль). Смесь перемешивали при к.т. в течение 1,5 ч. Нагревали при 60°C в течение 30 мин. Смесь концентрировали. Остаток поглощали в толуоле и снова концентрировали. Остаточное масло (светло-желтого цвета) поглощали в 20 мл бензола и добавляли посредством шприца к раствору 20-3 (2,86 г, 13,4 ммоль) и триэтиламина (3,53 мл, 1,5 эквивалента) в бензоле (40 мл) при 10°C. Соответственно, 3,53 мл триэтиламина представляют собой 1,5 молярного эквивалента относительно 13,4 ммоль 20-3, т.е. 50% молярный избыток данного реагента по сравнению с исходным материалом для данной стадии. После добавления полученную смесь перемешивали при к.т. в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли водой и pH доводили до 6-7 с помощью 20% H₂SO₄. Смесь фильтровали и промывали водой. Получали белесоватое твердое вещество. Неочищенный продукт перекристаллизовывали из метанола. В результате этого получали необходимый продукт в виде грязно-белого твердого вещества (5,65 г, 13 ммоль, 100%).

Синтез IVa-5.

К суспензии 20-4 (5,65 г, 13 ммоль) в THF (60 мл) порциями добавляли алюмогидрид лития (0,99 г, 26 ммоль) при к.т. в течение периода времени 30 мин. Затем смесь осторожно нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Смесь охлаждали до 0°C и добавляли 9-гидрат сульфата натрия. Смесь перемешивали в течение 2 ч, затем фильтровали через прокладку из целита и силикагеля и промывали сперва с помощью эфира. Фильтрат становился мутным и образовывался осадок. В результате фильтрации получали белое твердое вещество. Твердое вещество перекристаллизовывали из MeOH и получали бесцветное кристаллическое твердое вещество (2,43 г).

Затем прокладку из целита и силикагеля промывали с помощью 5% MeOH в DCM (400 мл), а затем 10% MeOH в DCM с 1% триэтиламина (300 мл). Фракции, содержащие необходимый продукт, объединяли и концентрировали. Получали белое твердое вещество. Твердое вещество перекристаллизовывали из MeOH и получали бесцветное кристаллическое твердое вещество (0,79 г). Полученные выше два твердых вещества (2,43 г и 0,79 г) объединяли и высушивали под вакуумом (3,20 г, 60%). ¹H-ЯМР (CDCl₃ при 7,27 ppm) δ : 2,58 (t-подобный, 7,2 Гц, 4H), 1,52-1,44 (m, 4H), 1,33-1,24 (m, 44H), 0,89 (t-подобный, 6,6 Гц, 6H), 2,1-1,3 (очень широкий, 1H).

Синтез IVa.

К раствору 20-5 (7 ммоль, 2,87 г) и триэтиламина (30 ммоль, 4,18 мл) в DCM (100 мл) добавляли раствор mPEG-NHS (от NOF, 5,0 ммоль, 9,97 г, MW PEG примерно 2000, n=приблизительно 45) в DCM (120 мл). Через 24 ч реакционный раствор промывали водой (300 мл). Водную фазу экстрагировали дважды с помощью DCM (100 мл $\times$ 2). DCM-экстракты объединяли, промывали рассолом (100 мл). Органическую фазу высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, частично концентрировали. Концентрированный раствор (около 300 мл) охлаждали при примерно 15°C. В результате фильтрации получали белое твердое вещество (1,030 г, непрореагировавший исходный амин). К фильтрату добавляли Et₃N (1,6 ммоль, 0,222 мл, 4 эквивалента) и уксусный ангидрид (1,6 ммоль, 164 мг). Смесь перемешивали при к.т. в течение 3 ч, а затем концентрировали с получением твердого вещества. Остаточное твердое вещество очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (0-8% метанол в DCM). В результате этого получали необходимый продукт в виде белого твердого вещества (9,211 г). ¹H-ЯМР (CDCl₃ при 7,27 ppm) δ : 4,19 (s, 2H), 3,83-3,45 (m, 180-200H), 3,38 (s, 3H), 3,28 (t-подобный, 7,6 Гц, 2H, CH₂N), 3,18 (t-подобный, 7,8 Гц, 2H, CH₂N), 1,89 (s, 6,6 H, вода), 1,58-1,48 (m, 4H), 1,36-1,21 (m, 48-50H), 0,88 (t-подобный, 6,6 Гц, 6H).

Пример 12. Эксперимент по вакцинации с использованием комбинации мРНК, кодирующих НА различных вирусов гриппа, составленных в LNP-III-3.

Самок мышей BALB/c иммунизировали внутримышечно (i.m.) с использованием вакцинных композиций на основе мРНК, составленных в LNP-III-3, используя дозы, пути применения и схемы вакцинации, указанные в таблице А (последовательности мРНК приведены в соответствии с примером 1). В качестве отрицательного контроля одной группе мышей инъецировали буфер (лактатный раствор Рингера, RiLa). В качестве положительного контроля одну группу мышей вакцинировали одобренной к применению вакциной от гриппа CInflusplit® Tetra 2016/2017; А/Калифорния/07/2009, А/Гонконг/4801/2014, В/Брисбен/60/2008, В/Пхукет/3073/2013). Всем животным инъецировали соответствующую композицию в день 0 и день 21. Образцы крови отбирали в дни 21, 35 и 49 с целью определения титров связывающих

антител (с использованием ELISA) и титров блокирующих антител (с использованием анализа HI). Т-клеточные ответы анализировали с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием спленоцитов, выделенных в день 49. Подробные описания проведенных экспериментов приведены ниже.

Таблица А. Режим иммунизации (пример 12)

Группа	Количество мышей	Группы обработки (контроль и композиции на основе мРНК)	Доза/состав	Обработка
A	6	Буфер RiLa	-	i.m., 2 x 25 мкл
B	6	Influsplit®	1/10 дозы для человека	i.m., 2 x 25 мкл
C	9	H1N1 А/Нидерланды/602/2009 H3N2 А/Гонконг/4801/2014 НА В/Брисбен/60/2008 НА В/Пхукет/3073/2013	1 мкг (по 0,25 мкг каждой), составленная в LNP- <u>III-3</u>	i.m., 1 x 25 мкл
D	9	H1N1 А/Нидерланды/602/2009 H3N2 А/Гонконг/4801/2014 НА В/Брисбен/60/2008 НА В/Пхукет/3073/2013	4 мкг (по 1 мкг каждой), составленная в LNP- <u>III-3</u>	i.m., 1 x 25 мкл
E	9	H1N1 А/Калифорния/07/2009 H3N2 А/Гонконг/4801/2014 НА В/Брисбен/60/2008 НА В/Пхукет/3073/2013	1 мкг (по 0,25 мкг каждой), составленная в LNP- <u>III-3</u>	i.m., 1 x 25 мкл
F	9	H1N1 А/Калифорния/07/2009 H3N2 А/Гонконг/4801/2014 НА В/Брисбен/60/2008 НА В/Пхукет/3073/2013	4 мкг (по 1 мкг каждой), составленная в LNP- <u>III-3</u>	i.m., 1 x 25 мкл

12.1. Определение антител IgG1 и IgG2a, специфичных к белку НА, с помощью ELISA.

Анализ ELISA проводили по сути так, как это общеизвестно из уровня техники или как описано выше. ELISA проводили в отношении каждого антигена, содержащегося в вакцинной композиции на основе мРНК (указанного в табл. А). Результаты показаны на фиг. 25 (H1N1 (А/Калифорния/7/2009)), фиг. 27 (H3N2 (А/Гонконг/4801/2014)), фиг. 29 (вирус гриппа В (В/Брисбен/60/2008)) и фиг. 30 (вирус гриппа В (В/Пхукет/3073/2013)).

12.2. Анализ ингибирования гемагглютинации (HI).

В 96-луночном планшете полученные образцы сыворотки крови смешивали с антигеном НА H1N1 (А/Калифорния/07/2009 (H1N1); NIBSC) или антигеном НА H3N2 и эритроцитами (4% эритроцитов; Lohmann Tierzucht). В присутствии антител, нейтрализующих НА, может наблюдаться ингибирование гемагглютинации эритроцитов. Результатом анализа был наиболее низкий уровень титрованной сыворотки крови, приводивший к видимому ингибированию гемагглютинации. Результаты показаны на фиг. 26 ((H1N1 (А/Калифорния/7/2009)) и фиг. 28 (H3N2 (А/Гонконг/4801/2014))).

12.3. Выявление Т-клеточных ответов.

Спленоциты от вакцинированных мышей выделяли в соответствии со стандартным протоколом, известным из уровня техники. Вкратце, выделенные селезенки измельчали посредством пропускания через сито для фильтрации клеточных суспензий и промывали с помощью PBS/1% FBS с последующим лизисом эритроцитов. После стадии тщательного промывания с помощью PBS/1% FBS спленоциты высевали в 96-луночные планшеты (2×10^6 клеток на лунку). Клетки стимулировали с использованием пула перекрывающихся 15-мерных пептидов H1N1 (А/Калифорния/07/2009) с целью определения ответов, опосредованных CD8⁺ Т-клетками, или стимулировали рекомбинантным белком НА с целью определения ответов, опосредованных CD4⁺ Т-клетками. После стимуляции клетки промывали и окрашивали на внутриклеточные цитокины с помощью реагента Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для окрашивания применяли следующие антитела: CD3-FITC (1:100), CD8-PE-Cy7 (1:200), TNF-PE (1:100), IFN γ -APC (1:100) (eBioscience), CD4-BD Horizon V450 (1:200) (BD Biosciences) и инкубировали с блокирующим антителом к Fc γ R в разведении 1:100. Для проведения различий между

живыми и мертвыми клетками применяли краситель Aqua (Invitrogen). Клетки собирали с помощью проточного цитометра Canto II (Beckton Dickinson). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью пакета программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты для CD4⁺ Т-клеток показаны на фиг. 31; результаты для CD8⁺ Т-клеток показаны на фиг. 32.

Результаты.

Данные показывают, что антитела IgG1 и IgG2a могут быть выявлены после вакцинации с использованием комбинированных вакцин на основе мРНК, составленных в LNP. Примечательно, что ко всем антигенам, кодируемым мРНК, содержащимися в соответствующей комбинации, могут быть выявлены специфичные антитела IgG1 и IgG2a, что демонстрирует, что все мРНК, содержащиеся в соответствующих композициях, транслируются в белок и запускают гуморальный иммунный ответ у мышей, как показано на фиг. 25 (H1N1 (А/Калифорния/7/2009)), фигуре 27 (H3N2 (А/Гонконг/4801/2014)), фиг. 29 (вирус гриппа В (В/Брисбен/60/2008)) и фиг. 30 (вирус гриппа В (В/Пхукет/3073/2013)). По сравнению с мышами, вакцинированными одобренной к применению вакциной Influsplit®, ответы были более сильными или по меньшей мере в равной степени сильными в отношении всех тестируемых антигенов.

Функциональные нейтрализующие антитела были продемонстрированы в отношении H1N1 (А/Калифорния/7/2009) и H3N2 (А/Гонконг/4801/2014) (см. фиг. 26 и 28). По сравнению с мышами, вакцинированными одобренной к применению вакциной Influsplit®, индукция выработки функциональных нейтрализующих антител была более выраженной и более продолжительной в случае использования комбинированных вакцин на основе мРНК. Примечательно, что тестируемая комбинированная вакцина на основе мРНК часто обеспечивала достижение титров HI>40 уже после одной иммунизации.

На фиг. 31 показано, что тестируемые комбинации мРНК вирусов гриппа стимулировали стойкие ответы, опосредованные CD4⁺ Т-клетками, вырабатывающими IFN γ /TNF- α , в селезенке иммунизированных мышей ко всем антигенам.

На фиг. 32 показано, что тестируемые комбинации мРНК вирусов гриппа стимулировали стойкие ответы, опосредованные CD8⁺ Т-клетками, вырабатывающими IFN- γ /TNF- α , в селезенке иммунизированных мышей, что показано в случае с H1N1 (А/Калифорния/07/2009), тогда как, что примечательно, одобренная к применению вакцина Influsplit® не индуцировала ответы, опосредованные CD8⁺ Т-клетками.

В целом эти данные демонстрируют, что комбинированные вакцины на основе мРНК, кодирующих антигены НА, полученные из различных вирусов гриппа (типов А и типов В), составленных в LNP, индуцируют сильные и продолжительные гуморальные иммунные ответы, а также опосредованные Т-клетками клеточные иммунные ответы.

Пример 13. Эксперимент по вакцинации с использованием комбинации мРНК, кодирующих НА различных вирусов гриппа, составленных в LNP-III-3

Самок мышей BALB/с иммунизировали внутримышечно (i.m.) с использованием вакцинных композиций на основе мРНК, составленных в LNP-III-3, используя дозы, пути применения и схемы вакцинации, указанные в табл. В (последовательности мРНК приведены в соответствии с примером 1). В качестве отрицательного контроля одной группе мышей инъектировали буфер (лактатный раствор Рингера, RiLa). В качестве положительного контроля одну группу мышей вакцинировали одобренной к применению вакциной от гриппа (Fluarix®; А/Калифорния/07/2009, А/Швейцария/9715293/2013, В/Брисбен/60/2008, В/Пхукет/3073/2013). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови отбирали в дни 21, 35 и 49 с целью определения титров связывающих антител (с использованием ELISA), титров блокирующих антител (с использованием реакции HI) и определения титров вируснейтрализующих антител (VNT). Т-клеточные ответы анализировали с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием спленоцитов, выделенных в день 49. Подробные описания проведенных экспериментов приведены ниже.

Таблица В. Режим иммунизации (пример 13)

Группа	Количество мышей	Группа обработки (контроль/композиции на основе мРНК)	Доза/состав	Обработка
A	6	Буфер RiLa	-	i.m., 2 x 25 мкл
B	6	Fluarix®	1/10 дозы для человека	i.m., 2 x 25 мкл
C	9	H1N1 A/Нидерланды/602/2009 H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA B/Брисбен/60/2008 H5N1 A/Вьетнам/1203/2004	0,25 мкг (по 0,06 мкг каждой), составленная в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл
D	9	H1N1 A/Нидерланды/602/2009 H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA B/Брисбен/60/2008 H5N1 A/Вьетнам/1203/2004	1 мкг (по 0,25 мкг каждой), составленная в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл
E	9	H1N1 A/Нидерланды/602/2009 H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA B/Брисбен/60/2008 H5N1 A/Вьетнам/1203/2004	4 мкг (по 1 мкг каждой), составленная в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл

13.1. Определение антител IgG1 и IgG2a, специфичных к белку HA, с помощью ELISA.

Анализ ELISA проводили по сути так, как это общеизвестно из уровня техники или как описано выше. ELISA проводили в отношении каждого антигена, содержащегося в вакцинной композиции на основе мРНК (указанного в табл. В). Результаты показаны на фиг. 33 (H1N1 (А/Калифорния/7/2009)), фиг. 35 (H3N2 (А/Гонконг/4801/2014)), фиг. 37 (вирус гриппа В (В/Брисбен/60/2008)) и фиг. 38 (H5N1 (А/Вьетнам/1203/2004)).

13.2. Анализ ингибирования гемагглютинации (HI) и анализ нейтрализации вируса.

Анализ HI проводили, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 34 ((H1N1 (А/Калифорния/7/2009)) и фиг. 36 (H3N2 (А/Гонконг/4801/2014))).

13.3. Выявление Т-клеточных ответов.

Спленоциты от вакцинированных мышей выделяли в соответствии со стандартным протоколом, известным из уровня техники. Эксперимент по ICS проводили по сути так, как описано в примере 12. Результаты для CD4⁺ Т-клеток показаны на фиг. 39; результаты для CD8⁺ Т-клеток показаны на фиг. 40.

Результаты.

Данные показывают, что антитела IgG1 и IgG2a могут быть выявлены после вакцинации с использованием комбинированных вакцин на основе мРНК, составленных в LNP. Примечательно, что ко всем антигенам, кодируемым мРНК, содержащимися в соответствующей комбинации, могут быть выявлены специфичные антитела IgG1 и IgG2a, что демонстрирует, что все мРНК, содержащиеся в соответствующих композициях, транслируются в белок и запускают гуморальный иммунный ответ у мышей, как показано на фиг. 33 (H1N1 (А/Калифорния/7/2009)), фиг. 35 (H3N2 (А/Гонконг/4801/2014)), фиг. 37 (вирус гриппа В (В/Брисбен/60/2008)) и фиг. 38 (H5N1 (А/Вьетнам/1203/2004)). По сравнению с мышами, вакцинированными одобренной к применению вакциной Fluarix®, ответы зачастую были более сильными или по меньшей мере в равной степени сильными в отношении всех тестируемых антигенов даже при наиболее низкой тестируемой дозе вакцины на основе мРНК.

Функциональные нейтрализующие антитела были продемонстрированы в отношении H1N1 (А/Калифорния/7/2009) и H3N2 (А/Гонконг/4801/2014) (см. фиг. 34 и 36). По сравнению с мышами, вакцинированными одобренной к применению вакциной Fluarix®, индукция выработки функциональных нейтрализующих антител была более выраженной и более продолжительной в случае использования комбинированных вакцин на основе мРНК. Примечательно, что тестируемая комбинированная вакцина на основе мРНК обеспечивала достижение титров HI>40 уже после одной иммунизации при наивысшей тестируемой дозе.

На фиг. 39 показано, что тестируемые комбинации мРНК вирусов гриппа стимулировали стойкие ответы, опосредованные CD4⁺ Т-клетками, вырабатывающими IFN γ /TNF- α , в селезенке иммунизированных мышей ко всем антигенам, при этом ответы были более сильными, чем наблюдавшиеся в случае с Fluarix®.

На фиг. 40 показано, что тестируемые комбинации мРНК вирусов гриппа стимулировали стойкие ответы, опосредованные CD8⁺ Т-клетками, вырабатывающими IFN- γ /TNF- α , в селезенке иммунизированных мышей, что показано в случае с H1N1 (А/Калифорния/07/2009) и H5N1 (А/Вьетнам/1203/2004), тогда как, что примечательно, одобренная к применению вакцина Fluarix® не индуцировала ответы, опосредованные CD8⁺ Т-клетками.

В целом эти данные демонстрируют, что комбинированные вакцины на основе мРНК, кодирующих антигены НА, полученные из различных вирусов гриппа (типов А и типов В), составленных в LNP, индуцируют сильные и продолжительные гуморальные иммунные ответы, а также опосредованные Т-клетками клеточные иммунные ответы.

Пример 14. Эксперимент по вакцинации с использованием мРНК, кодирующей нейраминидазу NA1 вируса гриппа, составленной в LNP-III-3.

Самок мышей BALB/c иммунизировали внутримышечно (i.m.) с использованием вакцинных композиций на основе мРНК, составленных в LNP-III-3, используя дозы, пути применения и схемы вакцинации, указанные в табл. С (последовательности мРНК приведены в соответствии с примером 1). В качестве отрицательного контроля одной группе мышей инъецировали буфер (лактатный раствор Рингера, RiLa). В качестве положительного контроля одной группе мышей i.m. инъецировали InflusplitTetra® 2016/2017 (А/Калифорния/7/2009 (H1N1); А/Гонконг/4801/2014 (H3N2); В/Брисбен/60/2008; В/Пхукет/3073/2013). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 21. Образцы крови отбирали в дни 21, 35 и 49 для определения иммунных ответов. Т-клеточные ответы анализировали с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием спленоцитов, выделенных в день 49.

Таблица С. Режим иммунизации (пример 14)

Порядок	Количество мышей	Группа обработки (контроль/композиции на основе мРНК)	Доза/состав	Путь введения, объем
A	6	RiLa	-	i.m., 1 x 25 мкл
B	6	Influsplit Tetra® 2016/2017	1/10 дозы для человека	i.m., 2 x 25 мкл
C	6	NA1 А/Калифорния/07/2009	1 мкг; составленная в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл
D	6	NA1 А/Калифорния/07/2009	2,5 мкг; составленная в LNP-III-3	i.m., 1 x 25 мкл

14.1. Определение иммунных ответов на NA1 (А/Калифорния/7/2009).

Функциональные NA-специфичные антитела анализировали с использованием иммуноферментного анализа лектинсвязывающей способности (ELLA), который проводили по сути так, как ранее было описано в уровне техники. ELLA проводили в 96-луночных планшетах, покрытых высокомолекулярным гликопротеиновым субстратом фетуином. NA отщепляет концевые группы сиаловой кислоты от фетуина, делая доступной галактозу - предпоследний сахарный компонент. Агглютинин арахиса (PNA) представляет собой лектин, характеризующийся специфичностью в отношении галактозы и поэтому степень десиаилирования можно количественно определить с использованием конъюгата PNA-пероксидазы хрена с последующим добавлением хромогенного субстрата для пероксидазы. Измеряемая оптическая плотность пропорциональна активности NA. Для измерения титров функциональных антител, ингибирующих NA (N1), образцы сыворотки крови в серийном разведении инкубировали на планшетах, покрытых фетуином, с вирусом А/Калифорния/7/2009 (H1N1) (предварительно обработанным Triton-X-100). Величина, обратная наивысшему разведению сыворотки крови, которое приводит к $\geq 50\%$ ингибированию активности NA, обозначается как титр антител N1. Результат показан на фиг. 41.

Для определения Т-клеточных ответов эксперимент по ICS проводили по сути так, как указано в общих чертах выше. Клетки стимулировали с использованием смеси пептидов, специфичных к NA и определяли ответы, опосредованные CD8⁺ Т-клетками и ответы, опосредованные CD4⁺ Т-клетками. Результаты показаны на фиг. 42 (CD4⁺) и на фиг. 43 (CD8⁺).

Результаты.

На фиг. 41 показано, что сильные и специфические функциональные иммунные ответы можно было выявить у мышей, вакцинированных с использованием мРНК, кодирующей NA1 А/Калифорния/2009, составленной в LNP, тогда как у мышей, которым инъецировали вакцину Influsplit®, можно было определить только слабые ответы.

На фиг. 42 и 43 показано, что тестируемая вакцина на основе мРНК, кодирующей NA1, стимулировала стойкие ответы, опосредованные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, в селезенке иммунизированных мышей, тогда как, что примечательно, одобренная к применению вакцина Influsplit® не индуцировала ответы, опосредованные CD8⁺ Т-клетками.

Пример 15. Эксперимент по вакцинации мышей с использованием мРНК, кодирующих антиген вируса бешенства, составленных в LNP-III-3 и оценивание провоспалительной среды при инъекции флуоресцентно меченной мРНК (F*-мРНК), составленной в LNP-III-3, у мышей и анализ состава и статуса активации иммунных клеток в дренирующих лимфатических узлах (dLN) F*-мРНК соответствует флуоресцентно меченной мРНК, кодирующей PpLuc (60% UTP - 40% 5-аминоаллил-UTP), которая вследствие метки не может транслироваться в белок (SEQ ID NO: 224286).

Для осуществления эффективных адаптивных иммунных ответов после вакцинации требуется активация врожденной иммунной системы. Соответственно, в соответствии с настоящим изобретением

мРНК, составленную в LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением тестировали в отношении активности (временной) индукции ею образования провоспалительных цитокинов и хемокинов после i.m. введения мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, у мышей.

Мышей BALB/c (n=6/группа) вакцинировали i.m. с использованием 10 мкг несоставленной (мРНК) или составленной в LNP мРНК, кодирующей RABV-G (мРНК/LNP), или контрольного буфера. Мышечные ткани, dLN и образцы сыворотки крови выделяли через 4, 14, 24 и 96 ч после i.m. применения и содержание цитокинов или хемокинов измеряли в белковых лизатах и образцах сыворотки крови с помощью панели цитометрических гранул (СВА). Результаты показаны на фиг. 44-49.

Для того чтобы выяснить, приводит ли формирование провоспалительной среды к активации иммунных клеток и изменениям в их составе, анализировали количество и статус активации лейкоцитов в dLN. Для того чтобы удостовериться, что любой наблюдаемый эффект не зависел от белка, кодируемого мРНК, применяли флуоресцентно меченную мРНК, которая не способна транслироваться (F*-мРНК). Мышам BALB/c (n=3/группа) инъецировали i.m. в обе задние конечности 10 мкг несоставленной (F*мРНК) или составленной в LNP F*мРНК (F*мРНК/LNP) или буфер. Правый и левый dLN выделяли через 4, 24 и 48 ч после i.m. применения и анализировали по отдельности с помощью проточной цитометрии. Количество клеток в каждой популяции (50A) и частота встречаемости активированных иммунных клеток (50B) в dLN показаны на фиг. 50A/B.

Результаты.

На фиг. 44-46 показано, что мРНК, кодирующая RABV-G, составленная в LNP, индуцирует выраженное, но временное высвобождение провоспалительных цитокинов TNF и IL-6, достигающих пиковых концентраций через 14 ч после инъекции. С точки зрения безопасности данного подхода важно, что высвобождение цитокинов было локальным, а системное высвобождение TNF (в сыворотке крови) не наблюдалось. В сыворотке крови выявили временное 10-кратное снижение концентраций IL-6 по сравнению с местом инъекции, которые возвращались к исходному уровню через 96 ч. после инъекции (см. фиг. 46). На фиг. 47-49 показано, что мРНК, кодирующая RABV-G, составленная в LNP, индуцирует выраженное, но временное высвобождение провоспалительных хемокинов. Среди хемокинов со значительно повышенным уровнем экспрессии были MIP-1 β , который играет ключевую роль в хемотаксисе макрофагов, моноцитов и NK-клеток, а также CXCL-9, который осуществляет привлечение Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток в очаг воспаления. Более того, имело место временное повышение концентраций MCP-1, MIP-1 α и CXCL1, которые мобилизуют множество иммунных клеток, таких как моноциты, макрофаги, дендритные клетки и нейтрофилы. Также в сыворотке крови наблюдалось временное увеличение концентраций описанных выше хемокинов, но в значительно меньшей степени по сравнению с наблюдаемым в месте инъекции или в dLN. На фиг. 50A и 50B показано, что внутримышечная инъекция F*-мРНК, составленной в LNP, индуцировала сильное увеличение насыщенности клетками, которое отсутствовало после инъекции несоставленной F*-мРНК. Наиболее сильное повышение количества клеток наблюдалось через 24 ч после инъекции, за исключением NK-клеток, количество которых увеличивалось в течение продолжительного периода времени. Среди лейкоцитов наибольшее увеличение количества приходится на CD11b⁺ Gr1⁺ клетки, состоящие главным образом из моноцитов и гранулоцитов. Увеличение насыщенности клетками в dLN сопровождалось сильной активацией клеток как адаптивной, так и врожденной иммунной системы, которая достигала пика через 24 ч после инъекции, когда более 90% Т- и В-клеток экспрессировали маркер активации CD69. В своей совокупности эти результаты позволяют предположить, что i.m. инъекция вакцин на основе мРНК, составленных в LNP, индуцирует формирование обширного, но временного локального иммуностимулирующего окружения, которое имеет важное значение для индукции сильных адаптивных иммунных ответов.

Пример 16. Эксперимент по вакцинации приматов, отличных от человека, с использованием мРНК, кодирующих антиген вируса бешенства, составленных в LNP-III-3.

Для вакцинации применяли вакцины на основе мРНК, кодирующих RABV-G, составленных в LNP-III-3, полученные в предыдущем примере.

Исследования с использованием макаков-крабоедов (*Macaca fascicularis*) проводили в Envigo CRS, S.A.U., Санта-Перпетуа-де-Могода, Испания. Животные происходили из Вьетнама, были выращенными в неволе, нерожавшими и небеременными. В начале обработки возраст животных составлял 2,5-3,5 года, а масса тела 2,2-3,3 кг. NHP вакцинировали i.m. в дни 0 и 28 в двуглавую мышцу бедра путем введения однократной дозы 500 мкл. Вакцинацию NHP утвержденной к применению вакциной от бешенства для человека Rabipur® (Novartis) проводили i.m., используя полную дозу для человека в соответствии со схемой доконтактной профилактики в дни 0, 7 и 28 или с сокращенной схемой в дни 0 и 28. VNT у вакцинированных обезьян анализировали так, как описано выше. Т-клеточные ответы (CD4⁺ и CD8⁺) анализировали так, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 51-55.

Результаты.

На фиг. 51 показано, что уже однократная i.m. иммунизация с использованием 1 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, индуцировала образование стойких VNT на уровне или выше защитного титра 0,5 МЕ/мл у всех животных в день 28 после первичной вакцинации. Наблюдаемая им-

муногенность была дозозависимой: при 10-кратном повышении дозы мРНК достигали 10-кратного повышения VNT.

На фиг. 52 показано, что наблюдаемые первичные ответы можно было стимулировать с помощью второй вакцинации с использованием мРНК, кодирующей RABV-G, проводимой в день 28, что приводило к 20-кратному увеличению VNT. Мониторинг титров антител на протяжении шести месяцев демонстрировал, что после первоначального снижения титры стабилизировались на защитном уровне, составляющем приблизительно 40 МЕ/мл для дозы мРНК 10 мкг и приблизительно 4 МЕ/мл для дозы мРНК 1 мкг.

На фиг. 53 показано наличие В-клеточной памяти. Для демонстрации наличия В-клеточной памяти через пять месяцев после завершения вакцинации проводили третью вакцинацию (вторичную вакцинацию) и спустя пять дней измеряли VNT. В обеих дозовых группах наблюдалось очень быстрое 10-кратное увеличение VNT, что демонстрировало индукцию вакциной на основе мРНК сильного вторичного иммунного ответа.

На фиг. 54 показано, что вакцина на основе мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, индуцировала после однократной вакцинации образование защитных титров нейтрализующих антител, составляющих более 0,5 МЕ/мл, которые при сравнении с титрами в случае использования утвержденной к применению вакцины от бешенства Rabipur® в полной дозе для человека были сопоставимы с ними или превышали их. Через четыре недели после однократной вакцинации средние значения VNT, измеренные у обезьян, вакцинированных мРНК, были существенно увеличенными по сравнению с обезьянами, вакцинированными Rabipur®. Бустерная вакцинация в день 28 обеспечивала дополнительное увеличение уровней VNT, которые у обезьян, вакцинированных мРНК, достигали значений до 1000 МЕ/мл, превосходя VNT, образование которых индуцируется Rabipur®, в 10 раз. Эти данные позволяют предположить, что вакцинация с использованием двух инъекций вакцины на основе мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, является достаточной для индукции защиты от инфекций, вызываемых вирусом бешенства. В случае дозы 100 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, даже однократное введение может быть достаточным для индукции образования защитных и устойчивых титров антител. Это является особенным преимуществом над современной вакциной от бешенства Rabipur®, которую необходимо применять три раза.

На фиг. 55 и 56 показано, что вакцина на основе мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP, в соответствии с настоящим изобретением индуцировала специфические клеточные ответы после вакцинации, при этом данные эффекты не наблюдались у животных, вакцинированных Rabipur®. RABV-G-специфические IFN- γ^+ /IL-2 $^+$ CD4 $^+$ Т-клетки (фиг. 55) наблюдались при использовании обеих доз вакцины на основе мРНК, тогда как RABV-G-специфические IFN- γ^+ /GrzB $^+$ CD8 $^+$ Т-клетки (фиг. 56) выявлялись у животных, получавших дозу 100 мкг. Примечательно, что у обезьян, получавших Rabipur®, наблюдались лишь незначительные клеточные ответы.

Пример 17. Эксперимент по вакцинации приматов, отличных от человека, с использованием мРНК, кодирующих антигены HA вируса гриппа H1N1 или вируса гриппа H3N2, составленных в LNP-III-3.

Для вакцинации применяли вакцину на основе мРНК, кодирующей HA вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1), или мРНК, кодирующей HA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2), составленной в LNP-III-3, описанную в предыдущем примере.

Исследования с использованием макаков-крабоедов (*Macaca fascicularis*) проводили в Envigo CRS, S.A.U., Санта-Перпетуа-де-Могода, Испания. Животные происходили из Вьетнама, были выращенными в неволе, нерожавшими и небеременными. В начале обработки возраст животных составлял 2,5-3,5 года, а масса тела 2,2-3,3 кг. ННР вакцинировали 10 мкг вакцины на основе H1N1-НА либо H3N2-НА и измеряли функциональные антитела к соответствующим вирусам с помощью анализов ингибирования гемагглютинации (HI). В качестве контроля группу животных вакцинировали с использованием Fludax® в полной дозе для человека.

Ранее не подвергавшихся экспериментам ННР вакцинировали i.m. с использованием 10 мкг вакцины на основе H1N1-НА либо H3N2-НА в дни 0 и 28 путем введения однократной дозы 500 мкл в двуглавую мышцу бедра. Функциональные антитела к соответствующим вирусам измеряли с помощью анализов ингибирования гемагглютинации (HI). Результаты показаны на фиг. 57-59. Т-клеточные ответы анализировали так, как описано выше. Результаты показаны на фиг. 60А-В.

Результаты.

На фиг. 57 показано, что уже однократная i.m. иммунизация с использованием 10 мкг мРНК, кодирующей H1N1-НА, или мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, индуцировала у всех животных в день 28 после первичной вакцинации образование титров HI на уровне или выше титра 1:40, который считается защитным у человека.

На фиг. 58 показано, что наблюдаемые первичные ответы можно было стимулировать с помощью второй вакцинации с использованием соответствующей мРНК, кодирующей H1N1-НА, в день 28, что приводило к существенному увеличению измеряемых титров HI. Мониторинг титров антител в течение более 12 месяцев (544 дней) демонстрировал, что после первоначального снижения титры стабилизируются.

вались на защитном уровне титра HI в отношении H1N1, составляющем приблизительно 640. Важно, что у всех вакцинированных животных поддерживались титры HI на уровне явно выше защитного предела до завершения периода наблюдения, составлявшего один год после первичной вакцинации, что подтвердило значительную продолжительность антигенспецифического гуморального иммунного ответа на HA H1N1.

На фиг. 59 показано, что вакцина на основе мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, индуцирует образование защитных титров HI в отношении H3N2 после однократной вакцинации, при этом ответы сопоставимы с ответами при использовании сильной вакцины от гриппа Flud® (сезон 2016/17; содержит поверхностные антигены HA и нейраминидазу вирусов гриппа штаммов H1N1, H3N2 и В/Брисбен, а также адъювант MF59C.1). Однократная доза вакцины на основе мРНК, составленной в LNP, была достаточной для индукции образования защитных титров HI в отношении H3N2, сопоставимых с титрами, образование которых индуцируется Flud® в полной дозе для человека. Вторая доза дополнительно увеличивала титры HI, при этом для вакцины на основе мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, наблюдался значительно более сильный эффект.

На фиг. 60 показано, что вакцина на основе мРНК, кодирующей H3N2-НА, составленной в LNP, в соответствии с настоящим изобретением индуцировала специфические ответы, опосредованные $IFN-\gamma^+/IL-2^+$ $CD4^+$ Т-клетками и ответы, опосредованные $TNF\alpha^+/IL-2^+$ $CD4^+$ Т-клетками, после вакцинации, при этом данные эффекты не наблюдались у животных, вакцинированных Flud®.

Пример 18. Эксперимент по вакцинации приматов, отличных от человека, с использованием комбинации мРНК, кодирующих различные антигены вируса гриппа.

Приматов, отличных от человека (NHP), иммунизировали (6 животных на группу) с использованием вакцин на основе мРНК, составленных в LNP-III-3, используя дозы, пути применения и схемы вакцинации, указанные в табл. D (последовательности мРНК предпочтительно в соответствии с примером 1). В качестве вакцин применяли композицию на основе мРНК, содержащую четыре антигена HA ("тетравалентную HA"), или композицию на основе мРНК, содержащую семь антигенов HA+NA (четыре HA, три NA; гептавалентную или "семивалентную HA+NA"). Всех животных вакцинировали в день 0 и день 28. Образцы крови отбирали в дни 0, 14, 28, 56, 77 и 84 для определения иммунных ответов с образованием антител. Т-клеточные ответы анализировали с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использованием выделенных спленоцитов. Анализы иммунных ответов проводили по сути так, как описано выше (ELLA, анализ HI, ELISA, ICS, VNT).

Таблица D. Режим иммунизации

Обработка	Доза/состав	Путь введения, объем
HA H1N1 A/Калифорния/7/2009 HA H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA В/Брисбен/60/2008 HA В/Пхукет/3073/2013 "Тетравалентная HA"	40 мкг* LNP-III-3	i.m., 500 мкл
HA H1N1 A/Калифорния/7/2009 HA H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA В/Брисбен/60/2008 HA В/Пхукет/3073/2013 "Тетравалентная HA"	200 мкг* LNP-III-3	i.m., 500 мкл
NA1 A/Калифорния/07/2009 NA2 A/Гонконг/4801/2014 NA В/Брисбен/60/2008 HA H1N1 A/Калифорния/7/2009 HA H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA В/Брисбен/60/2008 HA В/Пхукет/3073/2013 "Семивалентная HA+NA"	70 мкг* LNP-III-3	i.m., 500 мкл
NA1 A/Калифорния/07/2009 NA2 A/Гонконг/4801/2014 NA В/Брисбен/60/2008 HA H1N1 A/Калифорния/7/2009 HA H3N2 A/Гонконг/4801/2014 HA В/Брисбен/60/2008 HA В/Пхукет/3073/2013 "Семивалентная HA+NA"	350 мкг* LNP-III-3	i.m., 500 мкл
Утвержденные к применению вакцины	1 доза для человека	i.m., 500 мкл

*Каждая мРНК представлена в композиции в равной степени, т.е. 4×10 мкг, 4×50 мкг, 7×10 мкг или 7×50 мкг.

Пример 19. Клиническое исследование вакцины от гриппа на основе мРНК, составленной в LNP-III-3.

Для демонстрации безопасности и эффективности вакцинной композиции от гриппа на основе мРНК было предпринято рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое клиническое испытание (фазы I).

Для клинического исследования получали РНК, соответствующую стандартам GMP, используя утвержденный способ в соответствии с требованиями GMP, в котором реализованы различные процедуры контроля качества в отношении уровня ДНК и уровня РНК, что подробно описано в WO 2016/180430 A1.

В ходе клинического испытания людям-добровольцам (взрослым субъектам в возрасте 18-45 лет) по меньшей мере два раза внутримышечно (i.m.) инъектировали композицию на основе мРНК, содержащую одну мРНК, кодирующую один антиген вируса гриппа, указанный в данном документе ("моновалентную", H3N2 A/Гонконг/4801/2014), или композицию на основе мРНК, содержащую четыре антигена HA вируса гриппа, указанных в данном документе ("тетравалентную HA"), или композицию на основе мРНК, содержащую четыре антигена HA и три антигена NA вируса гриппа, указанных в данном документе ("семивалентную HA+NA"), или композицию на основе мРНК, содержащую множество антигенов HA и множество антигенов NA вируса гриппа, указанных в данном документе ("поливалентную HA+NA"). Кроме того, обрабатывали группу добровольцев преклонного возраста (взрослые преклонного возраста >65 лет). План исследований указан в табл. E-H ниже.

Таблица Е. План клинического исследования с использованием тетра валентной вакцины от гриппа НА

Группа	Обработка	Общее количество мРНК на дозу (мкг)	Состав/путь введения	Объем клинической дозы (мл)	Количество взрослых субъектов-людей
1	Контроль (солевой раствор)	0	-	0,5	30
2	Тетравалентная НА	20*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
3	Тетравалентная НА	40*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
4	Тетравалентная НА	80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
5	Контрольная утвержденная к применению вакцина	-	i.m.	0,5	30
6, преклонный возраст	Вакцина на основе мРНК	40 или 80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30

*Каждая мРНК представлена в композиции в равной степени.

Таблица F. План клинического исследования с использованием моновалентной вакцины от гриппа (H3N2)

Группа	Обработка	Общее количество мРНК на дозу (мкг)	Состав/путь введения	Объем клинической дозы (мл)	Количество взрослых субъектов-людей
1	Контроль (солевой раствор)	0*	i.m.	0,5	30
2	Моновалентная НА	20*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
3	Моновалентная НА	40*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
4	Моновалентная НА	80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
5	Контрольная утвержденная к применению вакцина	-	i.m.	0,5	30
6, преклонный возраст	Моновалентная НА	40 или 80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30

*Каждая мРНК представлена в композиции в равной степени.

Таблица Г. План клинического исследования с использованием гептавалентной/семивалентной вакцины от гриппа HA+NA

Группа	Обработка	Общее количество мРНК на дозу (мкг)	Состав/путь введения	Объем клинической дозы (мл)	Количество взрослых субъектов-людей
1	Контроль (солевой раствор)	0	i.m.	0,5	30
2	Семивалентная HA+NA	20*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
3	Семивалентная HA+NA	40*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
4	Семивалентная HA+NA	80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
5	Контрольная утвержденная к применению вакцина	-	i.m.	0,5	30
6, преклонный возраст	Семивалентная HA+NA	40 или 80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30

*Каждая мРНК представлена в композиции в равной степени.

Таблица Н. План клинического исследования с использованием поливалентной вакцины от гриппа HA+NA

Группа	Обработка	Общее количество мРНК на дозу (мкг)	Состав/путь введения	Объем клинической дозы (мл)	Количество взрослых субъектов-людей
1	Контроль (солевой раствор)	0	i.m.	0,5	30
2	Поливалентная HA+NA	20*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
3	Поливалентная HA+NA	40*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
4	Поливалентная HA+NA	80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30
5	Контрольная утвержденная к применению вакцина	-	i.m.	0,5	30
6, преклонный возраст	Поливалентная HA+NA	40 или 80*	LNP-III-3 (i.m.)	0,5	30

*Каждая мРНК представлена в композиции в равной степени.

С целью оценки профиля безопасности вакцинных композиций от гриппа в соответствии с настоящим изобретением осуществляли мониторинг состояния субъектов после введения (показатели жизненно важных функций, оценка переносимости в месте введения вакцины, общий анализ крови).

Эффективность иммунизации анализировали путем определения титров HI и анализа ELLA. Образцы крови отбирали в день 0 в качестве исходного уровня и после завершения вакцинации. Образцы сыворотки крови анализировали в отношении функциональных антител (анализ HI, ELLA, VNT (тест FAVN)). Кроме того, проводили анализ RFFIT с целью анализа присутствия ранних VNT с помощью быстрого теста ингибирования очагов флуоресценции с использованием адаптированного к культуре клеток стандартного штамма вируса для контрольного заражения CVS 11, рекомендованного Всемирной орга-

низацией по охране здоровья животных. Вкратце, инактивированные нагреванием образцы сыворотки крови тестировали в серийных двукратных разведениях в отношении их способности к нейтрализации 100 50% инфицирующих доз CVS для тканевой культуры. Разведенные образцы сыворотки крови инкубировали с вирусом в течение приблизительно 70 мин при 37°C (в инкубаторе с водяной рубашкой при 5% CO₂). В каждую лунку добавляли 30000 клеток ВНК-21. Инфицированные культуры клеток инкубировали в течение 22 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки фиксировали с использованием смеси 80% ацетона/20% PBS при -20°C в течение 10 мин и окрашивали с помощью антирабического глобулина, конъюгированного с FITC. Планшеты дважды промывали с использованием PBS, а избыток PBS удаляли. Культуры клеток оценивали как положительные или отрицательные в отношении наличия вируса бешенства, выявляемого по FITC-положительным сигналам. Клетки, оцененные как отрицательные, в лунках, обработанных образцами сыворотки крови, представляли нейтрализацию вируса бешенства. Каждый тест RFFIT предусматривал стандартную сыворотку крови согласно WHO или OIE (положительную эталонную сыворотку крови), которая служила в качестве эталона для стандартизации анализа. Нейтрализующую активность тестируемых образцов сыворотки крови рассчитывали относительно стандартной сыворотки крови, утвержденной WHO и ее выражали в международных единицах/мл (МЕ/мл).

Кроме того, подгруппу здоровых субъектов подвергали контрольному заражению живым вирусом гриппа или плацебо путем перорального введения. У субъектов после контрольного заражения отслеживали симптомы болезни, ассоциированной с гриппом, инфекцию и иммунные ответы.

Пример 20. Стабильность LNP (LNP-III-3) при хранении при 5°C в течение 3 месяцев.

Для сравнения иммуногенности и реактогенности мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3, которую хранили при 5°C в течение 3 месяцев, иммуногенность оценивали путем определения гуморальных ответов, в том числе выработки функциональных антител и клеточных иммунных ответов через две недели после бустерной вакцинации (см. табл. J).

Титры RABV-G-специфичных антител определяли с помощью анализа нейтрализации вирусов, как описано выше.

Таблица J. Протокол иммунизации (для примера 20)

Линия, пол	Количество мышей	Обработка, РНК/мышь	Путь введения, объем	Схема иммунизации	Отбор крови из ретробульбарного синуса
BALB/c, самки	8	0,9 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (свежеполученная партия LNP)	i.m. 1 x 25 мкл	d0, d21	d0, d21, d35
BALB/c, самки	8	0,9 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (партия LNP, которую хранили при 5°C в течение трех месяцев)	i.m. 1 x 25 мкл	d0, d21	d0, d21, d35
BALB/c, самки	8	0,3 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (свежеполученная партия LNP)	i.m. 1 x 25 мкл	d0, d21	d0, d21, d35
BALB/c, самки	8	0,9 мкг мРНК, кодирующей RABV-G, составленной в LNP-III-3 (партия LNP, которую хранили при 5°C в течение трех месяцев)	i.m. 1 x 25 мкл	d0, d21	d0, d21, d35
BALB/c, самки	6	PBS	i.m. 2 x 25 мкл	d0, d21	d0, d21, d35

На фиг. 62A и 62B видно, что хранение при 5°C в течение трех месяцев неожиданно не повлияло отрицательно на стабильность LNP, т.е. такие LNP продемонстрировали лишь незначительные эффекты *in vivo* и этого было достаточно для образования очень высоких VNT после первичной и после бустерной вакцинации.

Пример 21. Анализ токсичности LNP (LNP-III-3).

Целью данного примера было оценивание токсичности LNP в соответствии с настоящим изобретением (LNP- III-3). С этой целью проводили несколько исследований токсичности *in vivo* в различных животных моделях (например, на мышах, крысах или кроликах) с использованием различных доз мРНК (например, 1, 10, 40, 100 или 200 мкг). Результаты показали, что LNP в соответствии с настоящим изобретением не продемонстрировали значительной токсичности *in vivo*, о чем свидетельствовал анализ локальных реакций, болевых ощущений, потребления пищи, массы тела, массы органов, показатели клинико-биохимического анализа (т.е. отсутствие неблагоприятных изменений, связанных с тестируемым веществом) и общего анализа крови (т.е. отсутствие неблагоприятных изменений, связанных с тестируемым веществом). Лишь незначительные локальные реакции, такие как покраснения и отеки, т.е.

нормальные реакции на вакцины, которые обычно появляются в пределах 1-3 дней, были обнаружены у меньшей части животных, вакцинированных, например 10 и 100 мкг.

Пример 22. Эксперимент по вакцинации хорьков с использованием комбинации мРНК, кодирующих НА различных вирусов гриппа, составленных в LNP-III-3.

Хорьков (*Mustela putorius furo*; в возрасте 6-12 месяцев) иммунизировали внутримышечно (i.m.) с использованием вакцинных композиций на основе мРНК, содержащих конструкции мРНК, кодирующие H1N1 А/Калифорния/07/2009, H3N2 А/Гонконг/4801/2014, НА В/Брисбен/60/2008 и НА В/Пхукет/3073/2013, составленные в LNP-III-3, в данном документе называемых "тетравалентной вакциной на основе мРНК" (см. табл. К). Соответствующие последовательности мРНК приведены согласно примеру 1. В качестве положительного контроля одну группу хорьков вакцинировали одобренной к применению вакциной от гриппа (Fluad® Tetra 2016/2017). Всем животным инъецировали соответствующую композицию в день 0 и день 21. Образцы крови отбирали в дни 0, 21, 35 и 49 с целью определения титров блокирующих антител к каждому кодируемому антигену (с использованием анализа HI, описанного выше и анализа MN). Результаты показаны на фиг. 63.

Таблица К. Режим иммунизации (пример 22)

Группа	Количество хорьков	Группы обработки	Доза	Обработка
A	3	Тетравалентная вакцина на основе мРНК	160 мкг (по 40 мкг каждой мРНК)	i.m., 1 x 250 мкл
B	3	Тетравалентная вакцина на основе мРНК	40 мкг (по 10 мкг каждой мРНК)	i.m., 1 x 250 мкл
C	3	Тетравалентная вакцина на основе мРНК	10 мкг (по 2,5 мкг каждой мРНК)	i.m., 1 x 250 мкл
D	6	Fluarix®	Полная доза для человека	i.m., 2 x 250 мкл

Результаты.

Как показано на фиг. 63, титры блокирующих антител выявляли в отношении каждого кодируемого антигена. На фиг. 63A и B показано, что в случае с H1N1 и H3N2 можно было наблюдать выраженный дозозависимый ответ и что образование защитных титров HI (>40) индуцировалось после второй вакцинации во всех тестируемых группах. Примечательно, что в группе, получавшей дозу 160 мкг и группе, получавшей дозу 80 мкг, защитные титры HI достигались уже после первичной вакцинации. На фиг. 63C и D показано, что защитные титры HI также можно было наблюдать в отношении В/Брисбен при концентрации 160 мкг. Титры MN наблюдались в отношении В/Пхукет (фиг. 63D).

В целом данные результаты демонстрируют, что применяемая в данном документе тетравалентная вакцина на основе мРНК индуцирует иммунные ответы с образованием функциональных антител ко всем четырем антигенам. Более того, иммунные ответы с образованием антител были сопоставимы с иммунными ответами, наблюдаемыми в случае использования одобренной к применению вакцины Fluad, что демонстрирует огромный потенциал вакцины, составленной в LNP, в соответствии с настоящим изобретением.

Пример 23. Эксперимент по контрольному заражению хорьков с использованием комбинации мРНК, кодирующих НА различных вирусов гриппа, составленных в LNP-III-3.

Хорьков (*Mustela putorius fura*, в возрасте 6-12 месяцев) иммунизировали внутримышечно (i.m.) с использованием тетра валентной вакцины на основе мРНК, составленной в LNP-III-3, из примера 22. В качестве положительного контроля использовали группы, вакцинированные с использованием Fluad® Tetra 2016/2017. В качестве отрицательного контроля использовали группы, которым инъецировали плацебо. В каждой группе обрабатывали 6 животных ("фаза иммунизации" в табл. L).

Для имитации инфицирования вирусом гриппа из прошлого сезона некоторые группы также инфицировали вирусом гриппа перед проведением эксперимента по вакцинации. Группы 5-8 инфицировали вирусом H3N2 А/Фукуи/20/2004, а группы 13-16 инфицировали вирусом В/Массачусетс/2/2012 Ямагатской линии (см. "первичную фазу" в табл. L).

После иммунизации хорьков подвергали интратрахеальному контрольному заражению вирусом гриппа. Группы 5-8 подвергали контрольному заражению вирусом НА А/Нидерланды/602/2009, а группы 13-16 подвергали контрольному заражению вирусом В/Брисбен/60/2008 Викторианской линии (см. "фазу контрольного заражения" в табл. L). В дни 1-3 после контрольного заражения вирусом хорьков подвергали анализу в отношении вирусной нагрузки (нос, глотка, мазки) и параметров состояния здоровья (повышенная температура, масса тела). Через 4 дня после контрольного заражения вирусом животных подвергали эвтаназии и анализировали в отношении иммунных ответов (титры HI, IgG, MN и т.д.).

Таблица L. Процедура эксперимента (пример 23)

	Первичная фаза	Схема вакцинации		Фаза контрольного заражения	
1	Без обработки	Плацебо	День 49	H1N1, вирус гриппа А	Нос, глотка, мазки, масса тела
2		Fluad	День 49		
3		Тетравалентная	День 49		
4		вакцина на основе мРНК	День 28 День 49		
5	H3N2	Плацебо	День 49		
6	День 21	Fluad	День 49		
7	H3N2 День 0	Тетравалентная	День 49		
8		вакцина на основе мРНК	День 28 День 49		
9	Без обработки	Плацебо	День 49	В/Брисбен	Нос, глотка, мазки, масса тела
10		Fluad	День 49		
11		Тетравалентная	День 49		
12		вакцина на основе мРНК	День 28 День 49		
13	В/Массачусетс	Плацебо	День 49		
14	День 21	Fluad	День 49		
15	В/Массачусетс День 0	Тетравалентная	День 49		
16		вакцина на основе мРНК	День 28 День 49		

Пример 24. Эксперимент по вакцинации с использованием мРНК, кодирующих три различных антигена NA, составленных в LNP-III-3 (трехвалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей NA).

В качестве иллюстрации в примере 14 было показано, что мРНК, кодирующая нейраминидазу, составленная в LNP-III-3, индуцирует сильные и эффективные иммунные ответы. В данном примере вакцинацию осуществляли с использованием трехвалентной композиции на основе мРНК, содержащей мРНК, кодирующую NA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1), мРНК, кодирующую NA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и мРНК, кодирующую NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (в данном документе называемой "трехвалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей NA"). Соответствующие последовательности мРНК приведены согласно примеру 1.

Самкам мышей BALB/c в день 0 и день 21 инъектировали трехвалентную вакцину на основе мРНК, кодирующей NA, Influsplit Tetra (2016/2017) в качестве положительного контроля или контрольный буфер (RiLa) в соответствии с режимом, приведенным в табл. М ниже. Образцы сыворотки крови отбирали для определения титров специфичных антител (анализ ELLA, проводимый в соответствии с примером 14). Результаты анализа ELLA показаны на фиг. 64.

Таблица М. Режим иммунизации (пример 24)

Группа	Количество мышей	Группы обработки	Доза	Обработка
1	13	Трехвалентная вакцина на основе мРНК, кодирующей NA, составленная в LNP-III-3	7,5 мкг (по 2,5 мкг каждой мРНК)	i.m., 1 x 25 мкл
2	6	Influsplit Tetra 2016/2017	Полная доза для человека	i.m., 1 x 25 мкл
3	3	Буфер RiLa		i.m., 1 x 25 мкл

Результаты.

На фиг. 64 показано, что у мышей, вакцинированных с использованием мРНК, кодирующих три различных антигена NA, составленных в LNP (трехвалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей NA), можно было выявить сильные и специфические функциональные иммунные ответы. По сравнению с ответами, выявленными после вакцинации с использованием Influsplit Tetra в полной дозе для человека, ответы, полученные при использовании трехвалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей NA, составленной в LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением были более выраженными. Результаты показывают, что после вакцинации с использованием трехвалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей NA, составленной в LNP-III-3, на каждый антиген NA индуцировались сильные функциональные иммунные ответы.

Пример 25. Эксперимент по вакцинации с использованием мРНК, кодирующих три различных антигена NA и четыре различных антигена HA, составленных в LNP-III-3 (семивалентной вакцины на основе мРНК).

В качестве иллюстрации в примерах выше показано, что тетравалентные вакцины на основе мРНК, кодирующей HA и трехвалентные вакцины на основе мРНК, кодирующей NA, составленные в LNP-III-3, индуцируют сильные и эффективные иммунные ответы на каждый кодируемый антиген. В данном примере вакцинацию осуществляли с использованием композиции на основе мРНК, кодирующих три различных антигена NA (вакцинацию осуществляли с использованием мРНК, кодирующей NA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1), мРНК, кодирующей NA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и мРНК, кодирующей NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008) и четыре различных антигена HA (мРНК, кодирующей HA вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1), мРНК, кодирующей HA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и мРНК, кодирующей HA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008, а также мРНК, кодирующей HA вируса гриппа В), составленных в LNP-III-3 (в данном документе называемой "семивалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей HA/NA"). Соответствующие последовательности мРНК приведены согласно примеру 1.

Самкам мышей BALB/c i.m. инъецировали в день 0 и день 21 тетравалентную вакцину на основе мРНК, кодирующей HA, составленной в LNP-III-3, трехвалентную вакцину на основе мРНК, кодирующей NA, составленной в LNP-III-3, или семивалентную вакцину на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP-III-3. В качестве положительного контроля одной группе мышей инъецировали Influsplit Tetra® 2016/2017. В качестве отрицательного контроля одной группе мышей инъецировали буфер RiLa. Образцы сыворотки крови для анализа иммунных ответов (титр HI, ELISA) отбирали в дни 21, 35, 49 (анализы проводили так, как описано выше). Спленоциты отбирали в день 49 (ICS). Подробности эксперимента приведены в табл. N. Результаты ELISA и определения титров HI показаны на фиг. 65-70.

Таблица N. Режим иммунизации (пример 25)

Группа	Количество мышей	Группы обработки	Доза	Обработка
1	8	Тетравалентная вакцина на основе мРНК, кодирующей HA	4 мкг (по 1 мкг каждой),	i.m., 1 x 25 мкл
2	8	Трехвалентная вакцина на основе мРНК, кодирующей NA	3 мкг (по 1 мкг каждой)	i.m., 1 x 25 мкл
3	8	Семивалентная вакцина на основе мРНК, кодирующей HA/NA	7 мкг (по 1 мкг каждой)	i.m., 1 x 25 мкл
4	8	Семивалентная вакцина на основе мРНК, кодирующей HA/NA	7 мкг (по 0,5 мкг каждой)	
5	6	Influsplit Tetra	1/10 дозы для человека	i.m., 2 x 25 мкл
6	6	RiLa	---	i.m., 1 x 25 мкл

Результаты.

Результаты показывают, что семивалентная вакцина на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP-III-3, индуцирует сильные и эффективные иммунные ответы у вакцинированных мышей.

На фиг. 65 - 68 показано присутствие суммарных антител IgG1 и IgG2a к каждому из четырех антигенов HA. Примечание: между иммунными ответами, выявленными у мышей, вакцинированных тетравалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей HA, не было выявлено различий, что свидетельствует о том, что добавление дополнительных конструкций мРНК, кодирующих антигены NA, не снижает эффективность семивалентной вакцины на основе мРНК.

На фиг. 69 показано присутствие специфичных антител к каждому из трех антигенов NA. Примечание: между иммунными ответами, выявленными у мышей, вакцинированных трехвалентной вакциной на основе мРНК, кодирующей NA, не было выявлено различий, что свидетельствует о том, что добавление дополнительных конструкций мРНК, кодирующих антигены HA, не снижает эффективность семивалентной вакцины на основе мРНК.

На фиг. 70 показано, что вакцинация мышей с использованием семивалентной вакцины на основе мРНК, кодирующей HA/NA, составленной в LNP, индуцирует выработку функциональных антител.

Пример 26. Эксперимент по вакцинации с использованием мРНК, кодирующих GP вируса Эбола, составленных в LNP-III-3.

В данном примере состав на основе мРНК в LNP-III-3 в соответствии с настоящим изобретением сравнивали с вакциной в традиционном формате мРНК (составом, содержащим протамин; см. пример 6), используя мРНК, кодирующую гликопротеин GP вируса Эбола (GP ZEBOV/Сьерра-Леоне/2014).

Состав на основе мРНК, кодирующей GP вируса Эбола (SEQ ID NO: 224362), содержащий протамин, описан в примере 6. Состав на основе мРНК, кодирующей GP вируса Эбола (SEQ ID NO: 224362),

содержащий LNP, описан выше.

Иммуногенность вакцины на основе мРНК, кодирующей GP вируса Эбола, у мышей.

Самкам мышей BALB/c инъектировали в день 0 и день 21 мРНК, кодирующую GP вируса Эбола, составленную в LNP-III-3 (РНК с ID "R3875"; внутримышечно (i.m.)), или мРНК, кодирующую GP вируса Эбола, составленную с протамином (РНК с ID "R3875"; внутрикожно (i.d.)). В качестве отрицательного контроля одной группе мышей инъектировали буфер RiLa. В день 35 отбирали образцы сыворотки крови с целью проведения анализа титров IgG в конечной точке (ELISA). ELISA проводили с использованием рекомбинантного белка GP ZEBOV Mayinga (не имеющего трансмембранного домена) для покрытия. Результаты ELISA показаны на фиг. 71. План экспериментальной вакцинации представлен в табл. О.

Таблица О. Режим иммунизации (пример 26)

Группа	Количество мышей	Группы обработки	Доза	Обработка
1	8	GP вируса Эбола, в составе, содержащем протамин	80мкг	i.d., 1 x 50 мкл
2	8	GP вируса Эбола, в составе, содержащем LNP	5мкг	i.m., 1 x 25 мкл
3	8	GP вируса Эбола, в составе, содержащем LNP	7 мкг (по 1 мкг каждой)	i.m., 1 x 25 мкл
4	8	RiLa	7 мкг (по 0,5 мкг каждой)	i.d., 1 x 50 мкл

Результаты.

На фиг. 71 показано, что мРНК, кодирующая GP вируса Эбола, составленная в LNP-III-3, индуцирует сильные гуморальные иммунные ответы у мышей (при i.m. применении). По сравнению с вакциной в традиционном формате мРНК с протамином (при i.d. применении) количество мРНК, необходимое для аналогичного иммунного ответа, можно существенно снизить. Более того, вакцины на основе мРНК, составленной в LNP-III-3, можно применять внутримышечно, что является важной характеристикой профилактических вакцин (легкое и надежное внутримышечное применение вакцины, например, у субъектов-людей).

Пример 27. Эксперимент по вакцинации с подкожным введением мРНК, кодирующих H3N2, составленных в LNP-III-3.

Как описано в предыдущих примерах, вакцины на основе мРНК, составленной в LNP-III-3, индуцируют сильные и эффективные иммунные ответы при внутримышечном или внутрикожном введении (например, см. пример 4). Для оценивания эффективности формата вакцины в соответствии с настоящим изобретением при использовании других подходящих путей введения тестировали подкожную инъекцию.

Приматам, отличным от человека (*Macaca fascicularis*), инъектировали мРНК, кодирующую вирус гриппа H3N2 A/Гонконг/4801/2014 (последовательности мРНК приведены в соответствии с примером 1), составленную в LNP-III-3. Три группы вакцинировали подкожно (sc) с использованием различных доз вакцины (10 мкг, 50 мкг, 100 мкг), а одну контрольную группу вакцинировали внутримышечно. Титры HI в день 0, день 28, день 49 и день 70 определяли так, как описано в данном документе. Результаты эксперимента показаны на фиг. 72. План экспериментальной вакцинации представлен в табл. Р.

Таблица Р. Режим иммунизации (пример 27)

Группа	Количество мРНК	Группы обработки	Доза и путь введения	Обработка
1	8	H3N2, в составе, содержащем LNP-III-3	10 мкг, подкожный	День 0, день 28
2	8	H3N2, в составе, содержащем LNP-III-3	50 мкг, подкожный	День 0, день 28
3	8	H3N2, в составе, содержащем LNP-III-3	100 мкг, подкожный	День 0, день 28
4	8	H3N2, в составе, содержащем LNP-III-3	100 мкг, i.m.	День 0, день 28

Результаты.

Как показано на фиг. 72, вакцина в формате мРНК, составленной в LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением индуцирует образование сильных защитных титров антител к кодируемому антигену при подкожном введении. Примечательно, что титры HI были сопоставимы с титрами, которые достигались при i.m. введении. Более того, защитные титры достигались уже после одного введения (день 28). Стабильные защитные титры выявляли у животных, вакцинированных s.c. дозами в 50 мкг и 100 мкг. При обобщении изложенного выше результаты демонстрируют, что вакцина в формате мРНК, со-

ставленной в LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением является подходящей для внутри кожного, внутримышечного, а также подкожного введения.

Пример 28. Эксперимент по вакцинации с использованием вакцины на основе мРНК, кодирующей OVA, составленной в LNP-III-3.

С целью вакцинации 9 мышам (C57 BL/6) в каждой группе внутрикожно инъецировали 3 раза в течение 3 недель 1 мкг мРНК, кодирующей Ova, составленной в LNP (компонент А) и 32 мкг мРНК, кодирующей Ova, составленной с протаминам (компонент В), а в качестве отрицательного контроля инъецировали RiLa (см. табл. Q).

Уровни циркулирующих в крови антигенспецифических CD8-положительных Т-клеток измеряли с помощью OVA-специфичных декстримеров (которые связываются с антигенспецифическими Т-клеточными рецепторами CD8-положительных клеток) в дни 7 и 21. 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей Ova, составленной в LNP (компонент А), индуцирует образование высоких и способных повышаться уровней циркулирующих в крови антигенспецифических CD8-положительных Т-клеток после внутрикожного применения (см. фиг. 73 и 74).

Таблица Q. Компоненты, обработка и разведение РНК (пример 28)

Компонент	Обработка	Доза РНК	Путь введения (объем)	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая OVA, составленная в LNP	1мкг	i.d. (25 мкл)/1 место инъекции	9
B	мРНК, кодирующая Ova, составленная с протаминам	32мкг	i.d. (100 мкл)/4 места инъекции (современная)	9
C	Буфер RiLa	-	i.d. (25 мкл)/1 место инъекции	3

Уровни полифункциональных антигенспецифических CD8-положительных Т-клеток (IFN γ /TNF α) измеряли с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS). Соответственно, спленоциты выделяли у вакцинированных мышей через одну неделю после последней вакцинации, а CD8-положительные Т-клетки стимулировали с помощью OVA-специфичных пептидов (SIINFEKL и TEWTSS-NVMEERKIKV) (см. фиг. 75). На фиг. 75 показано, что 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей Ova, составленной в LNP (компонент А), индуцирует высокие уровни полифункциональных CD8-положительных Т-клеток после внутрикожного применения по сравнению с мРНК, кодирующей Ova, составленной с протаминам (компонентом В).

Выявление В-клеточных иммунных ответов проводили путем выявления титров OVA-специфичных IgG2c. Соответственно, образцы сыворотки крови отбирали у вакцинированных мышей через одну неделю после последней вакцинации и анализировали с помощью ELISA. 1 мкг вакцины на основе мРНК, кодирующей OVA, составленной в LNP, приводит к увеличению титров OVA-специфичного IgG2c после внутрикожного применения по сравнению с мРНК, кодирующей Ova, составленной с протаминам (см. фиг. 76).

Результаты демонстрируют, что вакцина в формате мРНК, составленной с LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением является подходящей для индукции противоопухолевых ответов *in vivo* и, таким образом, является применимой для противоопухолевой вакцинации.

Пример 29. Эксперимент по имплантации опухоли с использованием вакцины на основе мРНК, кодирующей OVA, составленной в LNP-III-3.

Мышам C57BL/6 подкожно (s.c.) инъецировали 3×10^5 клеток E.G7-OVA на каждую мышь (в объеме 100 мкл PBS) в правый бок в день 0 эксперимента. Терапию путем внутрикожного (i.d.) введения начинали в день 4 и продолжали дважды в неделю в течение трех недель. Мышам инъецировали 1 мкг мРНК, кодирующей OVA и нецелевой мРНК, кодирующей RpLus, составленных в LNP. Для контроля противоопухолевых эффектов, обусловленных процедурой инъекции, мышам инъецировали буфер (RiLa).

Результаты эксперимента показаны на фиг. 77 и 78, где на фиг. 77 показан эффект композиции в соответствии с настоящим изобретением в отношении роста опухоли, а на фигуре 78 показан эффект композиции в соответствии с настоящим изобретением в отношении выживаемости.

Мониторинг роста опухоли проводили путем измерения размера опухоли в трех измерениях с помощью штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$$\text{объем (мм}^3\text{)} = \frac{\text{длина (мм)} \times \pi \times \text{ширина}^2 \text{ (мм}^2\text{)}}{6}$$

Результаты на фиг. 77 показывают, что компонент А (мРНК, кодирующая Ova, составленная в LNP) в соответствии с настоящим изобретением существенно уменьшал медианный объем опухоли по сравнению с другим видом обработки с использованием нецелевой мРНК (компонента В). Кроме того, результаты на фиг. 78 показывают, что компонент А (мРНК, кодирующая Ova, составленная в LNP) в соответствии с настоящим изобретением существенно увеличивал выживаемость мышей с имплантированной опухолью по сравнению с другими видами обработки (компонентом В и буфером).

Таблица R. Компоненты, обработка и разведение РНК (пример 29)

Компонент	Обработка	Доза РНК	Путь введения (объем)	Схема	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая OVA, составленная в LNP	1мкг	i.d. (25 мкл)/1 место инъекции	2 x неделя	10
B	мРНК, кодирующая PpLuc, составленная в LNP	1мкг	i.d. (25 мкл)/1 место инъекции	2 x неделя	10
C	RiLa	-	i.d. (25 мкл)/1 место инъекции	2 x неделя	6

Результаты демонстрируют, что вакцина в формате мРНК, составленной в LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением является подходящей для противоопухолевой вакцинации.

Пример 30. Эксперимент по вакцинации с использованием вакцины на основе мРНК, кодирующей эндогенные опухолеассоциированные антигены, составленной в LNP-III-3, в комбинации с ингибитором контрольных точек иммунного ответа.

Мышам C57BL/6 подкожно (s.c.) инъектировали 1×10^5 клеток B16.F10 (линии клеток меланомы мыши) на каждую мышь в правый бок в день 0 эксперимента. В день 6 после имплантации опухоли мышей вакцинировали внутривенно с использованием мРНК, кодирующей Trp2, составленной в LNP (компонента A) и нецелевой мРНК, кодирующей PpLuc, составленной в LNP (компонента B). Кроме того, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа антитело к PD1 (клон: RMP1-14) и антитело к CTLA4 (клон: 9H10) (оба от BioXCell) вводили внутривенно (i.p.), при этом анализировали медианный размер опухоли и уровни выживаемости. Для исключения противоопухолевого эффекта, обусловленного ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, мышам инъектировали компонент B и контрольное антитело (IgG2a крысы, BioXCell).

Мыши, несущие опухоль, обработанные вакциной против mTrp2 и ингибиторами контрольных точек иммунного ответа антителом к PD1 и антителом к CTLA4, демонстрировали задержку роста опухоли и увеличение выживаемости по сравнению с другими видами обработки с использованием нецелевой мРНК (компонента B) в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа антителом к PD1 и антителом к CTLA4 или контрольного антитела (см. фиг. 79 и 80).

Таблица S. Компоненты, обработка и разведение РНК/антитела

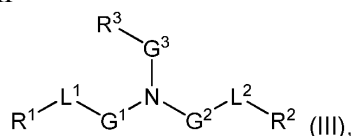
	Обработка	Доза РНК (i.d.)/объем	Антитело (i.p.)	Схема	Количество мышей
A	мРНК, кодирующая mTrp2, составленная в LNP	1мкг / 25мкл	Антитело к PD1 + антитело к CTLA4	2 x неделя	10
B	мРНК, кодирующая PpLuc, составленная в LNP	1мкг / 25мкл	Изотипический контроль	2 x неделя	10
C	мРНК, кодирующая PpLuc, составленная в LNP	1мкг / 25мкл	Антитело к PD1 + антитело к CTLA4	2 x неделя	10

Результаты демонстрируют, что вакцина в формате мРНК, составленной в LNP-III-3, в соответствии с настоящим изобретением является подходящей для применения в сочетании с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа в противоопухолевой терапии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная наночастица, содержащая:

(i) катионный липид формулы III



или его фармацевтически приемлемые соль, таутомер или стереоизомер, причем указанный катионный липид присутствует в количестве от приблизительно 30 до приблизительно 70 мол.%, где

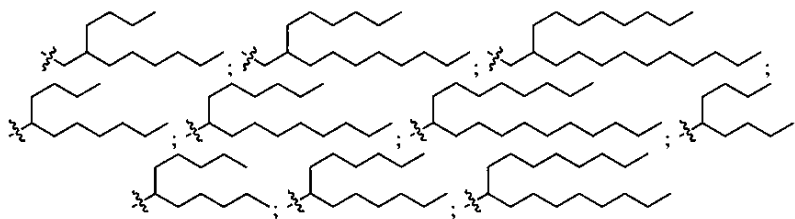
L^1 и L^2 каждый независимо представляет собой $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ или $(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$;

G^1 и G^2 каждый независимо представляет собой незамещенный C_1-C_{12} алкилен или C_1-C_{12} алкенилен;

G^3 представляет собой C_1-C_{24} алкилен или C_1-C_{24} алкенилен; и

R^3 представляет собой H или OR^5 , где R^5 представляет собой H или C_1-C_6 алкил; и

R^1 и R^2 каждый независимо имеет одну из следующих структур:



(ii) соединение мРНК, содержащее последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок;

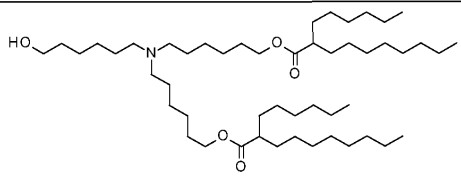
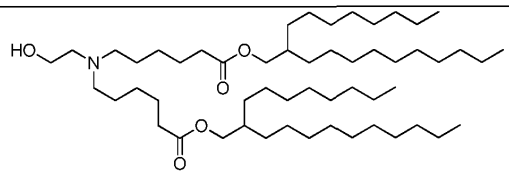
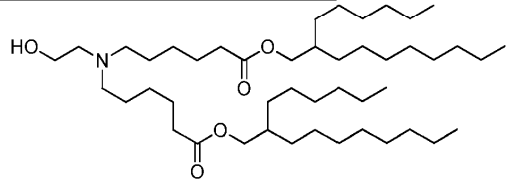
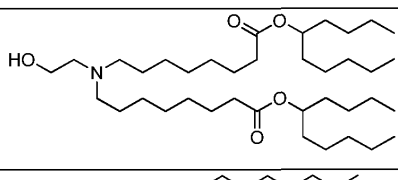
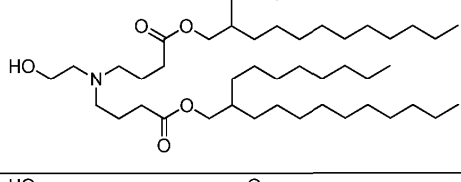
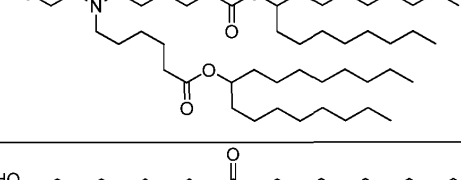
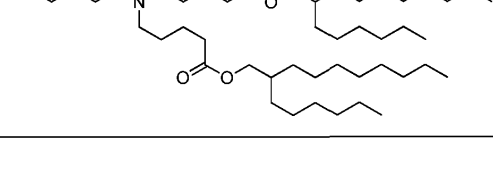
где соединение мРНК инкапсулировано в указанную липидную наночастицу или связано с ней.

2. Липидная наночастица по п.1, где R^3 представляет собой OH.

3. Липидная наночастица по п.1, где соединение мРНК не содержит модификации нуклеозида, в частности не содержит модификации азотистого основания.

4. Липидная наночастица по п.1, где катионный липид выбран из структур III-1 - III-8, III-10 - III-29

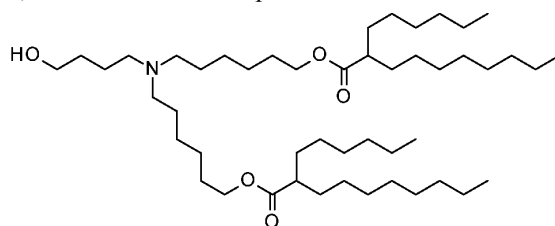
№	Структура
III-1	
III-2	
III-3	
III-4	
III-5	
III-6	
III-7	

III-8	
III-10	
III-11	
III-12	
III-13	
III-14	
III-15	

III-16	
III-17	
III-18	
III-19	
III-20	
III-21	
III-22	
III-23	

III-24	
III-25	
III-26	
III-27	
III-28	
III-29	

более предпочтительно, катионный липид представляет собой



5. Липидная наночастица по любому из пп.1-4, где последовательность мРНК представляет собой искусственную последовательность мРНК и/или где кодирующая область последовательности мРНК, кодирующая по меньшей мере один антигенный пептид или белок, содержит модификацию последовательности, предпочтительно где модификация последовательности выбрана из модификации содержания G/C, модификации кодонов, оптимизации кодонов или C-оптимизации последовательности, более предпочтительно где содержание G/C в кодирующей области последовательности мРНК увеличено по сравнению с содержанием G/C в соответствующей кодирующей последовательности мРНК дикого типа, или где содержание C в кодирующей области последовательности мРНК увеличено по сравнению с содержанием C в соответствующей кодирующей последовательности мРНК дикого типа, или где частота использования кодонов в кодирующей области последовательности мРНК адаптирована в соответствии с частотой использования кодонов у человека, или где индекс адаптации кодонов (CAI) является увеличенным или максимально увеличенным в кодирующей области последовательности мРНК, где аминокислотная последовательность, кодируемая последовательностью мРНК, предпочтительно не является модифицированной по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой мРНК дикого типа.

6. Липидная наночастица по любому из пп.1-5, где последовательность мРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну структуру типа "стебель-петля" гистоновых мРНК;

предпочтительно где гистоновая конструкция "стебель-петля" содержит последовательность нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224305 и/или наиболее предпочтительно последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306.

7. Липидная наночастица по любому из пп.1-6, где последовательность мРНК содержит, предпочтительно в направлении 5'-3', следующие элементы:

а) 5'-кэп-структуру, предпочтительно m7GpppN,

б) по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок,

с) поли(А)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 40-80 или 50-70 аденозиновых нуклеотидов,

д) необязательно поли(С)-хвост, предпочтительно состоящий из 10-200, 10-100, 20-70, 20-60 или 10-40 цитозиновых нуклеотидов, и

е) необязательно гистоновую структуру типа "стебель-петля", предпочтительно содержащую последовательность РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224306; и/или

где последовательность мРНК содержит элемент 3'-UTR, предпочтительно по меньшей мере один элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена, при экспрессии которого образуется стабильная мРНК, предпочтительно элемент 3'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 3'-UTR гена α -глобина, при этом предпочтительно содержит последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224297, и/или

где последовательность мРНК содержит элемент 5'-UTR, предпочтительно элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, предпочтительно из соответствующей последовательности РНК, предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее;

предпочтительно элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего рибосомный белок, предпочтительно из соответствующей последовательности РНК, предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее, предпочтительно элемент 5'-UTR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из 5'-UTR TOP-содержащего гена, кодирующего белок большой субъединицы рибосомы (RPL), предпочтительно не имеющую 5'-TOP-мотива, или состоит из нее и более предпочтительно содержит последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287, или состоит из нее;

предпочтительно элемент 5'-UTR, полученный из 5'-UTR TOP-содержащего гена, содержит последовательность РНК, соответствующую последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с SEQ ID NO: 224287 или 224289, или состоит из нее.

8. Липидная наночастица по любому из пп.1-7, где антигенный пептид или белок получен из патогенных антигенов, опухолевых антигенов, аллергенных антигенов или собственных аутоантигенов; предпочтительно патогенный антиген получен из вируса гриппа или бешенства.

9. Липидная наночастица по п.8, где антигенный пептид или белок получен из гемагглютинина (НА) или нейраминидазы (НА) вируса гриппа; необязательно антигенный пептид или белок представляет собой по меньшей мере один полноразмерный белок гемагглютинин (НА) и/или по меньшей мере один полноразмерный белок нейраминидазу (НА) вируса гриппа.

10. Липидная наночастица по п.9, где патогенный антиген происходит из вируса гриппа А, выбранного из вируса гриппа, характеризующегося наличием гемагглютинина (НА), выбранного из группы, состоящей из H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17 и H18; и/или

где патогенный антиген получен из вируса гриппа А, выбранного из вируса гриппа, характеризующегося наличием нейраминидазы (НА), выбранной из группы, состоящей из N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10 и N11; и/или

где патогенный антиген получен из вируса гриппа А, выбранного из группы, состоящей из H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N7, предпочтительно из H1N1, H3N2, H5N1.

11. Липидная наночастица по любому из пп.9 или 10, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа и по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа; предпочтительно где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА), и/или по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А, выбранного из группы, состоящей из H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2 и H10N7, предпочтительно из H1N1, H3N2, H5N1.

12. Липидная наночастица по любому из пп.9-11, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа А в соответствии с SEQ ID NO: 1-14031 или SEQ ID NO: 224309 или 224310, предпочтительно где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 32013-46043, 64025-78055, 224085-224106, 96037-110067, 128049-142079, 160061-174091, 192073-206103; и/или

где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа А, с соответствии с последовательностями SEQ ID NO: 14032-26397, 224309 или 224310; или где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательности РНК в соответствии с последовательностями SEQ ID NO: 46044-58409, 224311, 224312, 78056-90421, 224113, 224313-224317, 110068-122433, 142080-154445, 174092-186457, 206104-218469.

13. Липидная наночастица по любому из пп.9-12, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гемагглютинина (НА) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 26398-28576; предпочтительно где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 58410-60588, 90422-92600, 224107-224112, 122434-124612, 154446-156624, 186458-188636, 218470-220648; и/или

где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из нейраминидазы (НА) вируса гриппа В в соответствии с SEQ ID NO: 28577-30504; или где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК или комбинацию последовательностей РНК, выбранных из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 60589-62516, 92601-94528, 124613-126540, 156625-158552, 188637-190564, 220649-222576.

14. Липидная наночастица по п.8, где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G (RAV-G, RAVBV-G или RABV-G), нуклеопротеина N (RAV-N), фосфопротеина Р (RAV-P), белка матрикса М (RAV-M) или РНК-полимеразы L (RAV-L) вируса бешенства; предпочтительно где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну кодирующую область, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок, полученный из гликопротеина G (RAV-G, RAVBV-G или RABV-G) вируса бешенства в соответствии с SEQ ID NO: 30505-32012; и/или

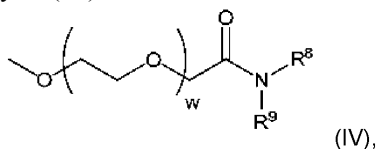
где последовательность мРНК содержит по меньшей мере одну последовательность РНК, выбранную из последовательностей РНК, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 62517-64024, 224270, 224274, 94529-96036, 224271-224273, 126541-128048, 158553-160060, 190565-192072, 222577-224084; и/или

где последовательность мРНК содержит последовательность РНК, идентичную или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательностям РНК в соответствии с SEQ ID NO: 224085-224106, 224114-224235, 224085-224106, 224114-224235, 224107-224112, 224236-224263, 224107-224112, 224107-224112, 224236-224263, 224113, 224264-224266, 224309-224347, 224309, 224310, 224311, 224312, 224113, 224313-224317, 224113, 224311-224317, 224264-224266, 224318-224347, 224348-224357, 224348-224357, 224270-224284, 224270, 224271-224273, 224270-224273, 224274-224284, 224358-224362, 224358, 224359, 224360, 224359, 224360, 224361, 224362, 224363, 224364, предпочтительно по меньшей мере одну кодирующую область в соответствии с SEQ ID NO: 224114-224235, 224236-224263, 224264-224266, 224318-224347, 224348-224357, 224274-224284, 224361, 224362, 224363, 224364, наиболее предпочтительно по меньшей мере одну кодирующую область в соответствии с SEQ ID NO: 224118, SEQ ID NO: 224117, SEQ ID NO: 224181, SEQ ID NO: 224236, SEQ ID NO: 224200, SEQ ID NO: 224166, SEQ ID NO: 224236, SEQ ID NO: 224246, SEQ ID NO: 224318, SEQ ID NO: 224336, SEQ ID NO: 224348, SEQ ID NO: 224276, SEQ ID NO: 224280.

15. Липидная наночастица по любому из пп.1-14, где соединение мРНК содержит по меньшей мере две последовательности мРНК, где по меньшей мере две последовательности мРНК кодируют два разных антигенных пептида и/или белка; и/или липидная наночастица содержит по меньшей мере два разных соединения мРНК, при этом каждое соединение содержит последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок.

16. Липидная наночастица по любому из пп.1-15, дополнительно содержащая:

(iii) конъюгат PEG-липид формулы (IV)



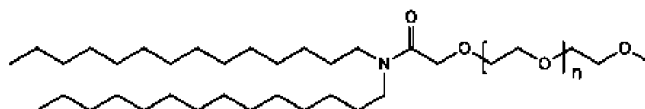
где каждый из R^8 и R^9 независимо представляет собой прямую или разветвленную насыщенную алкильную цепь, содержащую 10-30 атомов углерода, где алкильная цепь необязательно прерывается одной или несколькими сложноэфирными связями;

и w имеет среднее значение, находящееся в диапазоне от 30 до 60; и/или

(iv) нейтральный липид; и/или

(v) стероид;

предпочтительно где R^8 и R^9 представляют собой насыщенные алкильные цепи; и/или PEG-липид представляет собой



где n имеет среднее значение в диапазоне от 30 до 60; и/или

где нейтральный липид выбран из группы, включающей дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилфосфатидилэтанолламин (POPE), пальмитоилфосфатидилэтанолламин (POPE) и 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат диолеилфосфатидилэтанолламина (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеилфосфатидилэтанолламин (SOPE) и 1,2-дизлаидоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (транс-DOPE); и/или

где нейтральный липид представляет собой 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и где молярное соотношение катионного липида и DSPC необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 8:1; и/или

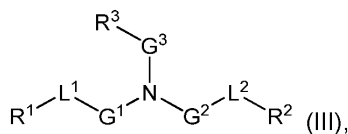
где стероид представляет собой холестерин и где молярное соотношение катионного липида и холестерина необязательно находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до 1:1.

17. Липидная наночастица по п.16, где PEG-липид присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 10 мол.% относительно общего содержания липидов в наночастице, в частности в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 5 мол.%, в частности в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 1,5 мол.%.

18. Способ получения липидной наночастицы по любому из пп.1-17, включающий стадии:

(i) получения:

а) катионного липида формулы III



определенной в п.1, или его фармацевтически приемлемых соли, таутомера или стереоизомера; и

б) по меньшей мере одного соединения мРНК, содержащего последовательность мРНК, кодирующую по меньшей мере один антигенный пептид или белок;

(ii) сольюбилизации катионного липида в этаноле;

(iii) смешивания этанольного раствора липидов с водным раствором, содержащим полинуклеотид мРНК; (iv) удаления этанола.

19. Способ по п.18, где соединение мРНК необязательно не содержит модификации нуклеозида, в частности не содержит модификации азотистого основания.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну липидную наночастицу по любому из пп.1-17 или содержащая по меньшей мере первую и вторую липидные наночастицы по любому из пп.1-17, где соединение мРНК, содержащееся во второй липидной наночастице, отличается от соединения мРНК, содержащегося в первой липидной наночастице и фармацевтически приемлемый наполнитель.

21. Применение липидной наночастицы по любому из пп.1-17 или фармацевтической композиции по п.20 в качестве лекарственного препарата.

22. Применение по п.21, где лекарственный препарат предназначен для терапевтической или профилактической индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом; или где лекарственный препарат предназначен для предупреждения или лечения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных

заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними.

23. Применение по п.21, где лекарственный препарат представляет собой вакцину; предпочтительно где лекарственный препарат представляет собой противоопухолевую вакцину, вакцину от гриппа или бешенства, предпочтительно где лекарственный препарат представляет собой вакцину от бешенства, применяемую при лечении бешенства.

24. Применение по любому из пп.21-23, где лекарственный препарат предназначен для парентерального введения и где парентеральное введение предусматривает инъекцию.

25. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы по любому из пп.1-17 или фармацевтической композиции по п.20.

26. Способ предупреждения или лечения раковых или опухолевых заболеваний, инфекционных заболеваний, форм аллергии или аутоиммунных заболеваний или нарушений, связанных с ними, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту липидной наночастицы по любому из пп.1-17 или фармацевтической композиции по п.20.

27. Липидная наночастица по любому из пп.1-17, где липидная наночастица характеризуется молярным соотношением (катионного липида, DSPC, холестерина и конъюгата PEG-липид), составляющим 47,4:10:40,9:1,7 (мол. %).

28. Липидная наночастица по любому из пп.1-6, где липидная наночастица содержит:

(i) мРНК, кодирующую белок НА вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13853, 13854, 13855 и 13856); и/или

(ii) мРНК, кодирующую белок НА вируса гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13836, 13837, 13838, 13839, 13840, 13841, 13842, 13843 и 13844); и/или

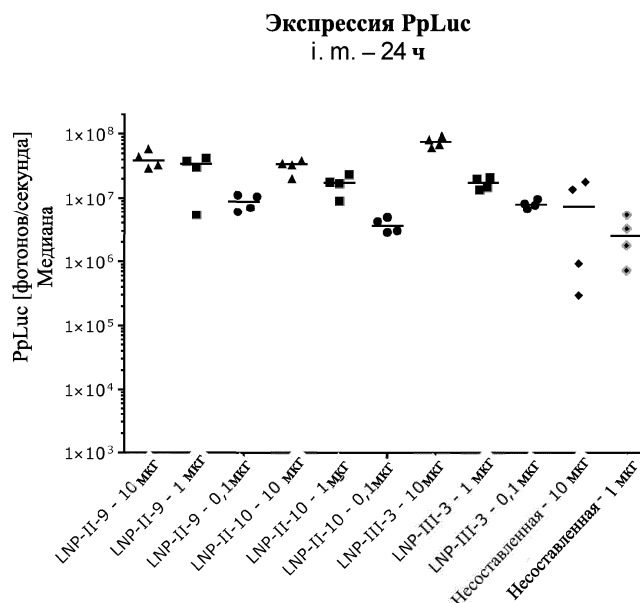
(iii) мРНК, кодирующую белок НА вируса гриппа В/Пхукет/3037/2013 (EPI540671) (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28530, 28531 и 28532); и/или

(iv) мРНК, кодирующую белок НА вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28524, 28525, 28526, 28527, 28528 и 28529); и/или

(v) мРНК, кодирующую белок NA вируса гриппа А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26251, 26252, 26253 и 26254); и/или

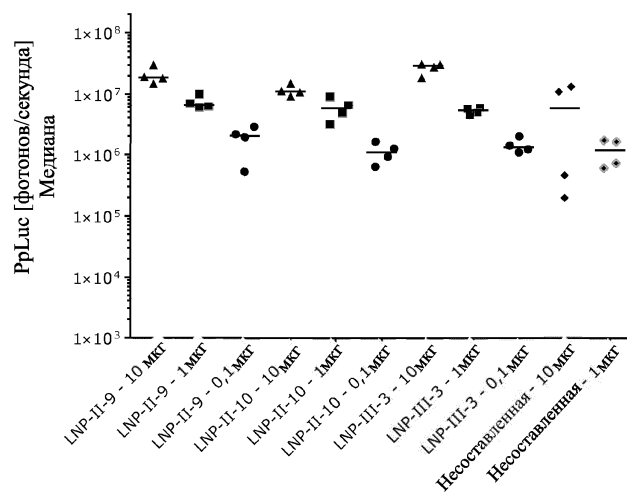
(vi) мРНК, кодирующую белок NA вируса гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26238, 26239, 26240, 26241, 26242 и 26243); и/или

(vii) мРНК, кодирующую белок NA вируса гриппа В/Брисбен/60/2008 (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30455, 30456, 30457, 30458, 30459 и 30460).



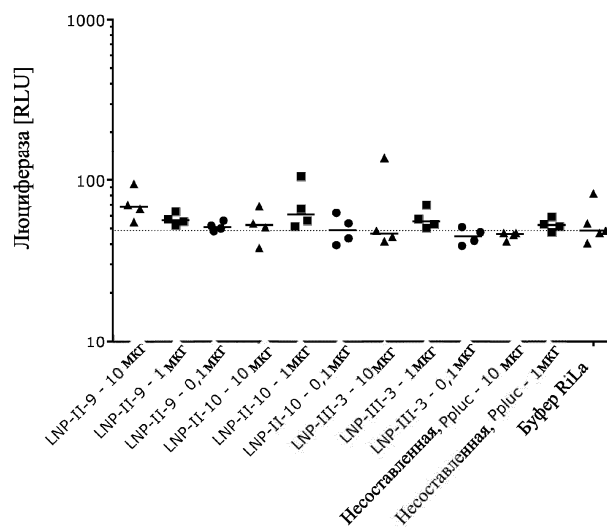
Фиг. 1А

Экспрессия PrLuc i. m. – 48 ч



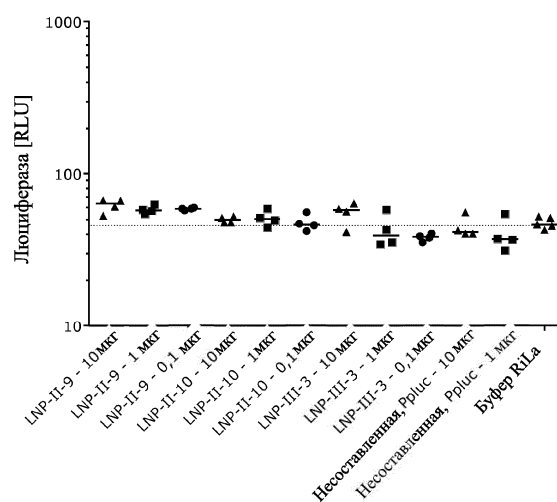
Фиг. 1В

Головной мозг



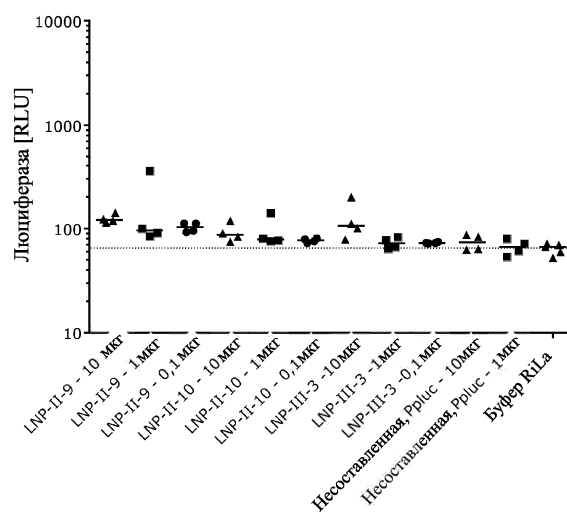
Фиг. 2А

Сердце



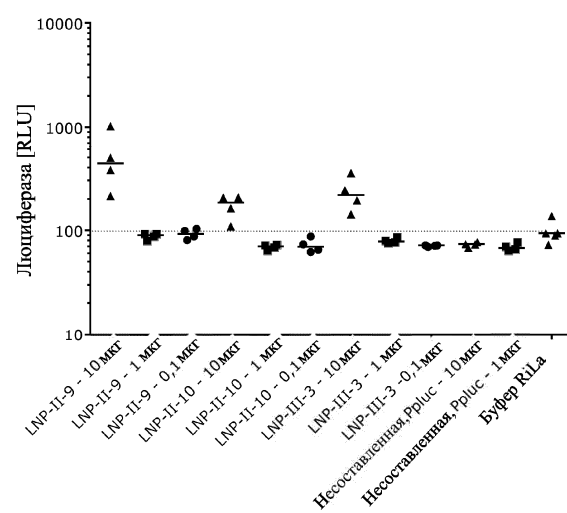
Фиг. 2В

Почка



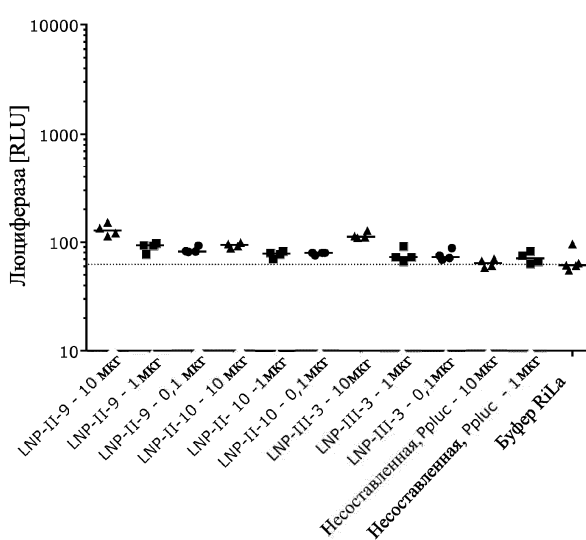
Фиг. 2С

Печень

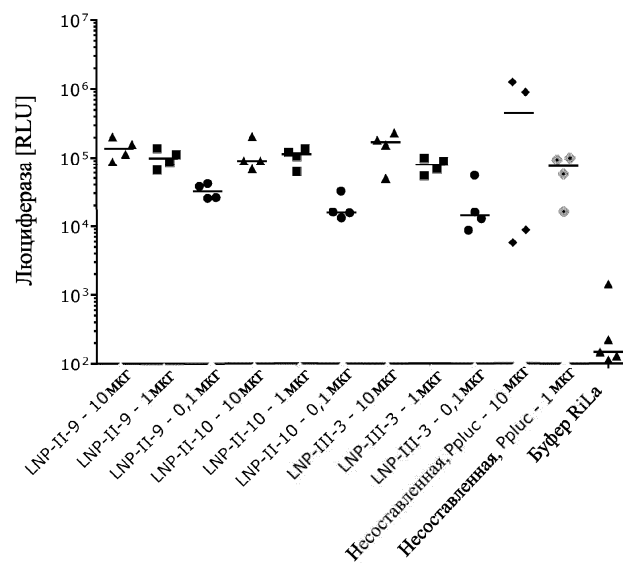


Фиг. 2D

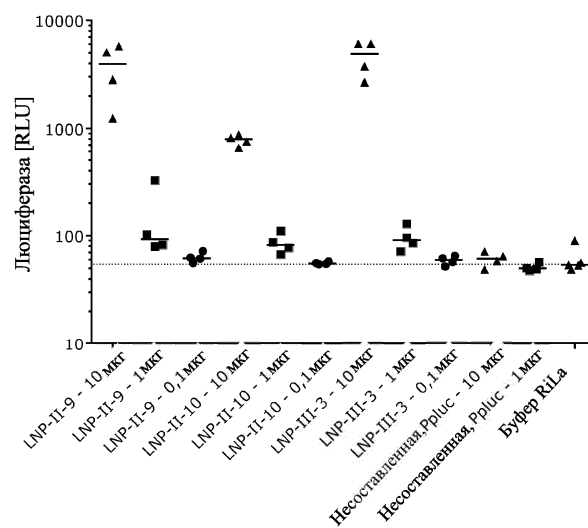
Легкое



Фиг. 2Е

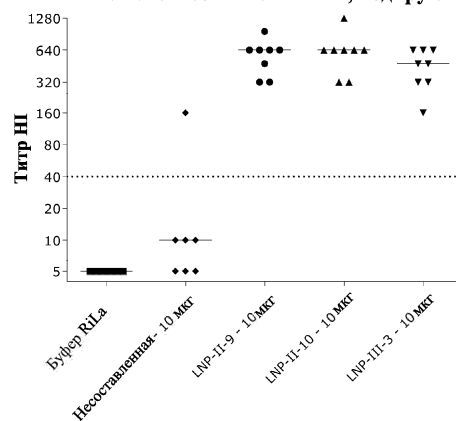
Мышцы

Фиг. 2F

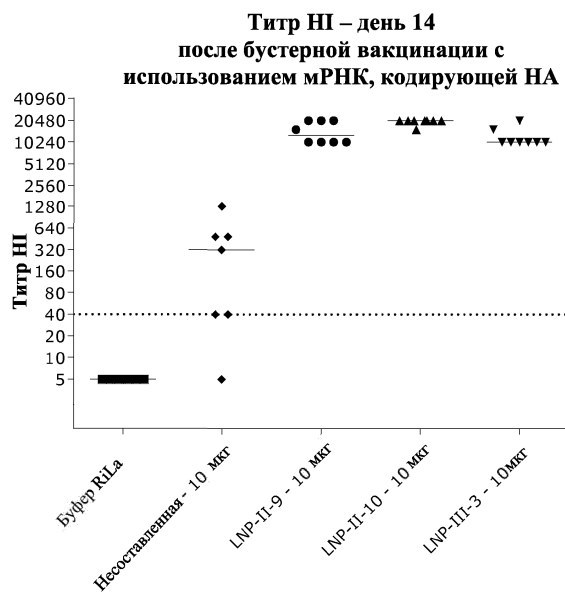
Селезенка

Фиг. 2G

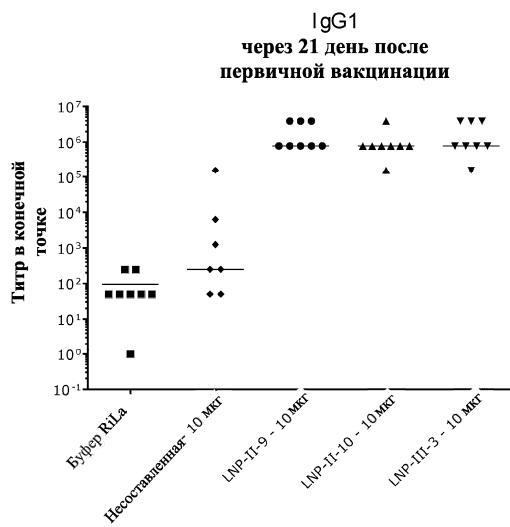
**Титр HI – день 21 после первичной
вакцинации
с использованием мРНК, кодирующей НА**



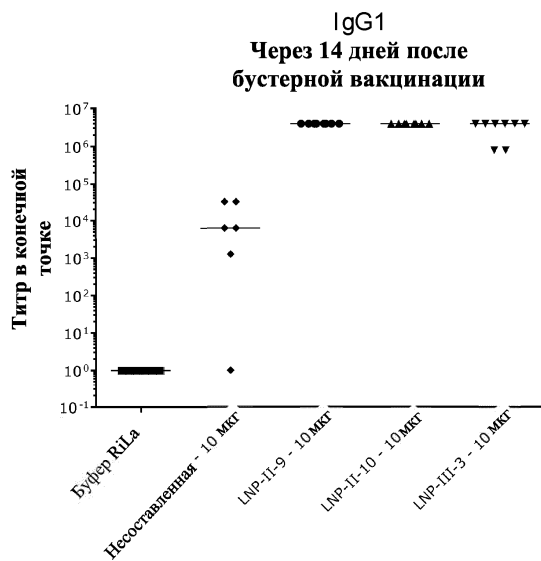
Фиг. 3А



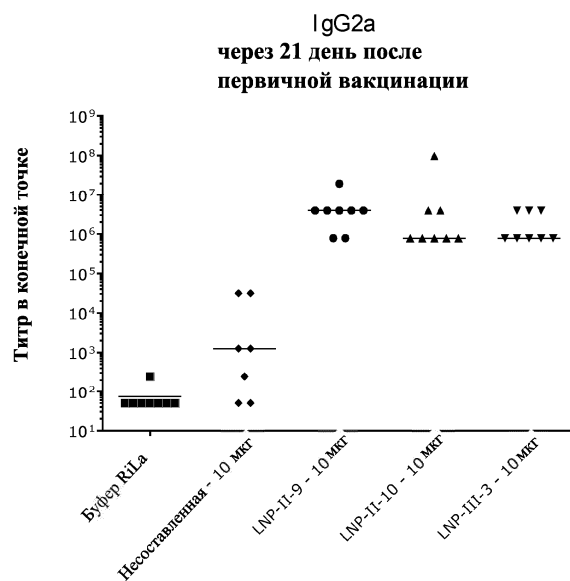
ФИГ. 3В



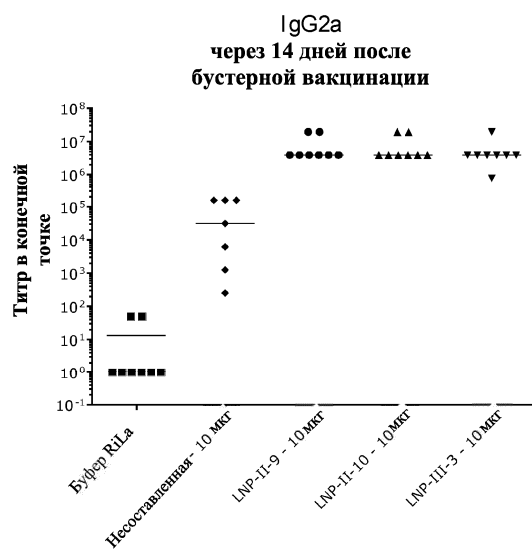
Фиг. 4А



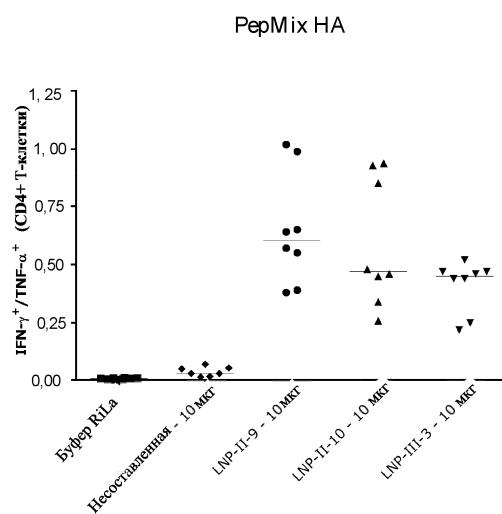
Фиг. 4В



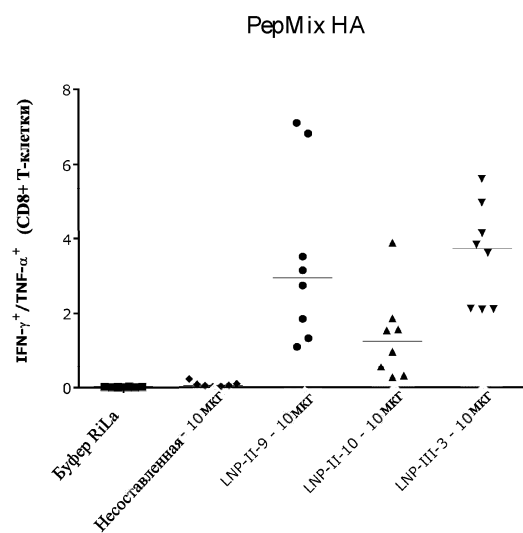
Фиг. 4С



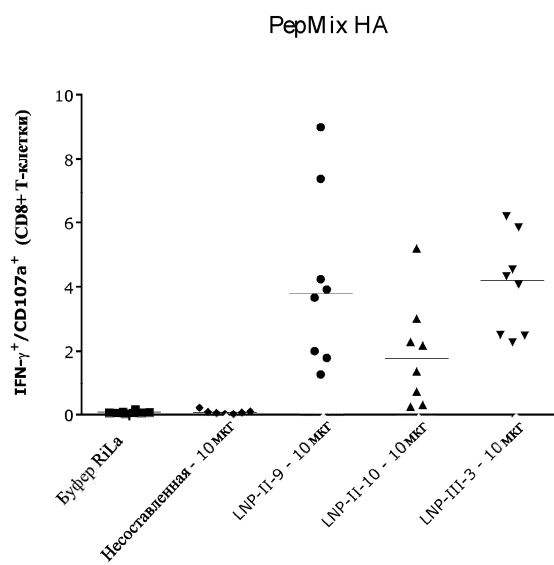
Фиг. 4D



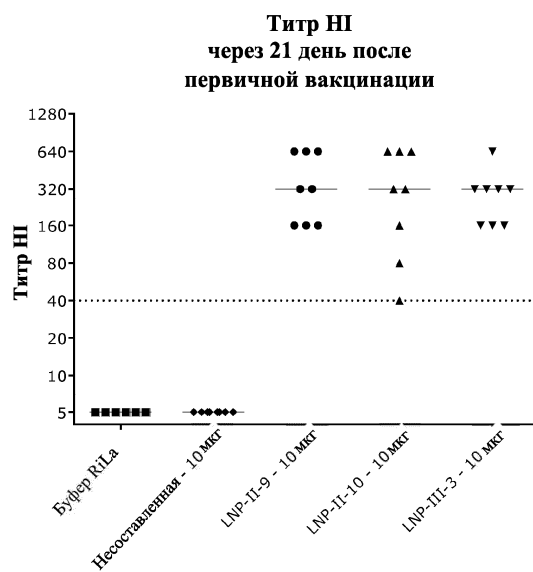
Фиг. 5А



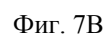
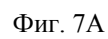
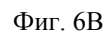
Фиг. 5B



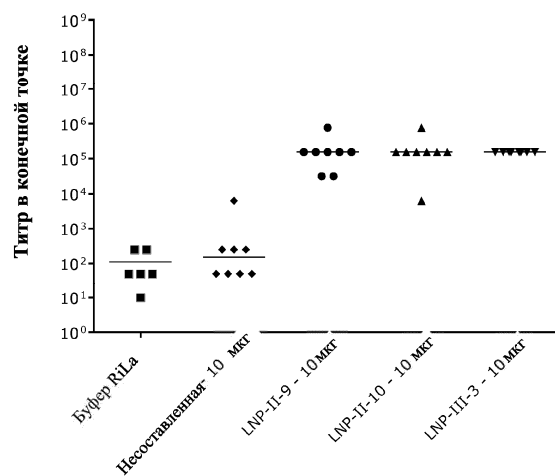
Фиг. 5C



Фиг. 6A

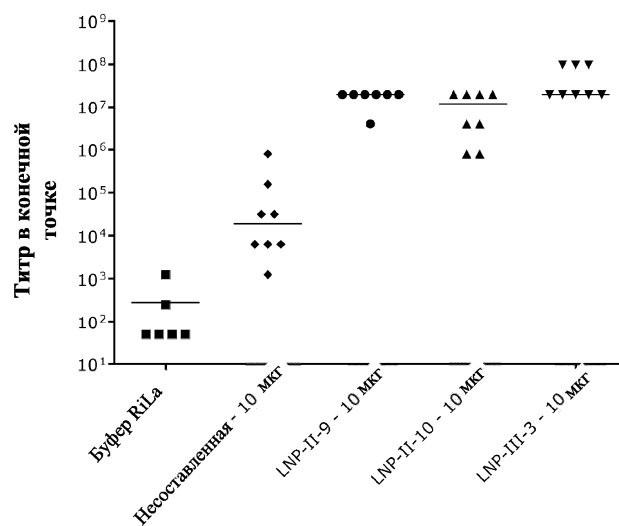


IgG2a
через 21 день после
первичной вакцинации

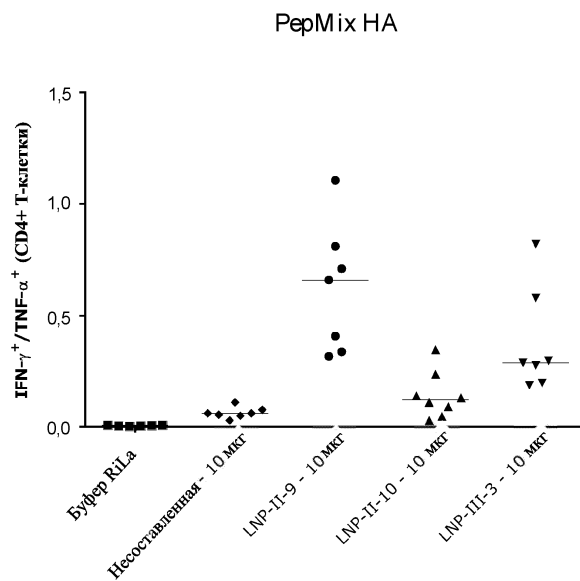


Фиг. 7C

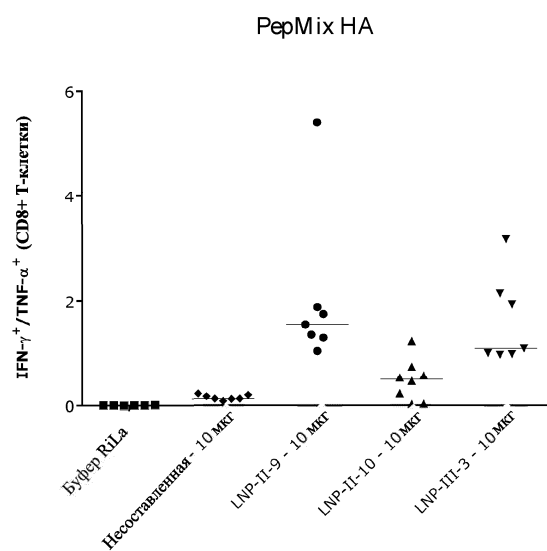
IgG2a
через 14 дней после
бустерной вакцинации



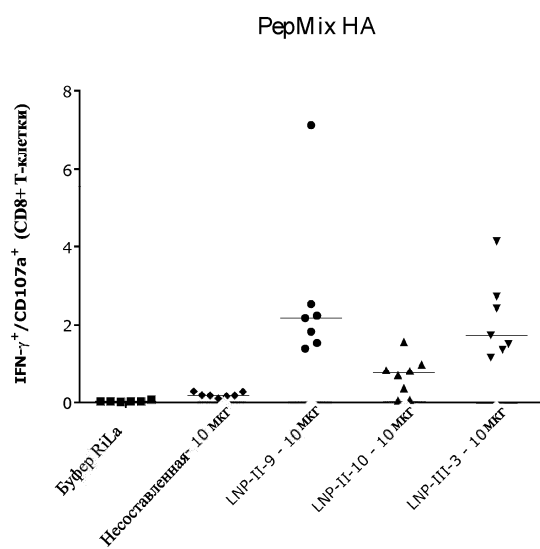
Фиг. 7D



Фиг. 8А

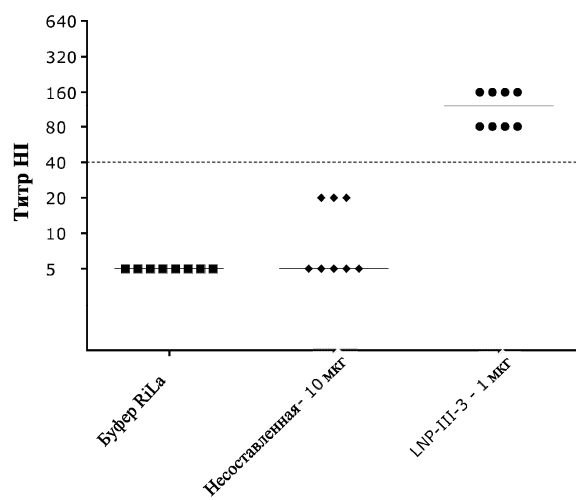


Фиг. 8В



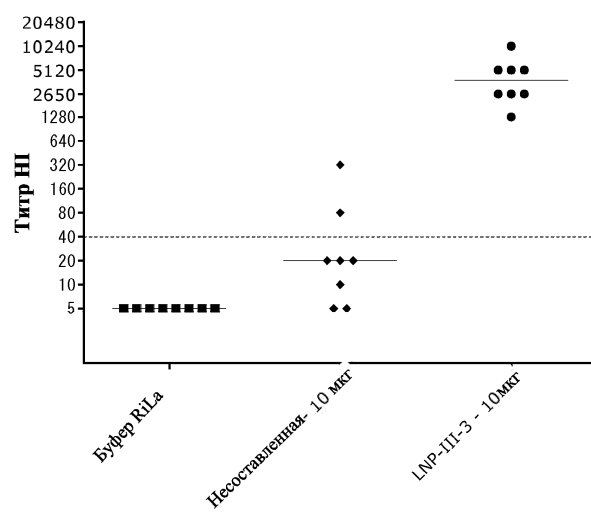
Фиг. 8С

Титр HI
через 21 день после
первичной вакцинации

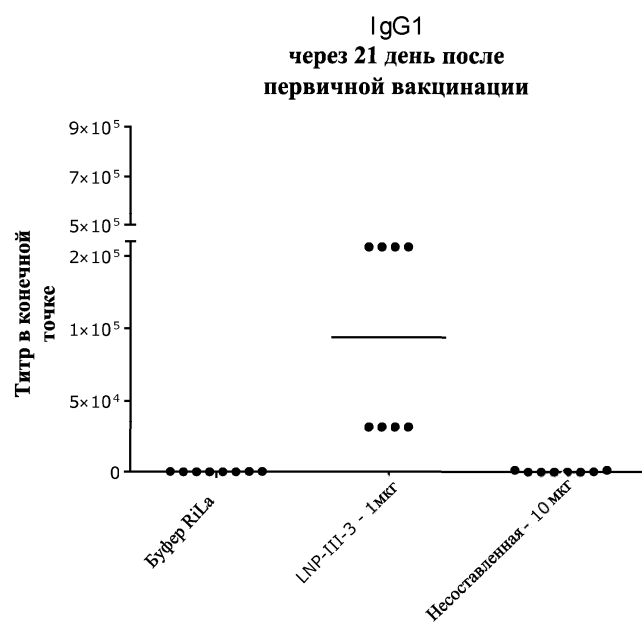


Фиг. 9А

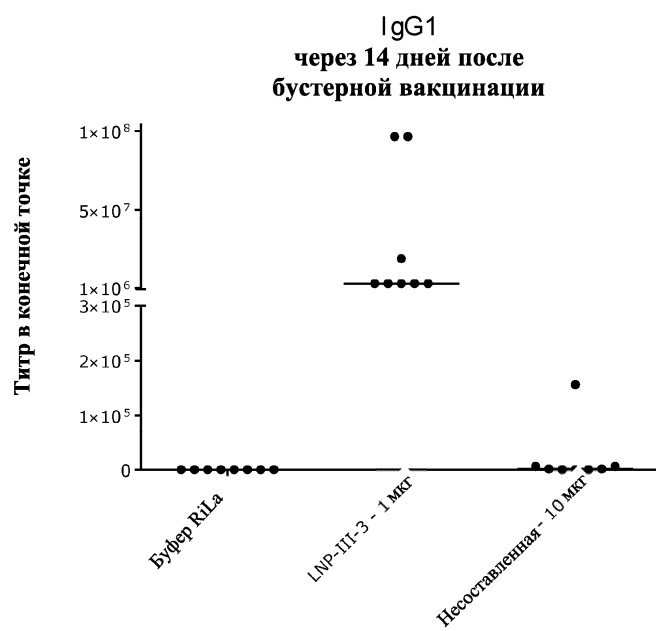
Титр HI
через 14 дней после
бустерной вакцинации



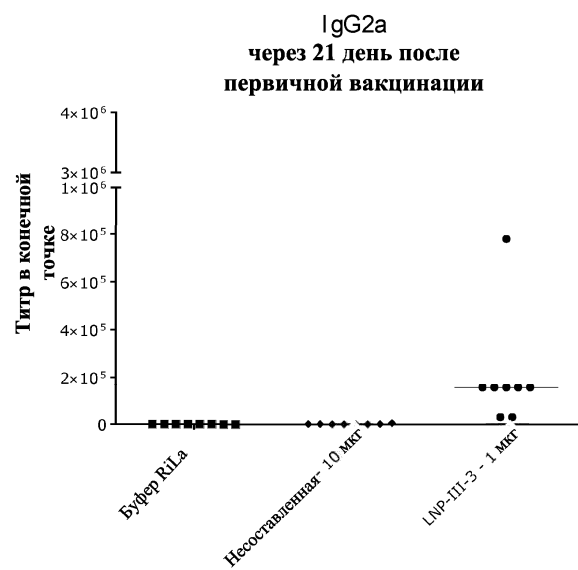
Фиг. 9В



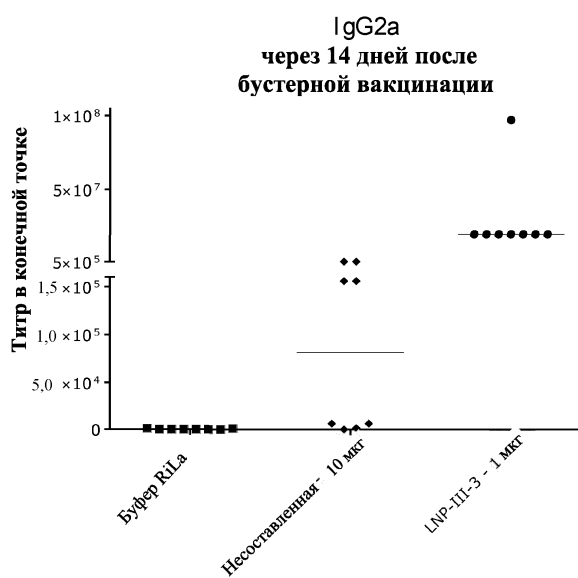
Фиг. 10А



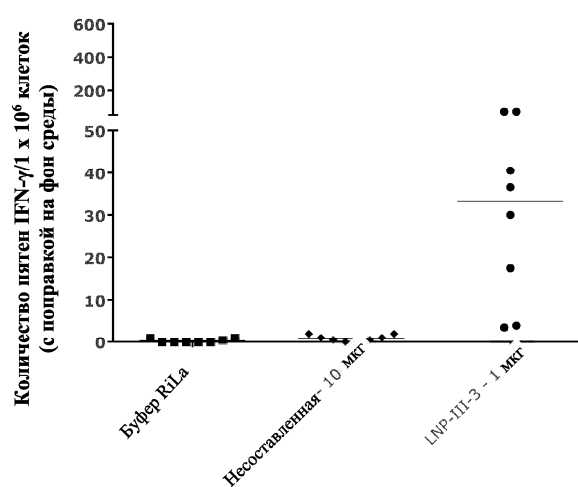
Фиг. 10В



Фиг. 10С

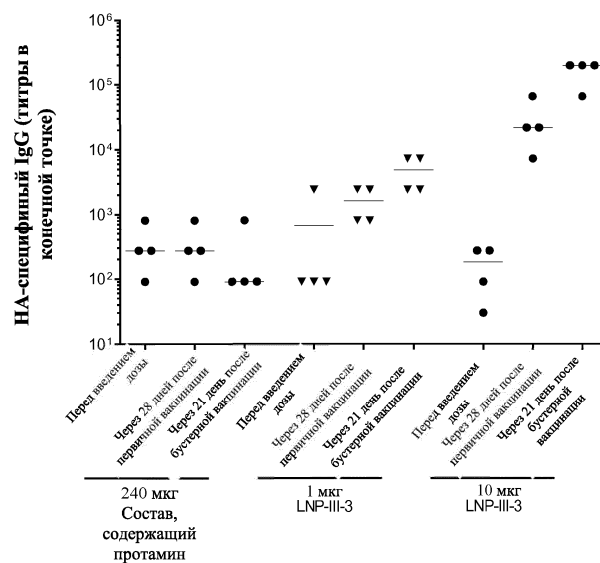


Фиг. 10D



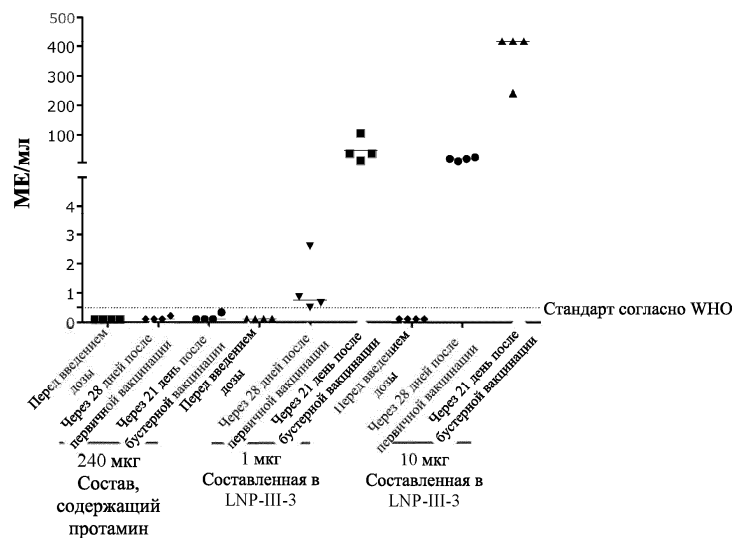
Фиг. 11

Титры НА-специфичных IgG в сыворотке крови НРР после i.m. вакцинации с использованием вакцин на основе мРНК, кодирующей НА



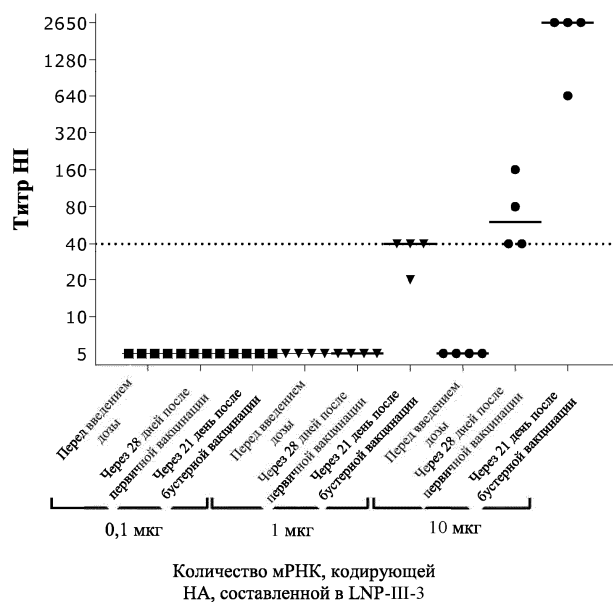
Фиг. 12

Титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотке крови НРР после i.m. вакцинации



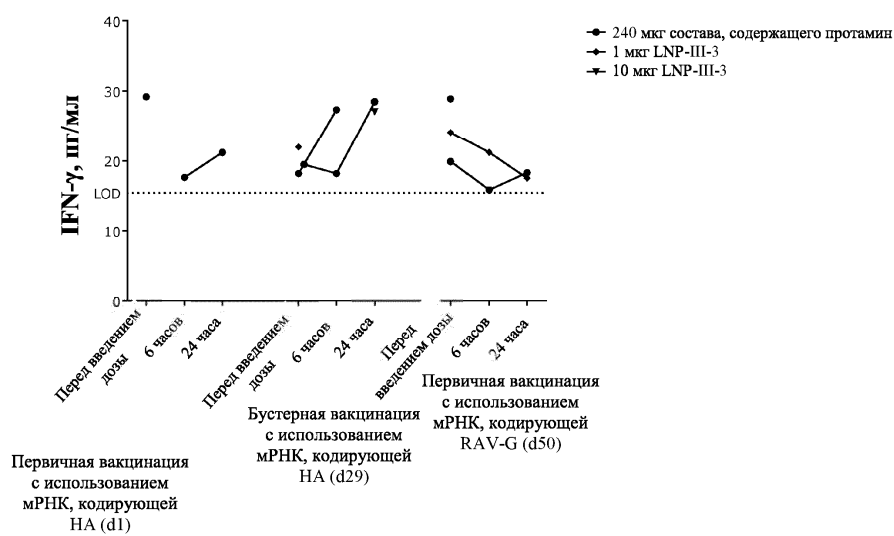
Фиг. 13

**Кинетика ответа с образованием антител к H1N1
Титры ингибирования гемагглютинации**



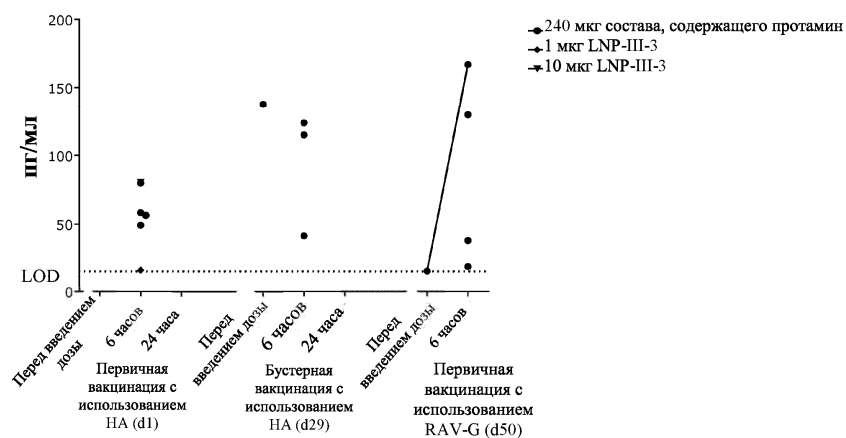
Фиг. 14

IFN- γ в сыворотке крови NHP



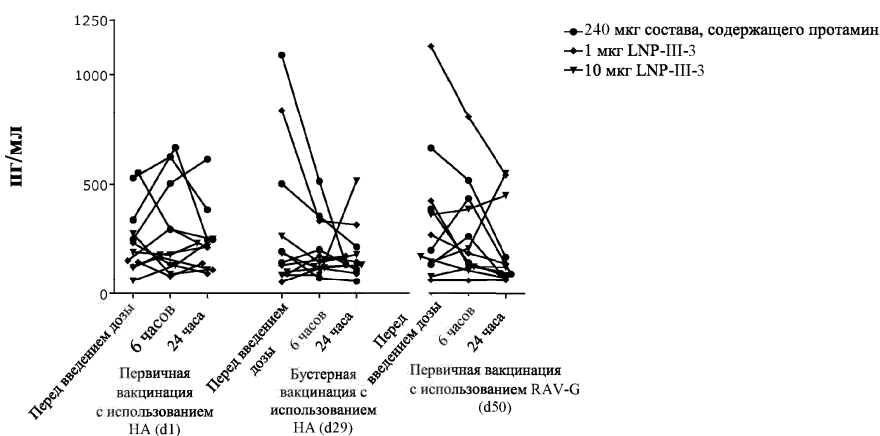
Фиг. 15А

IL-6 в сыворотке крови НРР



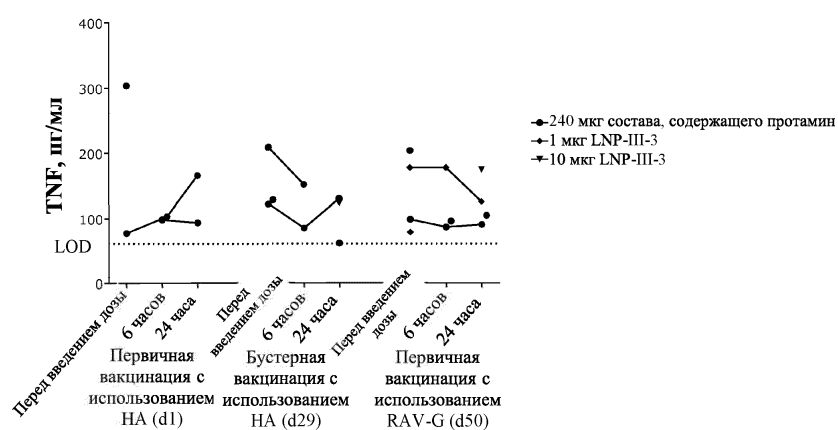
Фиг. 15В

IL-8 в сыворотке крови НРР

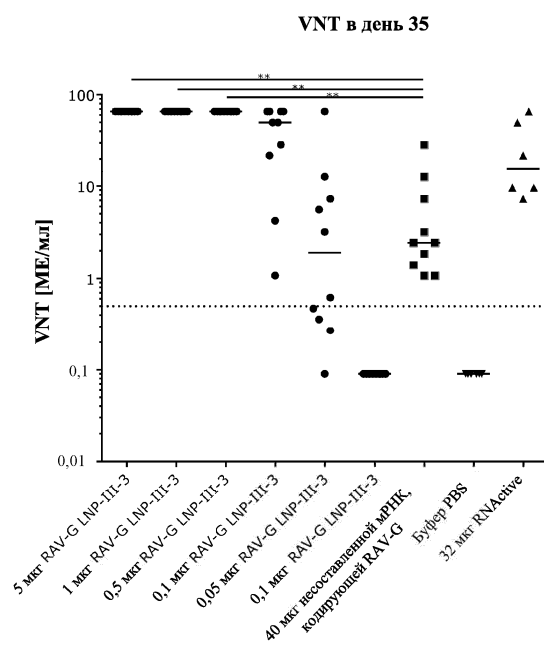
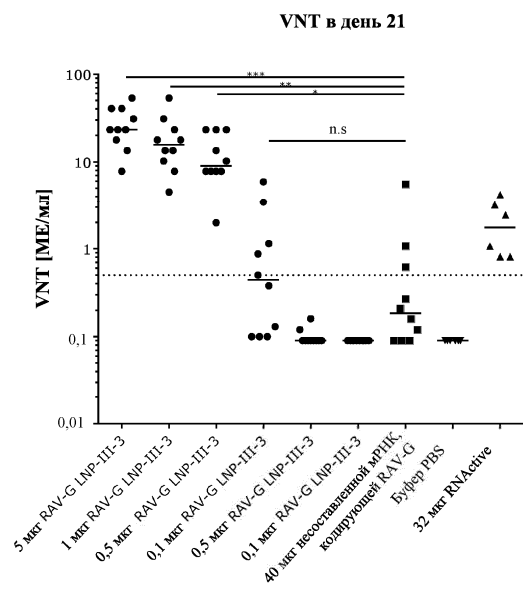


Фиг. 15С

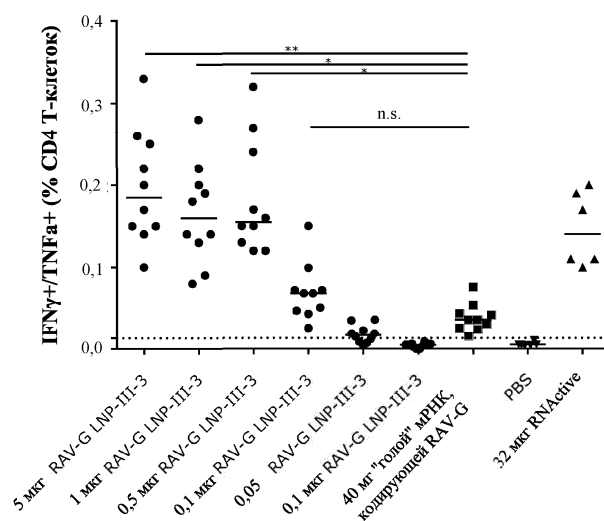
TNF в сыворотке крови у НРР



Фиг. 15D

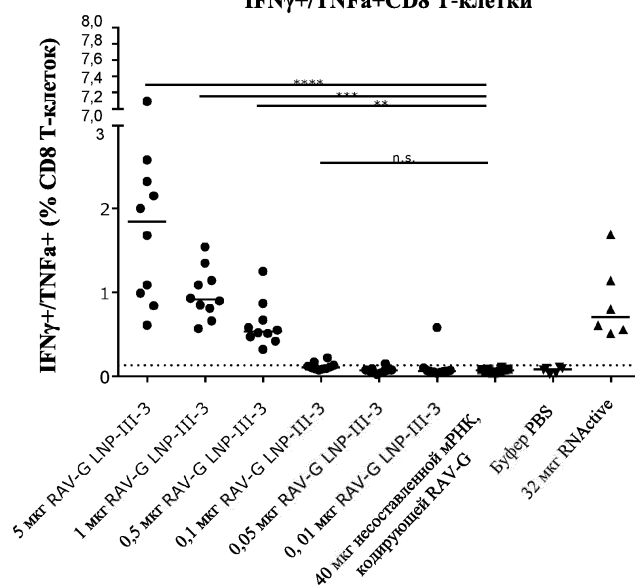


День 35
IFN γ /TNF α +CD4 T-клетки

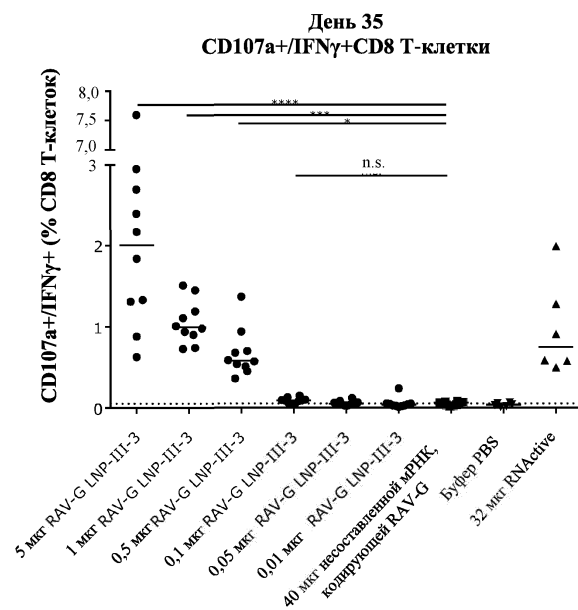


Фиг. 17А

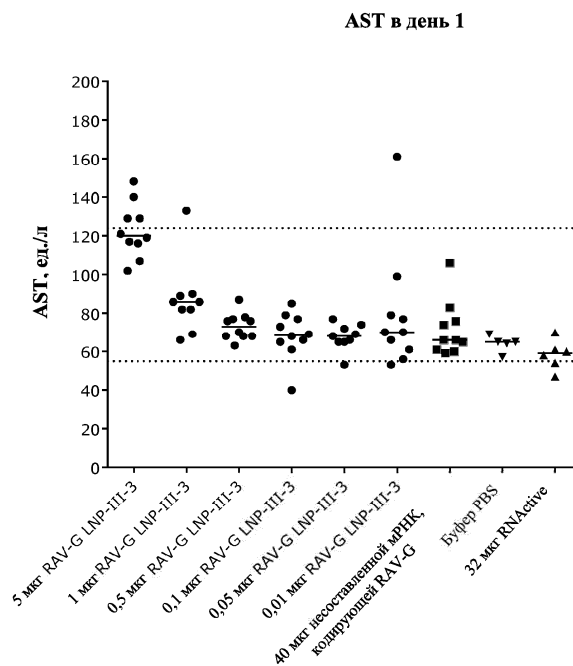
День 35
IFN γ /TNF α +CD8 T-клетки



Фиг. 17В

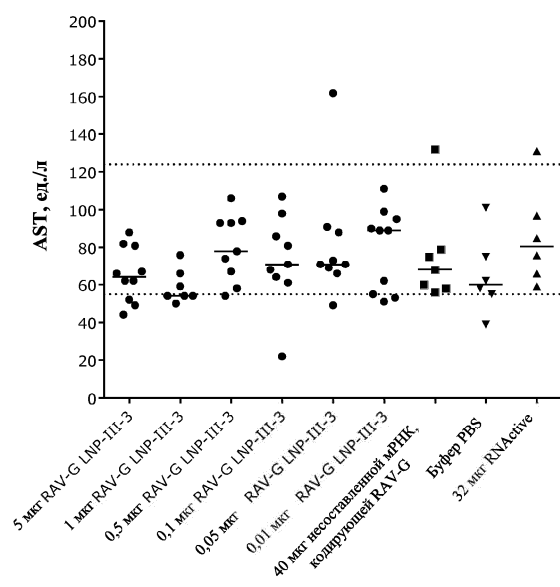


Фиг. 17С



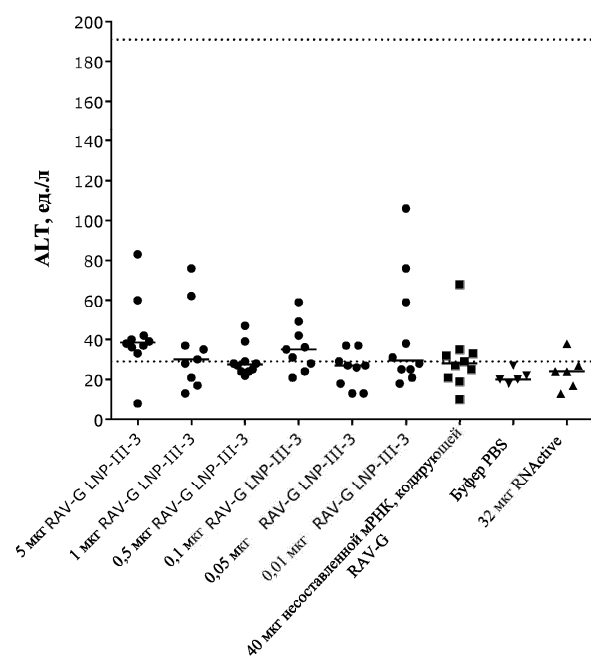
Фиг. 18А

AST в день 21



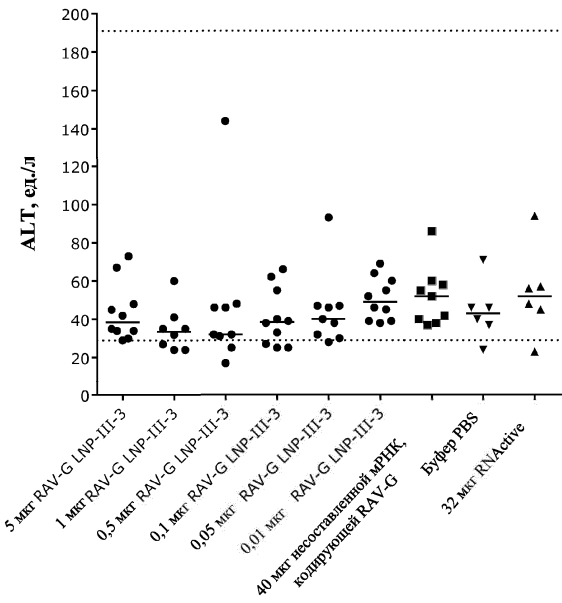
Фиг. 18В

ALT в день 1

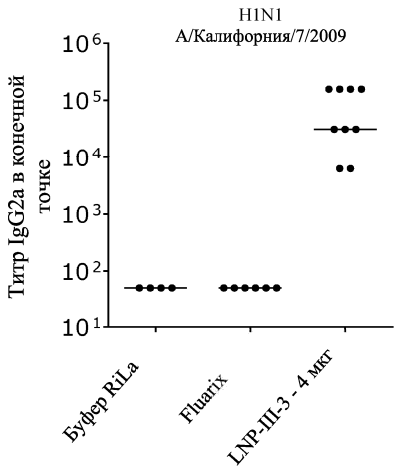


Фиг. 18С

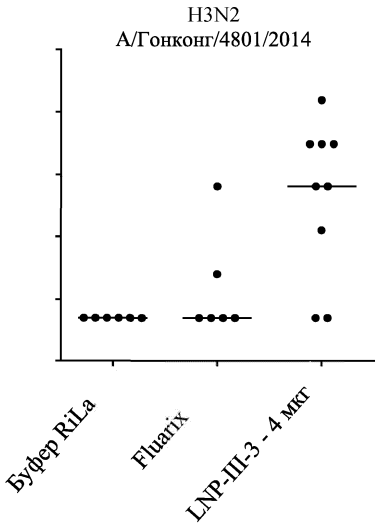
ALT в день 21



Фиг. 18D

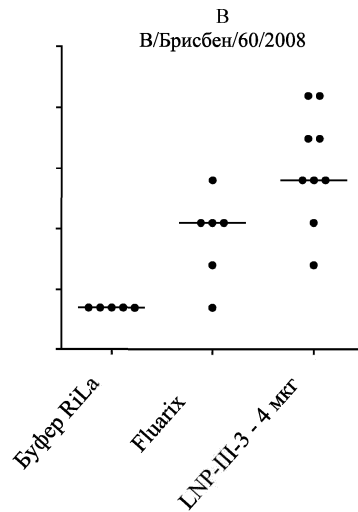


Фиг. 19А

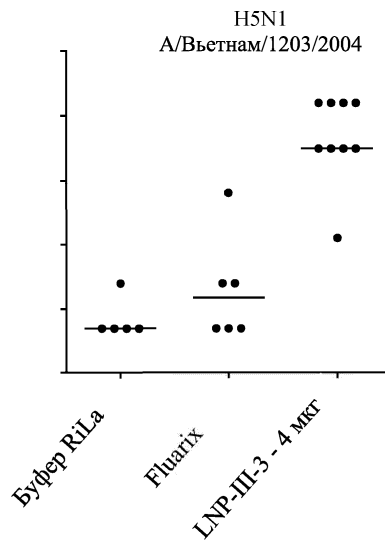


Фиг. 19В

041756



Фиг. 19С



Фиг. 19D

Ряд	Столбец 1 Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	Столбец 2 А	Столбец 3 В	Столбец 4 С	Ряд	Столбец 1 Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	Столбец 2 А	Столбец 3 В	Столбец 4 С
1	AAAI6879	1	32013	64025, 96037, 128049, 160061, 192073	7017	AEL89491	7017	39029	71041, 103053, 135065, 167077, 199089
2	AAAI6880	2	32014	64026, 96038, 128050, 160062, 192074	7018	AEL89501	7018	39030	71042, 103054, 135066, 167078, 199090
3	AAAB4362	3	32015	64027, 96039, 128051, 160063, 192075	7019	AEL89511	7019	39031	71043, 103055, 135067, 167079, 199091
4	AAAB4363	4	32016	64028, 96040, 128052, 160064, 192076	7020	AEL89521	7020	39032	71044, 103056, 135068, 167080, 199092
5	AAAB4365	5	32017	64029, 96041, 128053, 160065, 192077	7021	AEL89531	7021	39033	71045, 103057, 135069, 167081, 199093
6	AAAB4366	6	32018	64030, 96042, 128054, 160066, 192078	7022	AEL89541	7022	39034	71046, 103058, 135070, 167082, 199094
7	AAAB5781	7	32019	64031, 96043, 128055, 160067, 192079	7023	AEL89551	7023	39035	71047, 103059, 135071, 167083, 199095
8	AAC14418	8	32020	64032, 96044, 128056, 160068, 192080	7024	AEL89561	7024	39036	71048, 103060, 135072, 167084, 199096
9	AAC40508	9	32021	64033, 96045, 128057, 160069, 192081	7025	AEL89571	7025	39037	71049, 103061, 135073, 167085, 199097
10	AAF87274	10	32022	64034, 96046, 128058, 160070, 192082	7026	AEL89581	7026	39038	71050, 103062, 135074, 167086, 199098
11	AAF87275	11	32023	64035, 96047, 128059, 160071, 192083	7027	AEL89591	7027	39039	71051, 103063, 135075, 167087, 199099

Фиг. 20

	Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4		Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4
Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	А	В	С	Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	А	В	С
1	AB176276	26398	58410	90422, 122434, 154446, 186458, 218470	1091	AGX21370	27488	59500	91512, 123524, 155536, 187548, 219560
2	AB176287	26399	58411	90423, 122435, 154447, 186459, 218471	1092	AGX21381	27489	59501	91513, 123525, 155537, 187549, 219561
3	AB176298	26400	58412	90424, 122436, 154448, 186460, 218472	1093	AGX21392	27490	59502	91514, 123526, 155538, 187550, 219562
4	AB176309	26401	58413	90425, 122437, 154449, 186461, 218473	1094	AGX21403	27491	59503	91515, 123527, 155539, 187551, 219563
5	AB176321	26402	58414	90426, 122438, 154450, 186462, 218474	1095	AGX21414	27492	59504	91516, 123528, 155540, 187552, 219564
6	AB176342	26403	58415	90427, 122439, 154451, 186463, 218475	1096	AGX21425	27493	59505	91517, 123529, 155541, 187553, 219565
7	AB176353	26404	58416	90428, 122440, 154452, 186464, 218476	1097	AGX21436	27494	59506	91518, 123530, 155542, 187554, 219566
8	AB176375	26405	58417	90429, 122441, 154453, 186465, 218477	1098	AGX21447	27495	59507	91519, 123531, 155543, 187555, 219567
9	AB176386	26406	58418	90430, 122442, 154454, 186466, 218478	1099	AGX21458	27496	59508	91520, 123532, 155544, 187556, 219568
10	AB176408	26407	58419	90431, 122443, 154455, 186467, 218479	1100	AGX21469	27497	59509	91521, 123533, 155545, 187557, 219569
11	AB176419	26408	58420	90432, 122444, 154456, 186468, 218480	1101	AGX21480	27498	59510	91522, 123534, 155546, 187558, 219570

Фиг. 21

	Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4		Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4
Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	А	В	С	Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	А	В	С
1	AAA43084	14032	46044	78056, 110068, 142080, 174092, 206104	6184	ADW09288	20215	52227	84239, 116251, 148263, 180275, 212287
2	AAA43397	14033	46045	78057, 110069, 142081, 174093, 206105	6185	ADW09299	20216	52228	84240, 116252, 148264, 180276, 212288
3	AAA43412	14034	46046	78058, 110070, 142082, 174094, 206106	6186	ADW09310	20217	52229	84241, 116253, 148265, 180277, 212289
4	AAG01743	14035	46047	78059, 110071, 142083, 174095, 206107	6187	ADW09330	20218	52230	84242, 116254, 148266, 180278, 212290
5	AAG01759	14036	46048	78060, 110072, 142084, 174096, 206108	6188	ADW10475	20219	52231	84243, 116255, 148267, 180279, 212291
6	AAG01777	14037	46049	78061, 110073, 142085, 174097, 206109	6189	ADW10486	20220	52232	84244, 116256, 148268, 180280, 212292
7	AAG01786	14038	46050	78062, 110074, 142086, 174098, 206110	6190	ADW10497	20221	52233	84245, 116257, 148269, 180281, 212293
8	AAK71688	14039	46051	78063, 110075, 142087, 174099, 206111	6191	ADW10508	20222	52234	84246, 116258, 148270, 180282, 212294
9	AAND1169	14040	46052	78064, 110076, 142088, 174100, 206112	6192	ADW10519	20223	52235	84247, 116259, 148271, 180283, 212295
10	AAND1170	14041	46053	78065, 110077, 142089, 174101, 206113	6193	ADW10530	20224	52236	84248, 116260, 148272, 180284, 212296
11	AAND1171	14042	46054	78066, 110078, 142090, 174102, 206114	6194	ADW10541	20225	52237	84249, 116261, 148273, 180285, 212297

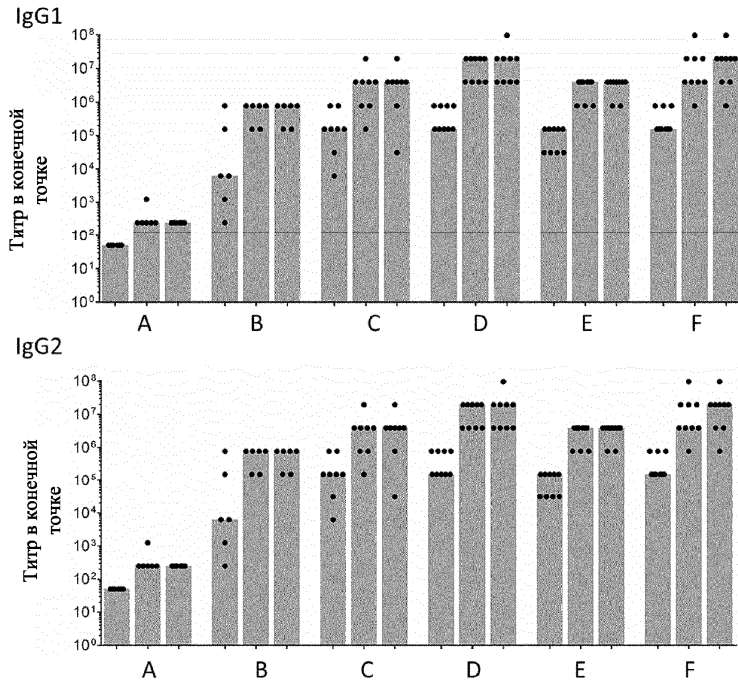
Фиг. 22

	Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4		Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4
Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	А	В	С	Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	А	В	С
1	AAN39743	28577	60589	92601, 124613, 156625, 188637, 220649	965	AGX20903	29541	61553	93565, 125577, 157589, 189601, 221613
2	AAN39747	28578	60590	92602, 124614, 156626, 188638, 220650	966	AGX20914	29542	61554	93566, 125578, 157590, 189602, 221614
3	AAN39749	28579	60591	92603, 124615, 156627, 188639, 220651	967	AGX20925	29543	61555	93567, 125579, 157591, 189603, 221615
4	AAN39751	28580	60592	92604, 124616, 156628, 188640, 220652	968	AGX20936	29544	61556	93568, 125580, 157592, 189604, 221616
5	AAN39753	28581	60593	92605, 124617, 156629, 188641, 220653	969	AGX20947	29545	61557	93569, 125581, 157593, 189605, 221617
6	AAN39759	28582	60594	92606, 124618, 156630, 188642, 220654	970	AGX20958	29546	61558	93570, 125582, 157594, 189606, 221618
7	AAN39761	28583	60595	92607, 124619, 156631, 188643, 220655	971	AGX20969	29547	61559	93571, 125583, 157595, 189607, 221619
8	AAN39769	28584	60596	92608, 124620, 156632, 188644, 220656	972	AGX20980	29548	61560	93572, 125584, 157596, 189608, 221620
9	AAN39771	28585	60597	92609, 124621, 156633, 188645, 220657	973	AGX20991	29549	61561	93573, 125585, 157597, 189609, 221621
10	AAN39773	28586	60598	92610, 124622, 156634, 188646, 220658	974	AGX21002	29550	61562	93574, 125586, 157598, 189610, 221622
11	AAN39775	28587	60599	92611, 124623, 156635, 188647, 220659	975	AGX21013	29551	61563	93575, 125587, 157599, 189611, 221623

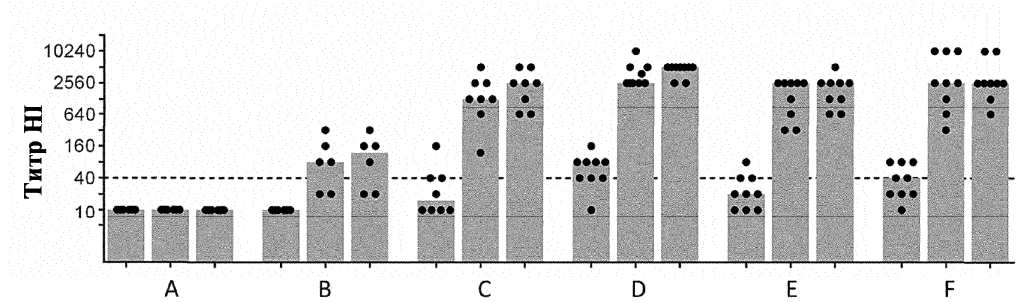
Фиг. 23

	Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4		Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3	Столбец 4
Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	A	B	C	Ряд	Номер доступа в NCBI, Genbank или EpiFlu	A	B	C
1	A8009663	30505	62517	94529, 126541, 158553, 190565, 222577	755	J0595321	31259	63271	95283, 127295, 159307, 191319, 223331
2	A8044824	30506	62518	94530, 126542, 158554, 190566, 222578	756	J0595322	31260	63272	95284, 127296, 159308, 191320, 223332
3	A8052666	30507	62519	94531, 126543, 158555, 190567, 222579	757	J0595323	31261	63273	95285, 127297, 159309, 191321, 223333
4	A8085828	30508	62520	94532, 126544, 158556, 190568, 222580	758	J0595324	31262	63274	95286, 127298, 159310, 191322, 223334
5	A810656	30509	62521	94533, 126545, 158557, 190569, 222581	759	J0595325	31263	63275	95287, 127299, 159311, 191323, 223335
6	A810657	30510	62522	94534, 126546, 158558, 190570, 222582	760	J0595326	31264	63276	95288, 127300, 159312, 191324, 223336
7	A810658	30511	62523	94535, 126547, 158559, 190571, 222583	761	J0595327	31265	63277	95289, 127301, 159313, 191325, 223337
8	A810659	30512	62524	94536, 126548, 158560, 190572, 222584	762	J0595328	31266	63278	95290, 127302, 159314, 191326, 223338
9	A810660	30513	62525	94537, 126549, 158561, 190573, 222585	763	J0647510	31267	63279	95291, 127303, 159315, 191327, 223339
10	A810661	30514	62526	94538, 126550, 158562, 190574, 222586	764	J0685892	31268	63280	95292, 127304, 159316, 191328, 223340
11	A810662	30515	62527	94539, 126551, 158563, 190575, 222587	765	J0685893	31269	63281	95293, 127305, 159317, 191329, 223341

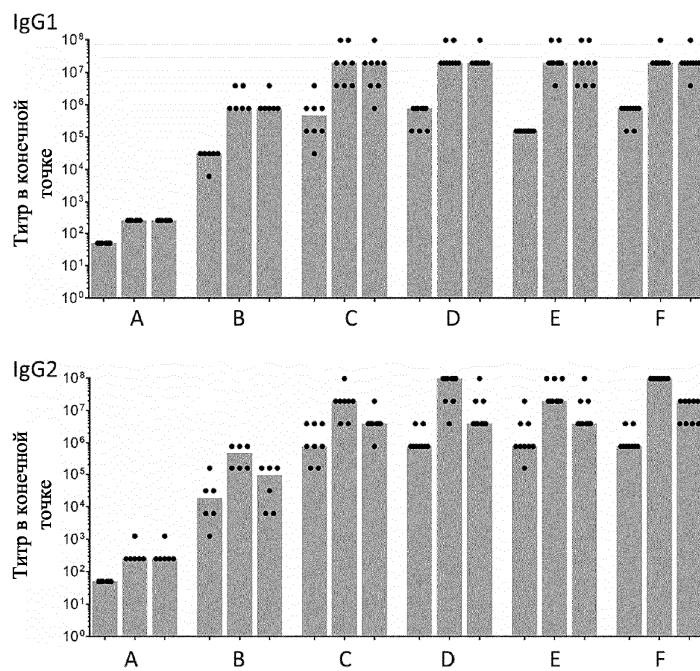
Фиг. 24



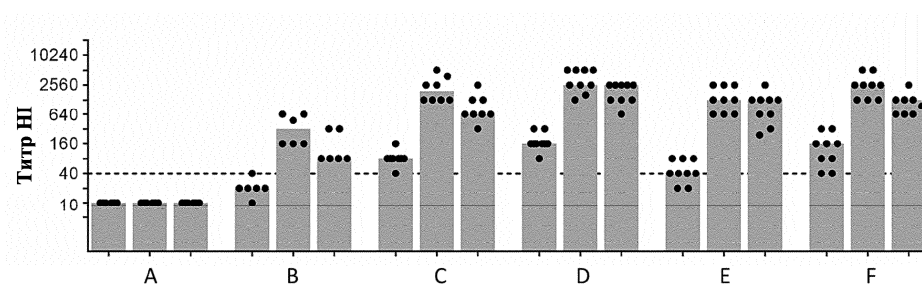
Фиг. 25



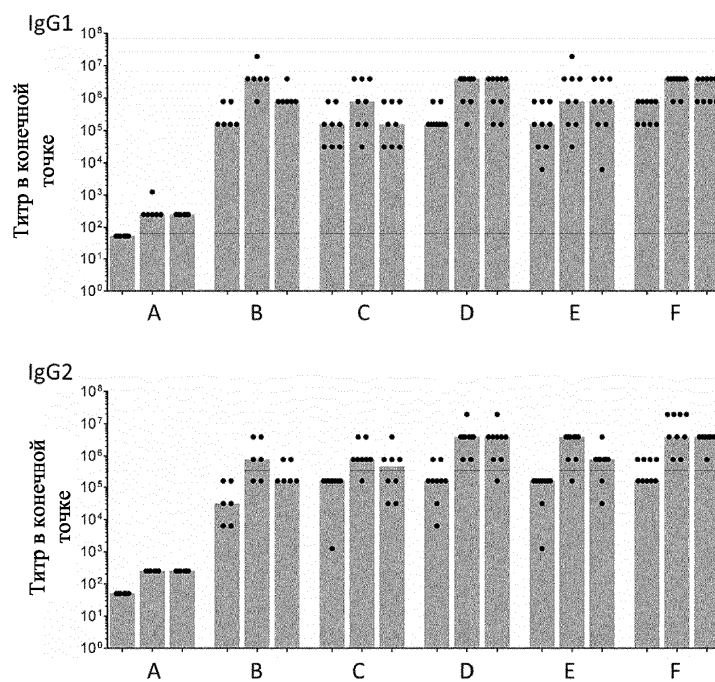
Фиг. 26



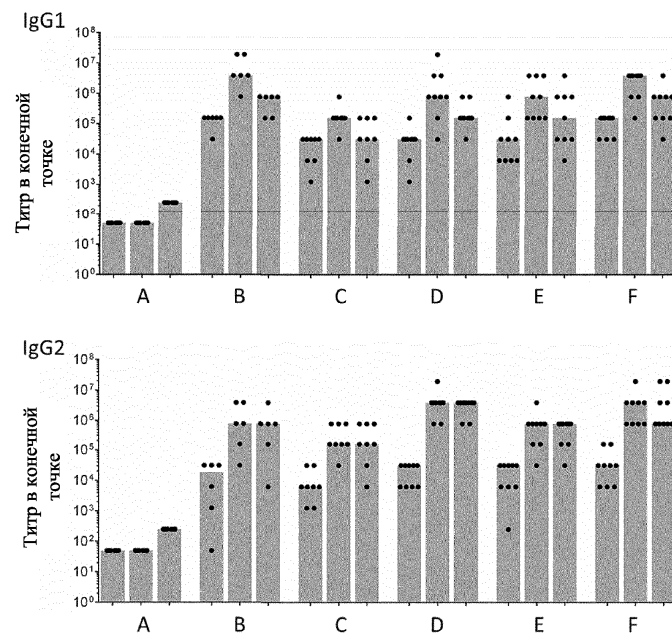
Фиг. 27



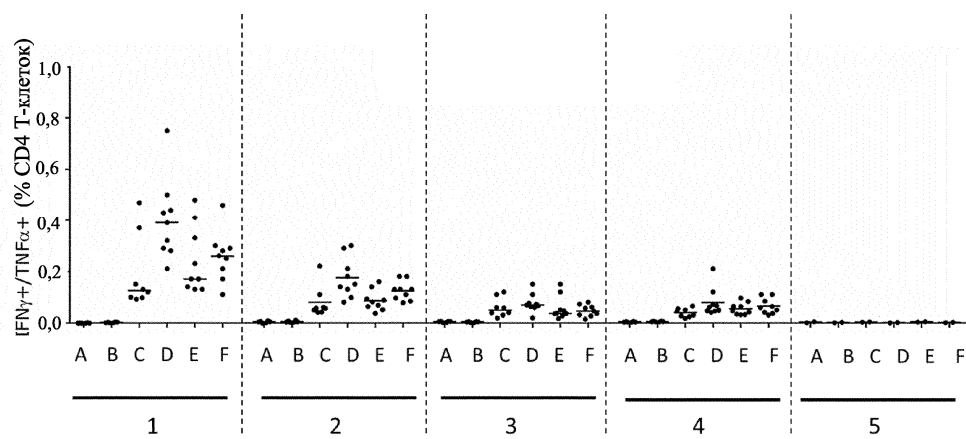
Фиг. 28



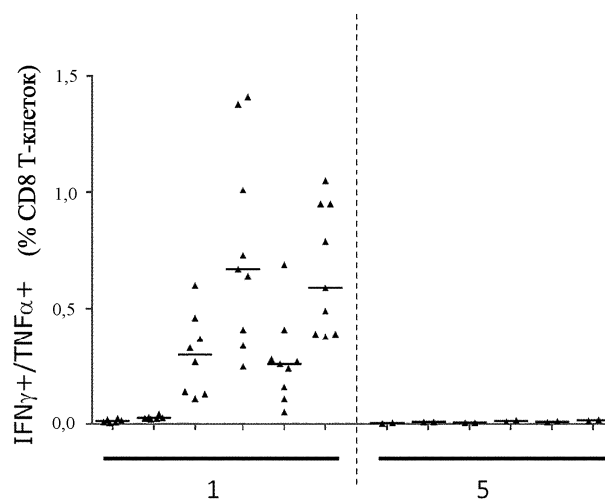
Фиг. 29



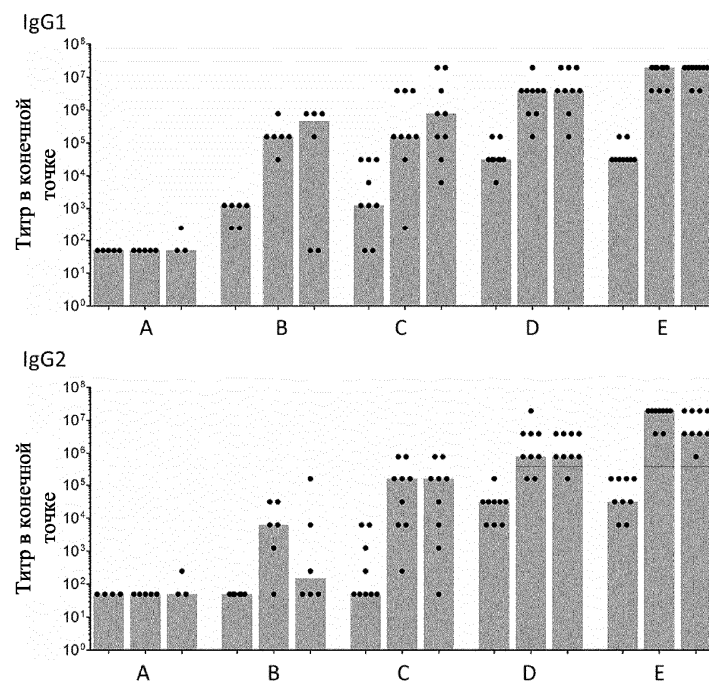
Фиг. 30



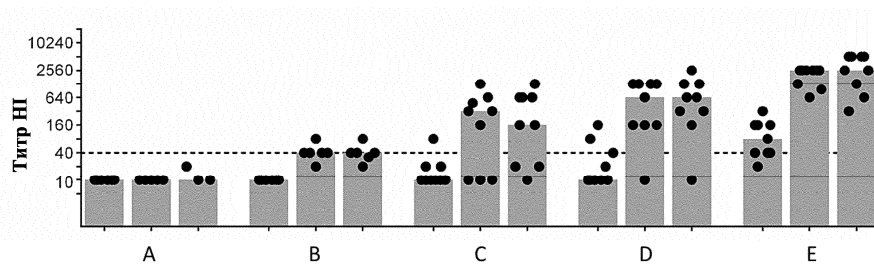
Фиг. 31



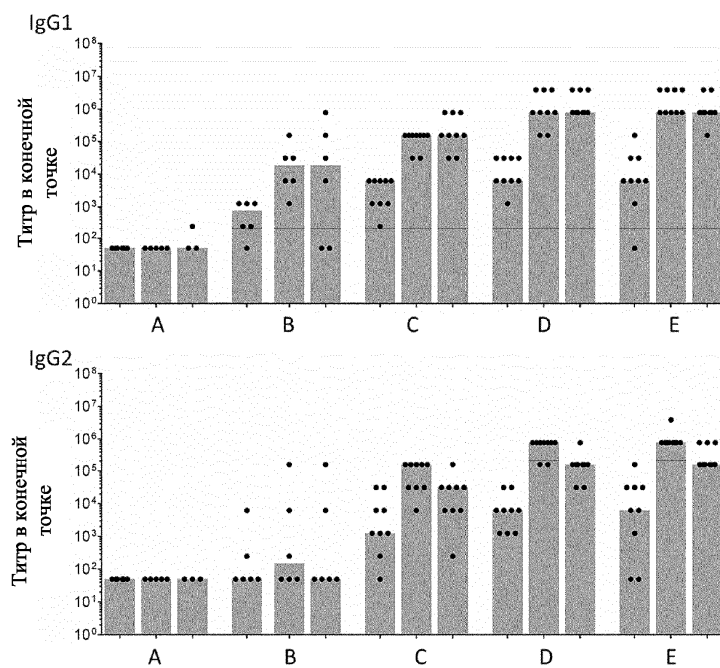
Фиг. 32



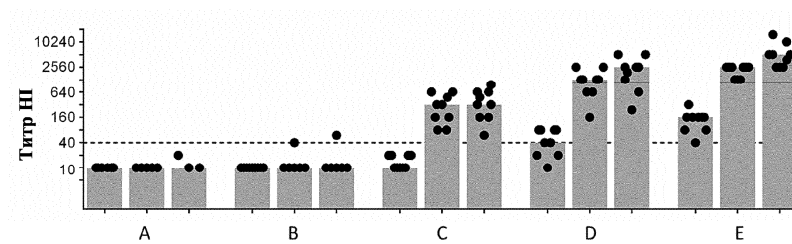
Фиг. 33



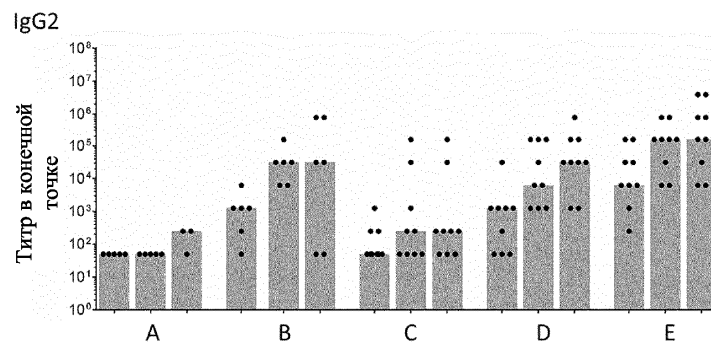
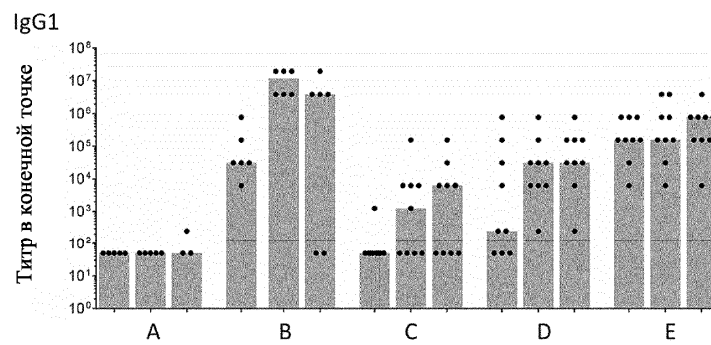
Фиг. 34



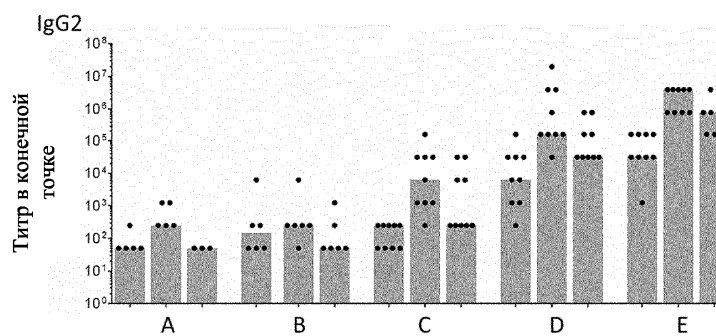
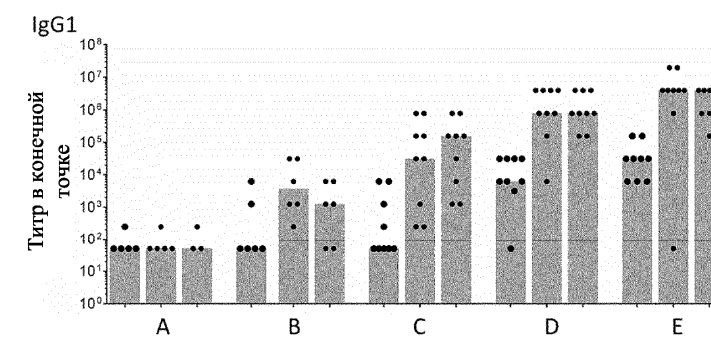
Фиг. 35



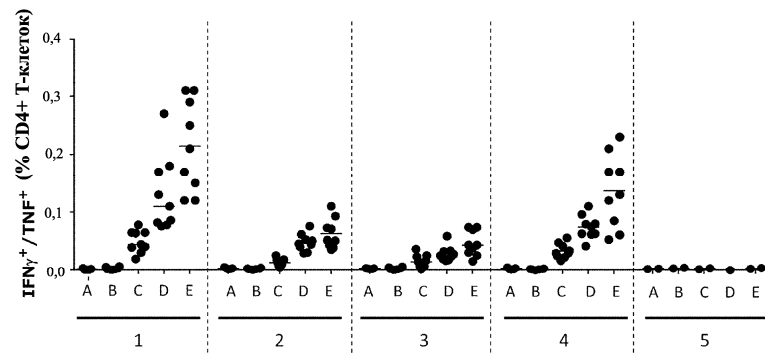
Фиг. 36



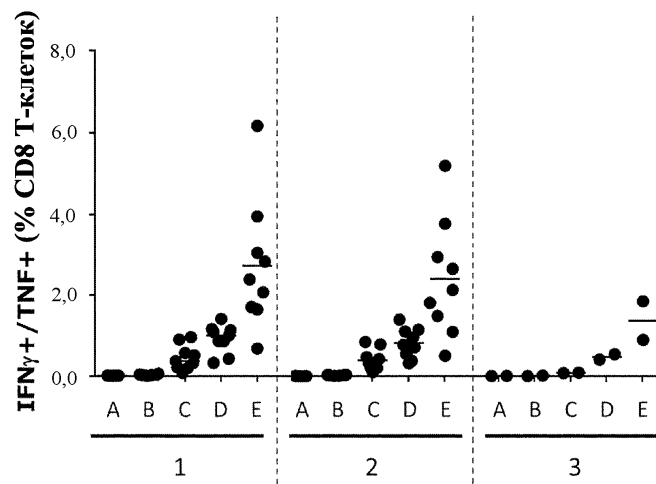
Фиг. 37



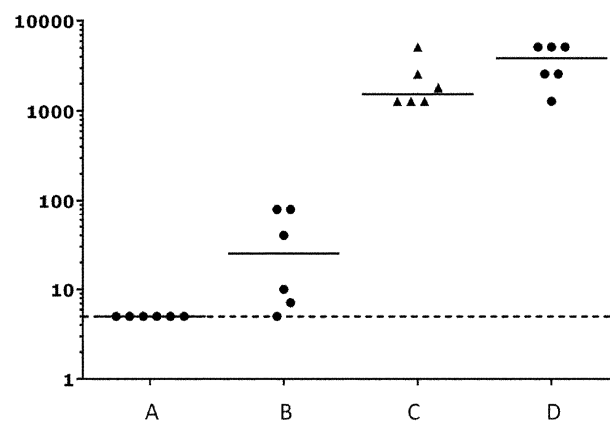
Фиг. 38



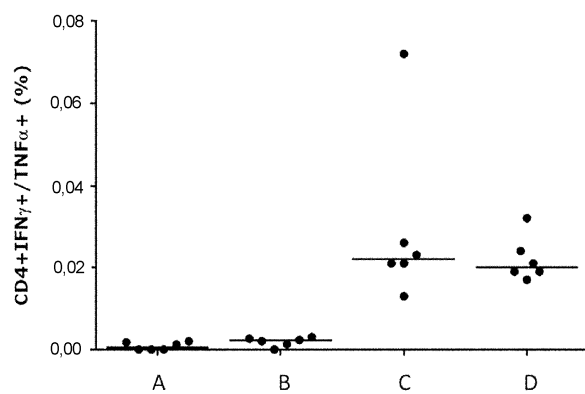
Фиг. 39



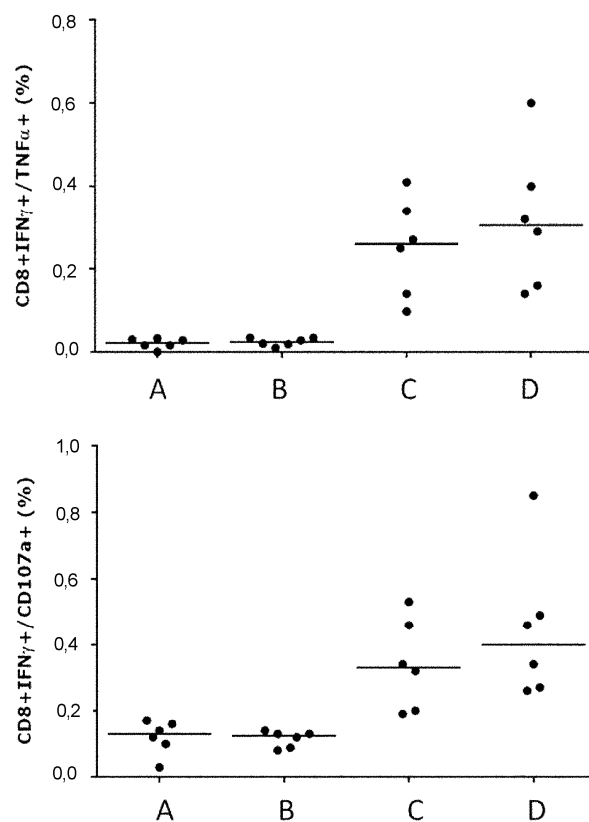
Фиг. 40



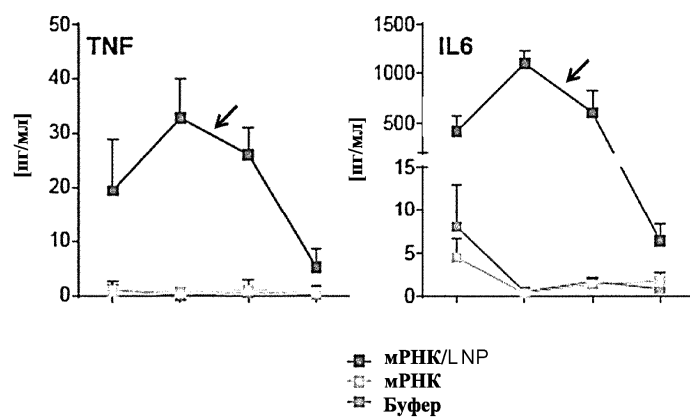
Фиг. 41



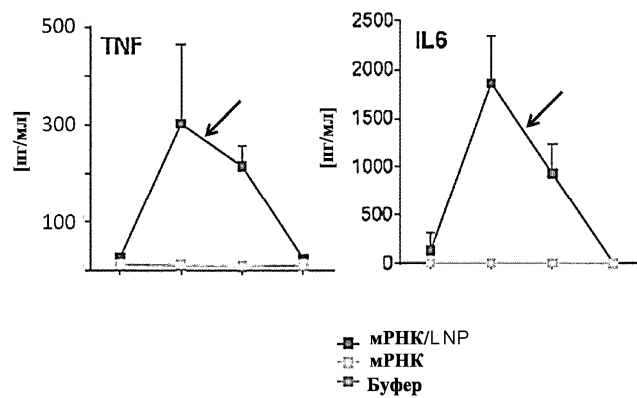
Фиг. 42



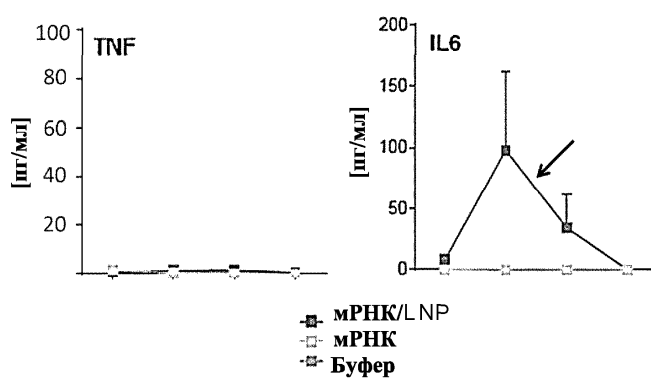
Фиг. 43



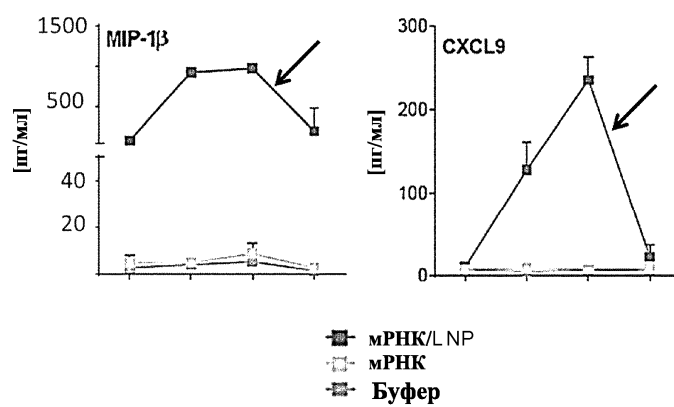
Фиг. 44



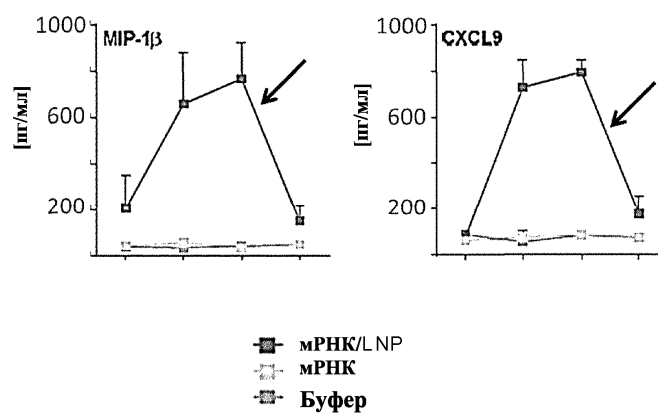
Фиг. 45



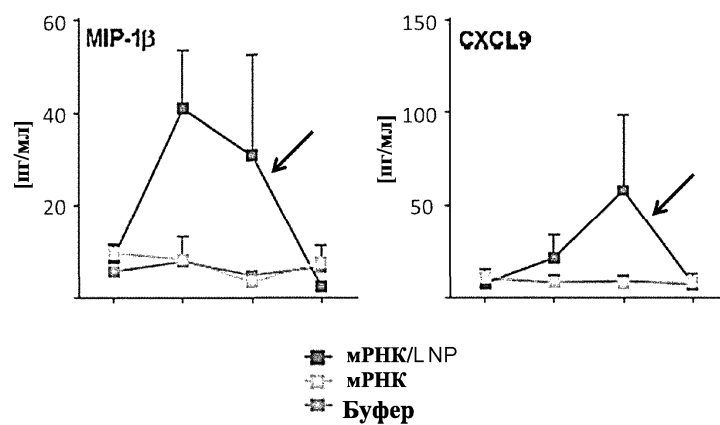
Фиг. 46



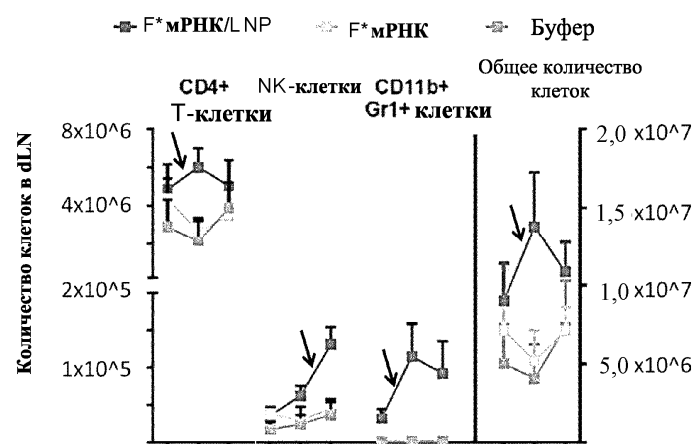
Фиг. 47



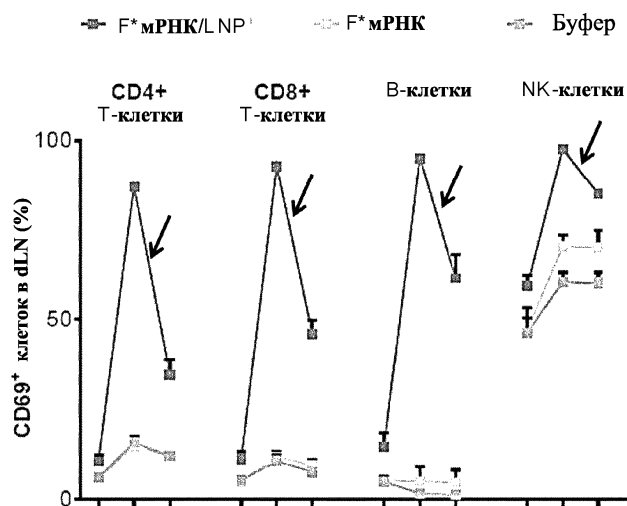
Фиг. 48



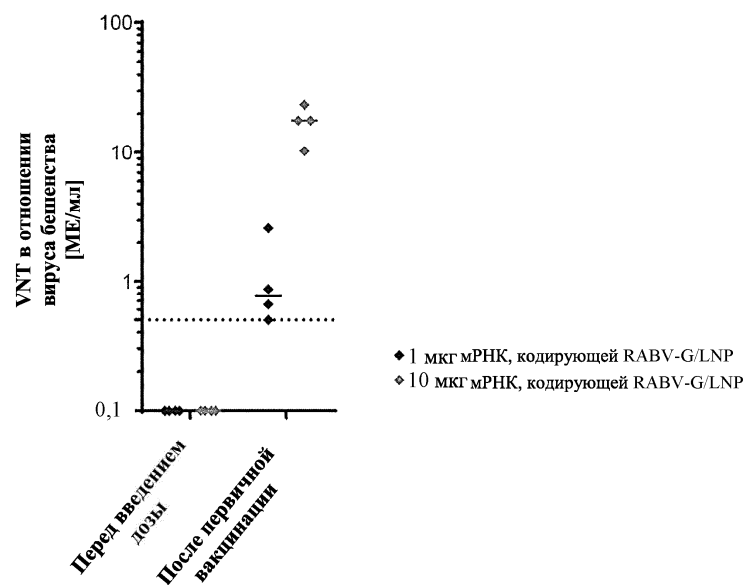
Фиг. 49



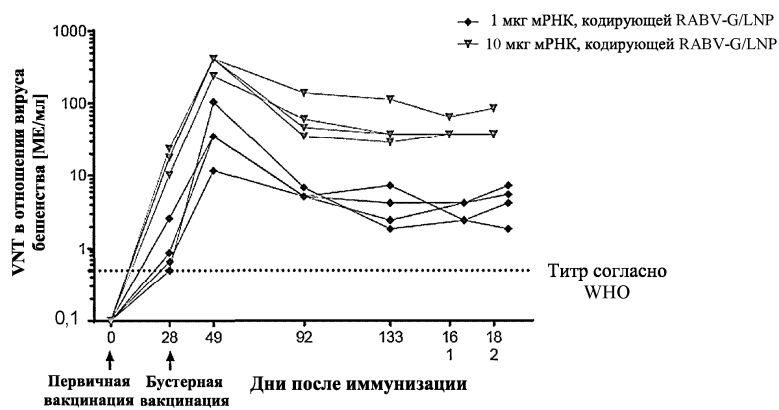
Фиг. 50А



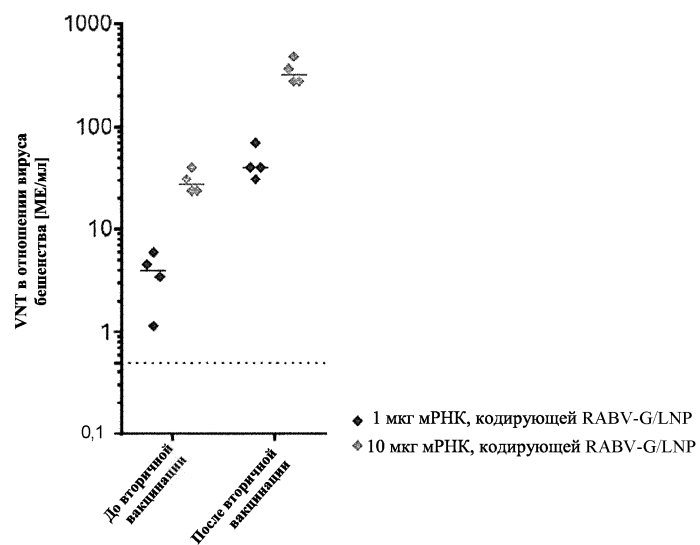
Фиг. 50В



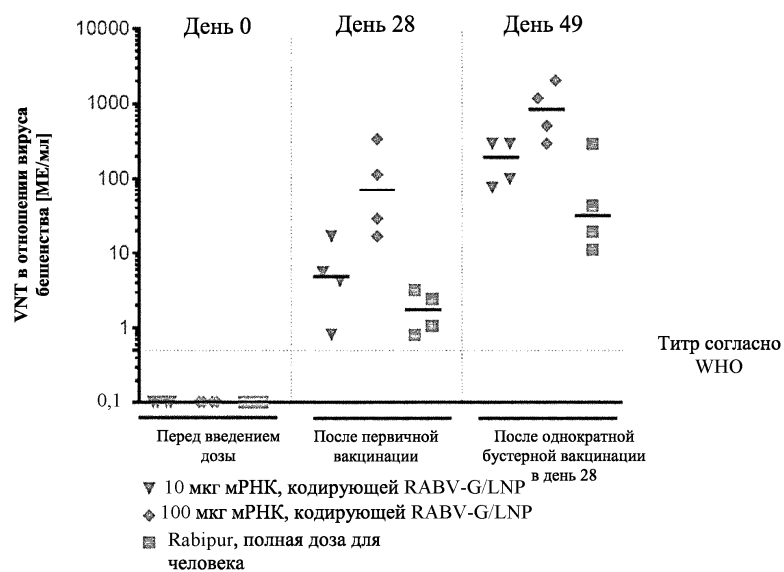
Фиг. 51



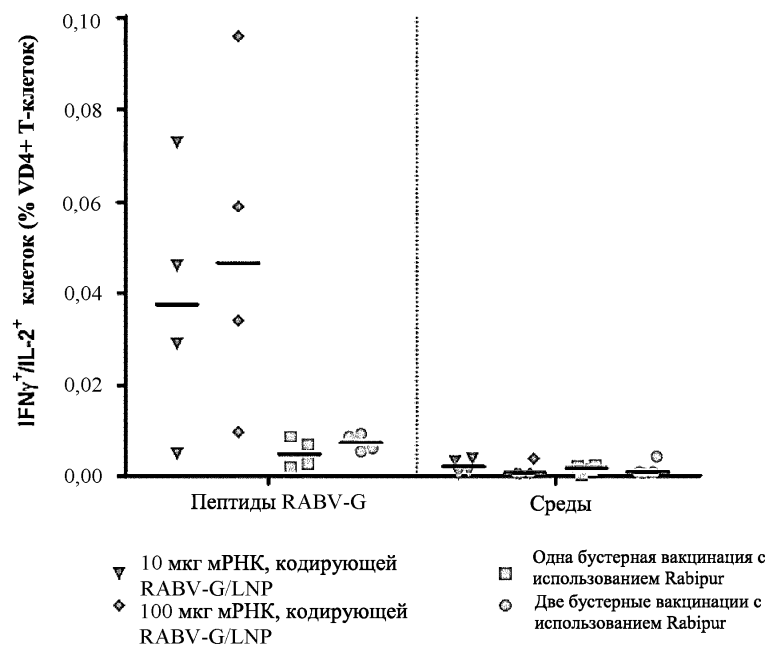
Фиг. 52



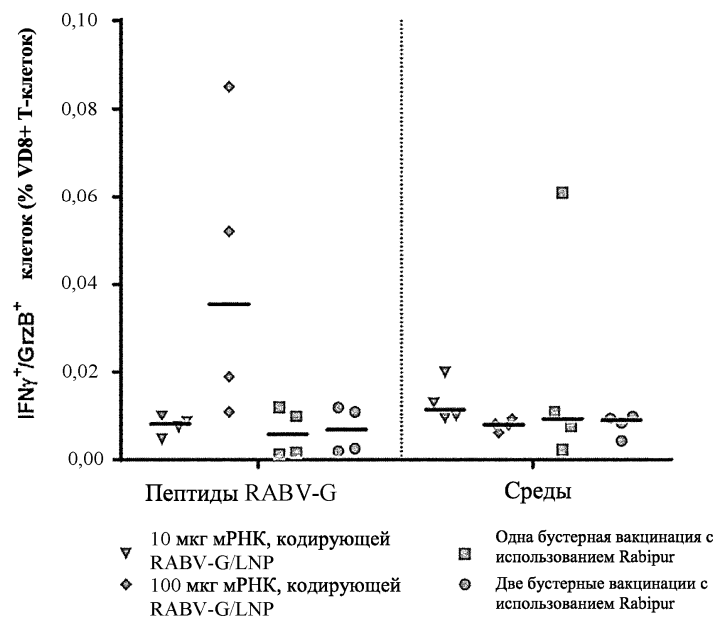
Фиг. 53



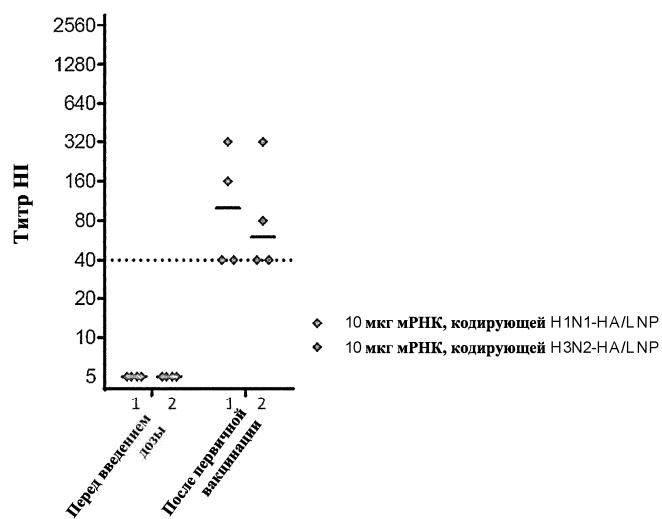
Фиг. 54



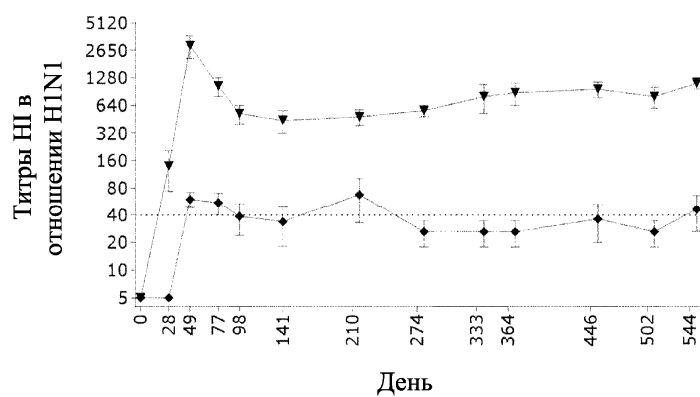
Фиг. 55



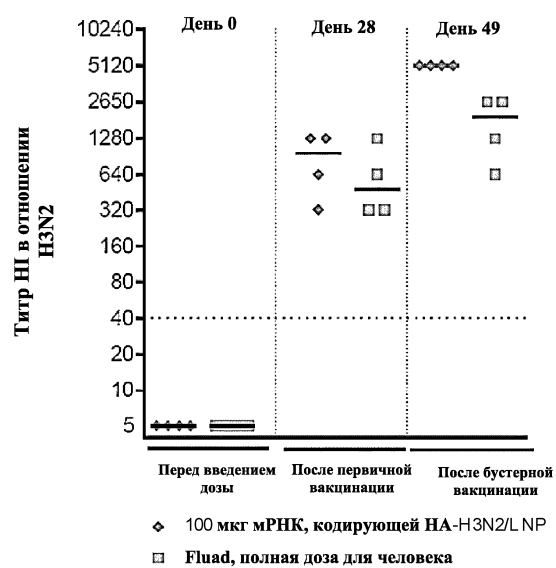
Фиг. 56



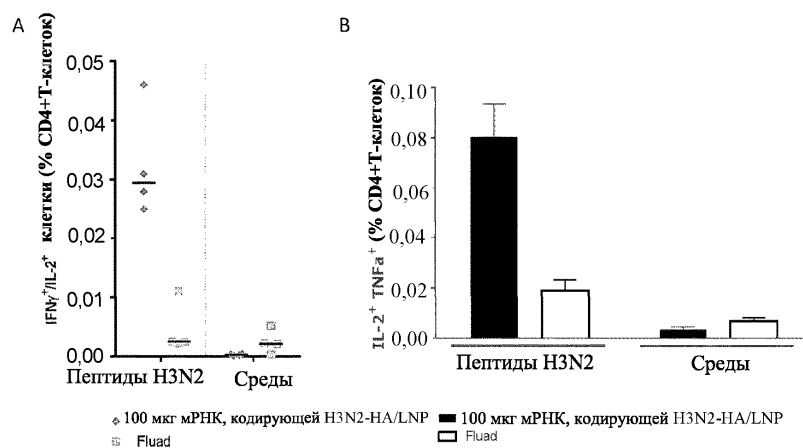
Фиг. 57



Фиг. 58

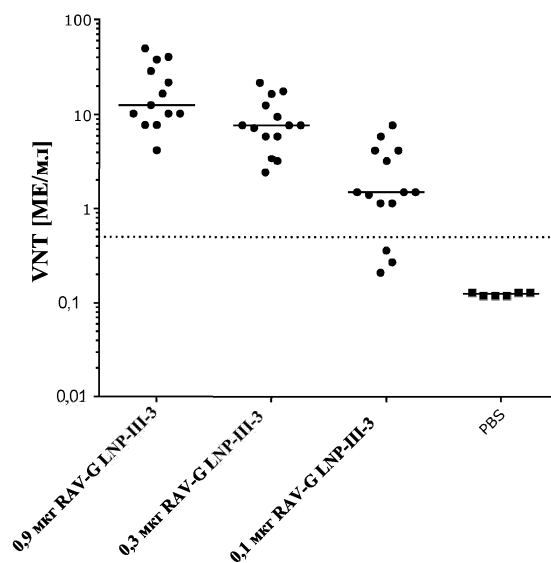


Фиг. 59



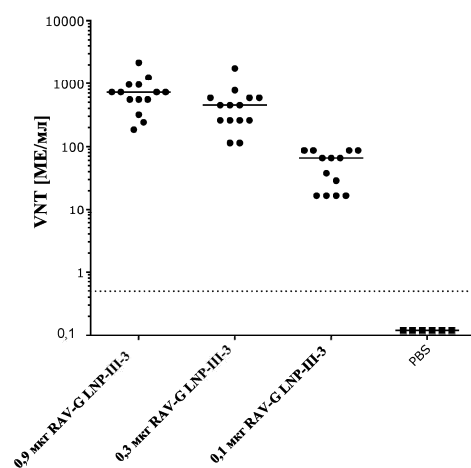
Фиг. 60

VNT в d21



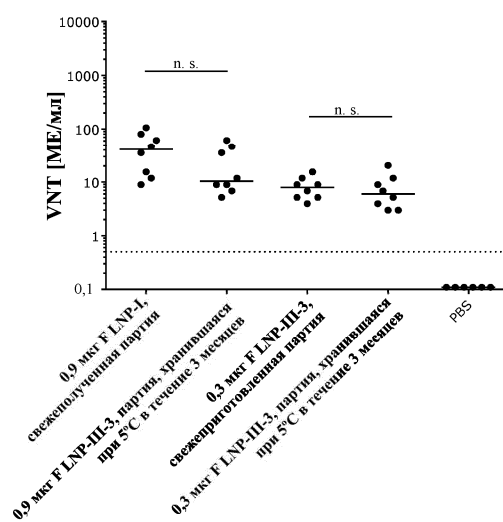
Фиг. 61A

VNT в d35



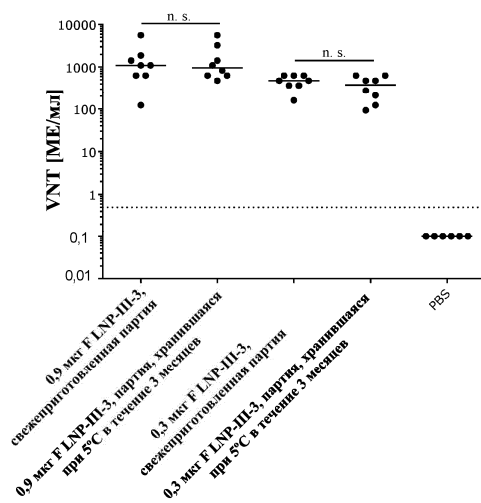
Фиг. 61В

VNT в d21

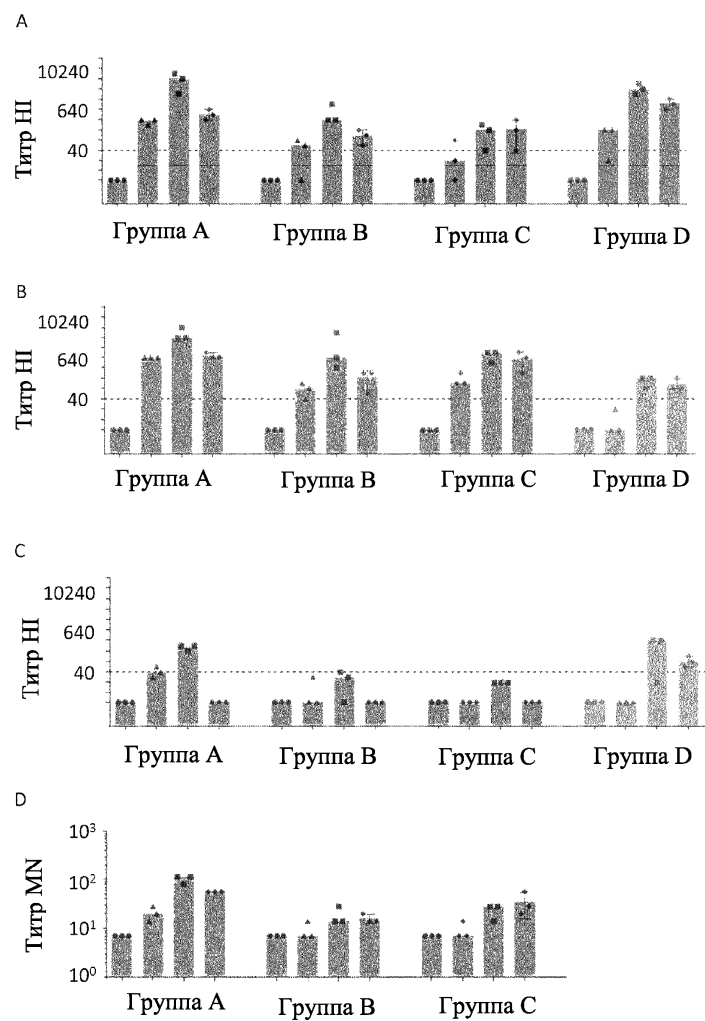


Фиг. 62А

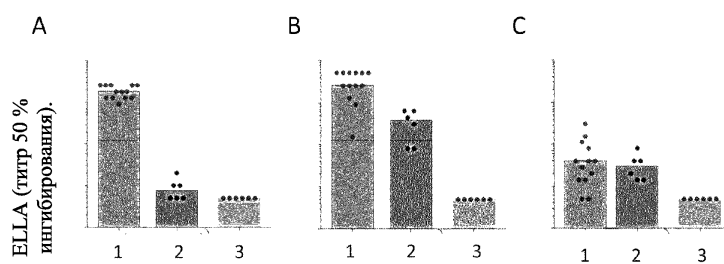
VNT в d35



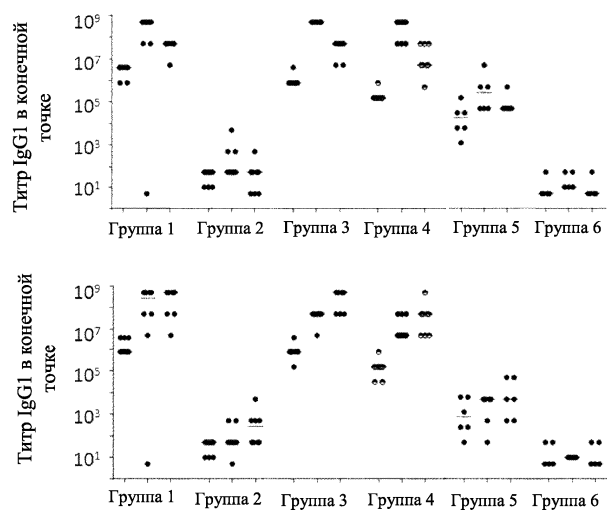
Фиг. 62В



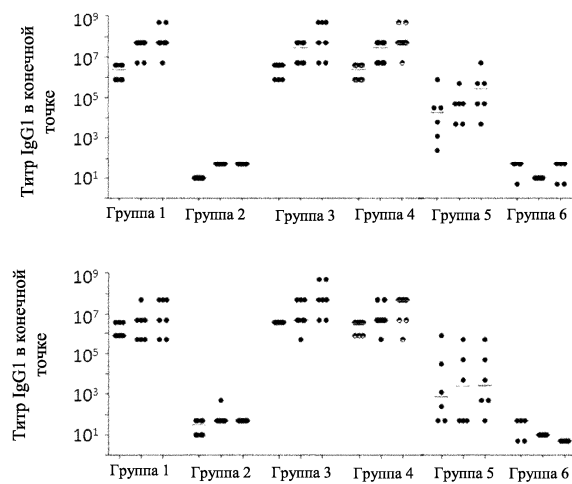
Фиг. 63



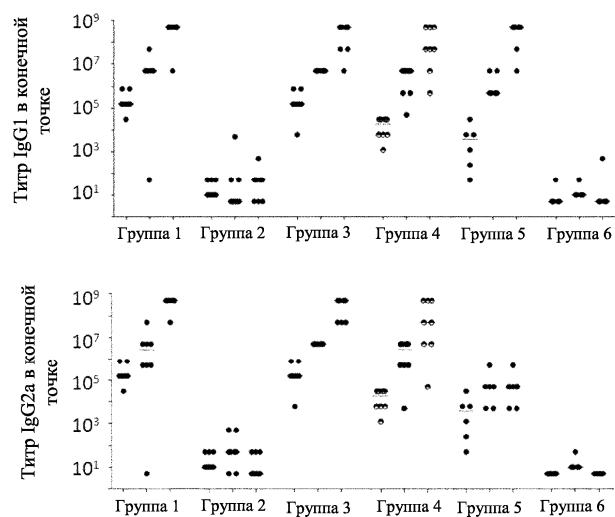
Фиг. 64



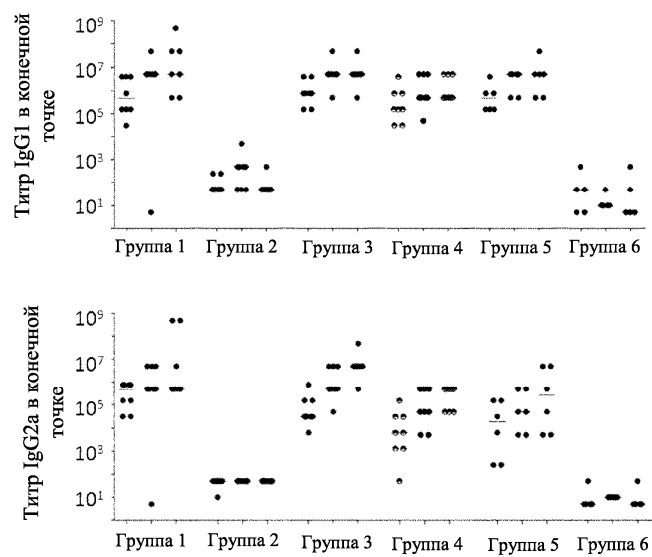
Фиг. 65



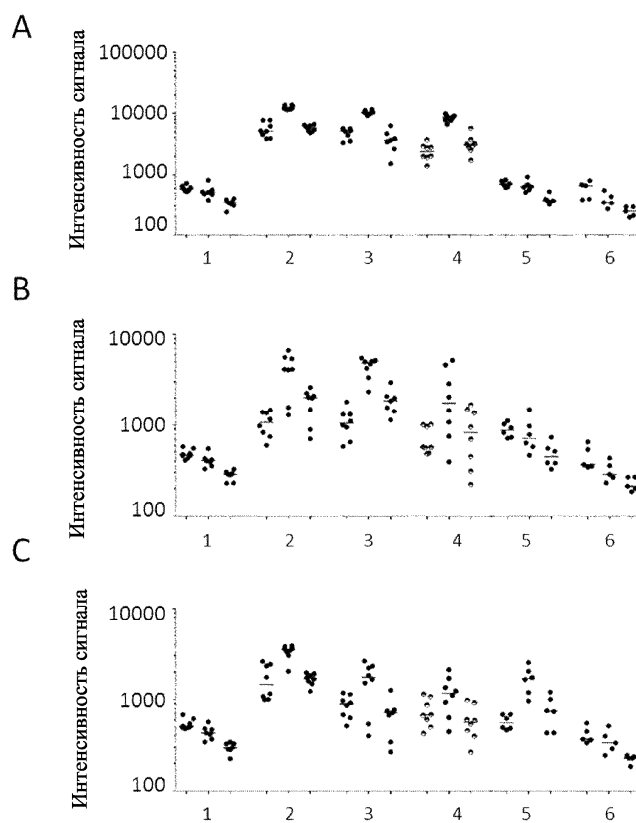
Фиг. 66



Фиг. 67

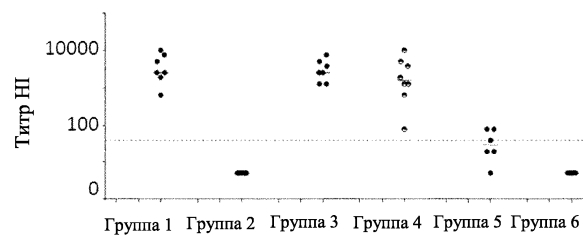


Фиг. 68

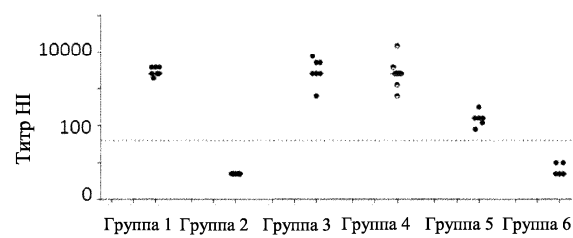


Фиг. 69

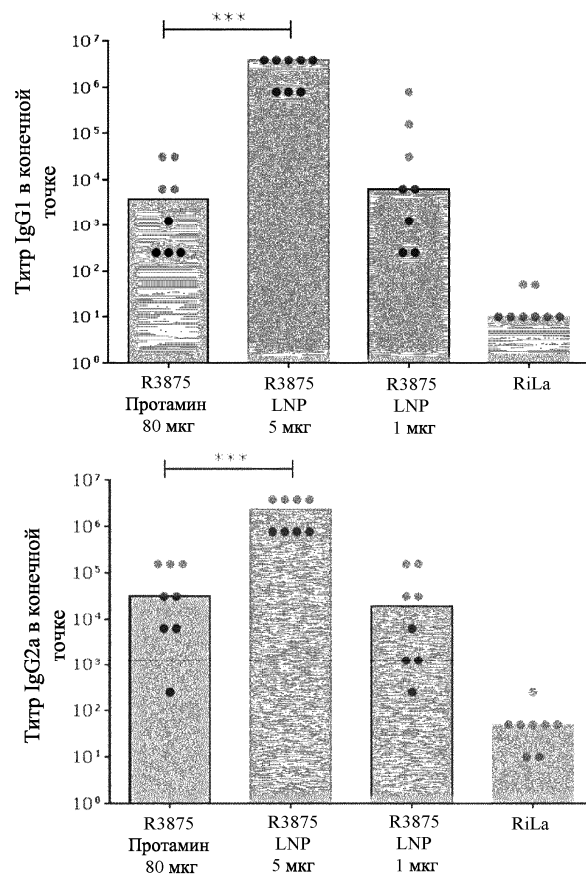
А



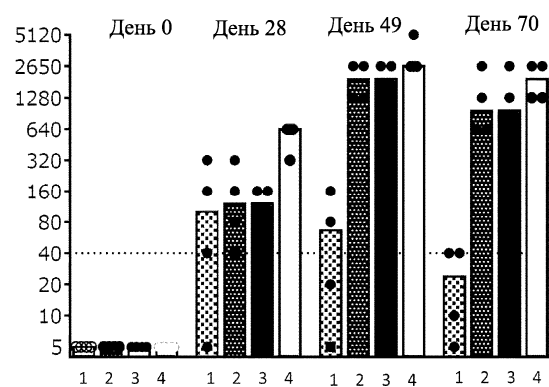
В



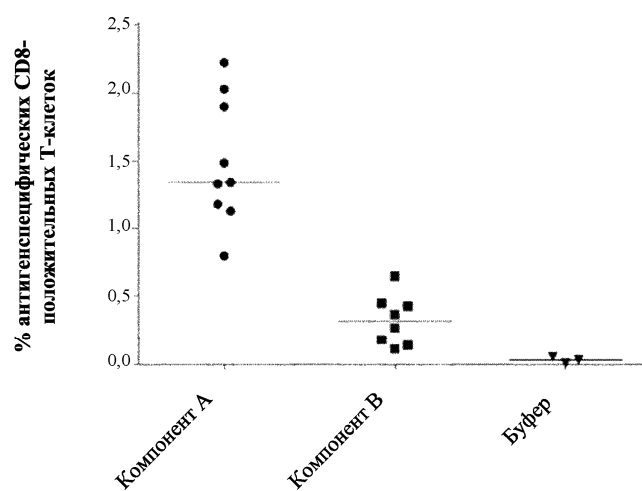
Фиг. 70



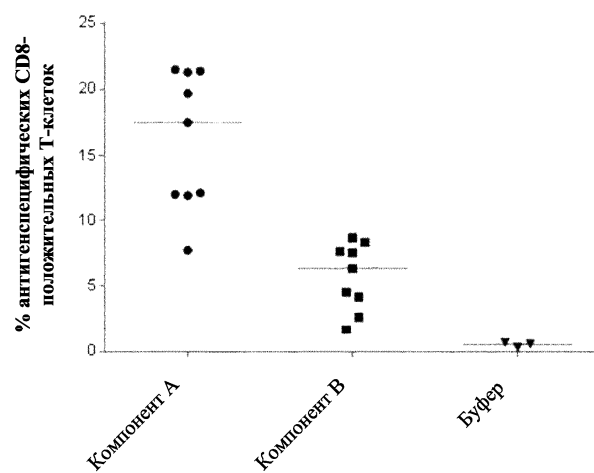
Фиг. 71



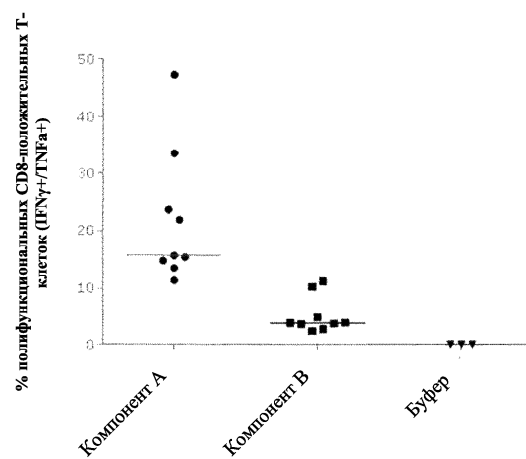
Фиг. 72



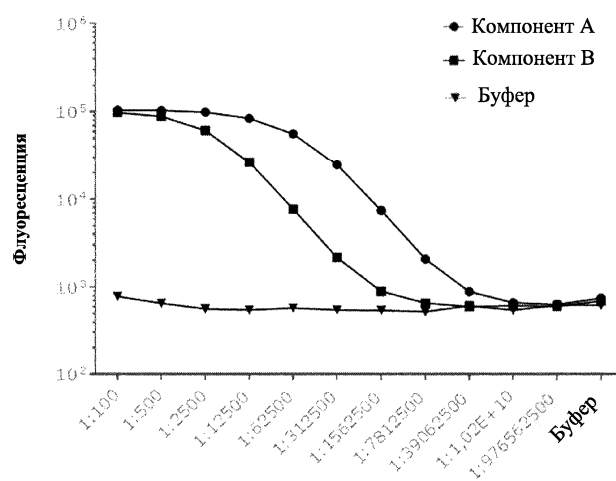
Фиг. 73



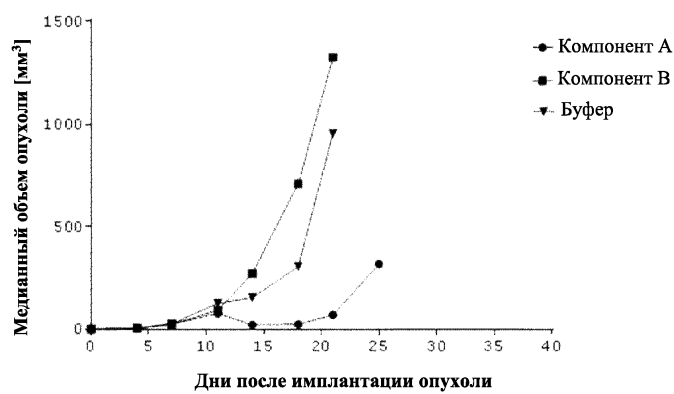
Фиг. 74



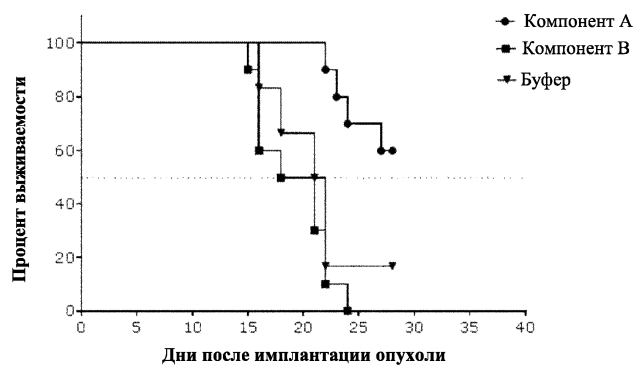
Фиг. 75



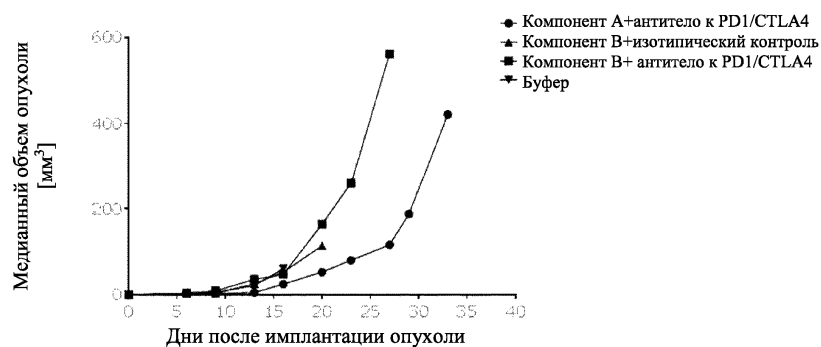
Фиг. 76



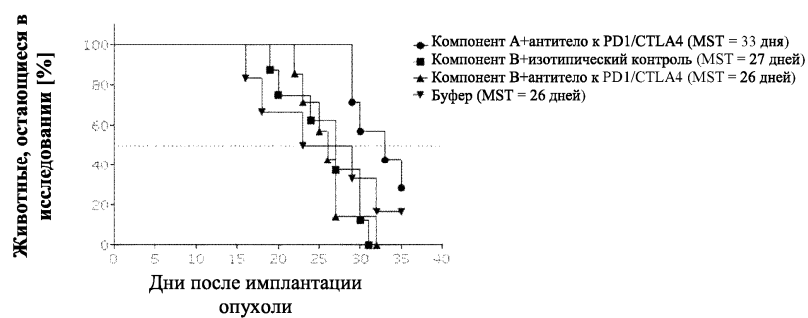
Фиг. 77



Фиг. 78



Фиг. 79



Фиг. 80



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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