(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- Дата публикации заявки (43)2023.11.02
- (22) Дата подачи заявки 2022.01.10

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)

(54)ЭКСПРЕССИОННЫЕ КОНСТРУКЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

- (31) 63/135,501
- (32)2021.01.08
- (33)US
- (86) PCT/US2022/011841
- (87) WO 2022/150712 2022.07.14
- (71) Заявитель: СТРЭНД ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:

Китада Тасуку, Бекрафт Джэйкоб, Соуэлл Райан, Кхурана Джасприт, Саймон Анна, Барберио Джозеф, Чжао Вэйюй, Лемер Александр, Шан Аалок (US)

(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В., Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М., Христофоров А.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится К выделенному полинуклеотиду, содержащему последовательность, которая кодирует молекулу интерлейкина (IL)-12, и системе доставки, которая может нести полинуклеотиды. Настоящее изобретение также относится к способам получения полинуклеотидов и способам лечения с их применением.

ЭКСПРЕССИОННЫЕ КОНСТРУКЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Описание

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США № 63/135501, поданной 8 января 2021 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ссылка на перечень последовательностей, поданный электронным путем

[0002] Содержание представленного электронным путем перечня последовательностей в формате текстового файла ASCII (название: 4597_005PC01_SequenceListing_ST25.txt, размер: 246 918 байт, дата создания: 9 января 2022 г.), поданного вместе с настоящей заявкой, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Благодаря способности белка IL-12 активировать как NK-клетки, так и цитотоксические Т-клетки, его изучали в качестве многообещающего противоракового терапевтического средства с 1994 г. См. Nastala, С. L. et al., J Immunol 153: 1697-1706 (1994). Однако, несмотря на высокие ожидания, ранние клинические исследования не дали удовлетворительных результатов. Lasek W. et al., Cancer Immunol Immunother 63: 419-435, 424 (2014). Повторное введение IL12 у большинства пациентов приводило к адаптационному ответу и прогрессирующему снижению уровня индуцированного IL-12 интерферона гамма (IFN-γ) в крови. Более того, хотя было признано, что IL-12-индуцированная противораковая активность в значительной степени опосредована вторичной секрецией IFN-γ, сопутствующая индукция IFN-γ наряду с другими цитокинами (например, TNF-α) или хемокинами (IP-10 или MIG) под действием IL-12 вызывала сильную токсичность.

[0004] В дополнение к отрицательной обратной связи и токсичности неочевидная эффективность терапии IL-12 в клинических условиях может быть вызвана сильной иммунодепрессивной средой у людей. Для того, чтобы свести к минимуму токсичность IFN-γ и повысить эффективность IL-12, ученые пробовали различные подходы, такие как различные протоколы доз и времени для терапии IL-12. См. Sacco, S. et al., Blood 90: 4473-4479 (1997), Leonard, J. P. et al., Blood 90: 2541-2548 (1997), Coughlin, C. M. et al., Cancer Res. 57: 2460-2467 (1997), Asselin-Paturel, C. et al., Cancer 91: 113-122 (2001), и Saudemont, A. et al., Leukemia 16: 1637-1644 (2002). Тем не менее, эти подходы не оказали существенного влияния на выживаемость пациентов. Капд, W. К., et al., Human Gene Therapy 12: 671-684 (2001). Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в улучшенном терапевтическом подходе к применению IL-12 для лечения опухолей.

Сущность настоящего изобретения

[0005] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»). Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75.

[0006] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 53. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІС-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 54. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 55. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 56. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІС-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІС-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 58. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІІ-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 59. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, 69 или 74. Согласно некоторым аспектам

молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 66, 70 или 75. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 62. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 63. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64.

[0007] Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»). Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEO ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125.

[0008] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая

на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 102. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12a, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 103. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12a, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 104. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12a, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІІ-12а, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 106. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 107. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12a, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 108. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 109. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115, 119 или 124. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая ІL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 116, 120 или 125. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12a, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 112. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12a, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 114.

[0009] Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему первую молекулу нуклеиновой кислоты и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, где первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β») и содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 69, SEQ

NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75, и вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α») и содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125.

[0010] Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 52, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 102. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 53, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 103. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 54, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 104. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по

меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 55, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 56, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 106. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 57, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 107. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEO ID NO: 58, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 108. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 59, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 109. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, 69 или 74, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115, 119 или 124. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 66, 70 или 75, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 116, 120 или 125. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 62, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 112. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEO ID NO: 63, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 64, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 114.

[0011] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид, как раскрыто в настоящем документе, дополнительно содержит третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую линкер, который соединяет первую молекулу нуклеиновой кислоты и вторую

молекулу нуклеиновой кислоты. Согласно определенным аспектам линкер содержит аминокислотный линкер из по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 аминокислот. Согласно некоторым аспектам линкер содержит линкер (GS). Согласно некоторым аспектам линкер (GS) имеет формулу (Gly3Ser)п или S(Gly3Ser)п, где п представляет собой положительное целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100. Согласно некоторым аспектам линкер (Gly3Ser)п представляет собой (Gly3Ser)3 или (Gly3Ser)4. Согласно определенным аспектам третья молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая линкер, содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 168 - 170.

[0012] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид согласно настоящему изобретению дополнительно содержит дополнительную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фрагмент, увеличивающий время полужизни. Согласно определенным аспектам фрагмент, увеличивающий время полужизни, содержит Fc, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающий фрагмент, PAS, HAP, трансферрин или его фрагмент, XTEN или любую их комбинацию.

[0013] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид, как описано в настоящем документе, дополнительно содержит дополнительную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность. Согласно определенным аспектам дополнительная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая лидерную последовательность, содержит любую из последовательностей, как представлено в SEQ ID NO: 26 - 50.

[0014] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 26, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 76, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 101, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 126, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 126, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 147.

[0015] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (а) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 77, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 102, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 127, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 127, и (б) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 148.

[0016] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 28, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 78, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 103, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 128, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 149.

[0017] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 54, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представленость, как

представлено в SEQ ID NO: 79, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 104, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 129, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 150.

[0018] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 30, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 55, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 130, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 151.

[0019] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 31, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 81, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 131, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 152.

[0020] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую

молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (а) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 32, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 57, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 82, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 107, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 132, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 153.

[0021] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 33, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 58, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 108, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 133, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 154.

[0022] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 34, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 84, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 109, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 134, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 155.

[0023] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную

последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 37, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 62, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 112, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 137, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 137, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 158.

[0024] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (а) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 38, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 88, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 113, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 138, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 159.

[0025] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3′) (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 39, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 89, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 89, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 114, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты

содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 139, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 160.

[0026] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 44, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 94, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 140, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 161.

[0027] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 45, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 95, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 120, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 141, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 162.

[0028] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (а) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID

NO: 46, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 71, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 96, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 121, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 142, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 163.

[0029] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 47, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 72, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 122, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 143, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 164.

[0030] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 36, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 61, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 111, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 136, и (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 157.

[0031] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер,

(iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер, и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок люмикан, где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 48, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 73, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 98, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 123, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 144, (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 165, (g) седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 168, и (h) восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 171.

[0032] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (у) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер, и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок люмикан, где: (а) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 49, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 74, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 99, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 124, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 145, (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 166, (g) седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 169, и (h) восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 172.

[0033] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, (vi) шестую

молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер, и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок люмикан, где: (а) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 50, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 75, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 100, (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 125, (e) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 146, (f) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 1770, и (h) восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 170, и (h) восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 173.

[0034] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 40, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 90, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 90, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 115.

[0035] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 41, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 91, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 91, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 116.

[0036] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как

представлено в SEQ ID NO: 42, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 67, (c) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 92, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 117.

[0037] Настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где: (a) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 43, (b) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 93, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 93, и (d) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118.

[0038] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид, как описано в настоящем документе, дополнительно содержит 5'-кэп. Согласно определенным аспектам 5'-кэп выбран из группы, состоящей из m₂ ^{7,2'-O}GppspGRNA, m⁷GppppG, m⁷Gppppm⁷G, m₂ ^(7,3'-O)GppppG, m₂ ^(7,2'-O)GppspG(D1), m₂ ^(7,2'-O)GppspG(D2), m₂ ^{7,3'-O}Gpppp(m₁^{2'-O)}ApG, (m⁷G-3' mppp-G, который может быть эквивалентным образом сконструирован как 3' О-Ме-m7G(5')ppp(5')G), N7,2'-О-диметилгуанозин-5'-грифосфат-5'-гуанозина, m⁷Gm-ppp-G, N7-(4-хлорфеноксиэтил)-G(5')ppp(5')G, N7-(4-хлорфеноксиэтил)-m^{3'-O}G(5')ppp(5')G, 7mG(5')ppp(5')N,pN2p, 7mG(5')ppp(5')NlmpNp, 7mG(5')-ppp(5')NlmpN2 mp, m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up, инозина, N1-метилгуанозина, 2' фтор-гуанозина, 7-деаза-гуанозина, 8-оксо-гуанозина, 2-амино-гуанозина, LNА-гуанозина, 2-азидо-гуанозина, N1-метилпсевдоуридина, m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG и их комбинаций.

[0039] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид согласно настоящему изобретению дополнительно содержит регуляторный элемент. Согласно определенным аспектам регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из по меньшей мере одного элемента энхансера трансляции (TEE), последовательности инициации трансляции, по меньшей мере одного сайта связывания микроРНК или его исходной последовательности, области 3' хвоста связанных нуклеозидов, AU-богатого элемента (ARE), пост-транскрипционного контрольного модулятора и их комбинаций.

[0040] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид, как описано в настоящем документе, дополнительно содержит область 3' хвоста связанных нуклеозидов. Согласно определенным аспектам область 3' хвоста связанных нуклеозидов содержит поли-А хвост, полиА-G квартет или последовательность «петля-на-стебле».

[0041] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеозид. Согласно

определенным аспектам по меньшей мере один модифицированный нуклеозид выбран из группы, состоящей из 6-аза-цитидина, 2-тио-цитидина, α-тио-цитидина, псевдо-изо-цитидина, 5-аминоаллил-уридина, 5-йод-уридина, N1-метил-псевдоуридина, 5,6-дигидроуридина, α-тио-уридина, 6-аза-уридина, 5-гидрокси-уридина, деокси-тимидина, псевдо-уридина, инозина, α-тио-гуанозина, 8-оксо-гуанозина, О6-метил-гуанозина, 7-деаза-гуанозина, N1-метил-аденозина, 2-амино-6-хлор-пурина, N6-метил-2-амино-пурина, 6-хлор-пурина, N6-метил-аденозина, α-тио-аденозина, 8-азидо-аденозина, 7-деаза-аденозина, пирроло-цитидина, 5-метил-цитидина, N4-ацетил-цитидина, 5-метил-уридина, 5-йод-цитидина и их комбинаций.

[0042] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид, как описано в настоящем документе, способен к саморепликации. Согласно определенным аспектам полинуклеотид представляет собой самоамплифицирующийся РНК-репликон. Согласно некоторым аспектам самоамплифицирующийся РНК-репликон происходит из альфавируса. Согласно определенным аспектам альфавирус содержит вирус венесуэльского лошадиного энцефалита, вирус леса Семлики, вирус Синдбис или их комбинации.

[0043] Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору, содержащему любой из выделенных полинуклеотидов, как описано в настоящем документе.

[0044] Настоящее изобретение также относится к липидной наночастице (LNP), содержащей (i) любой из выделенных полинуклеотидов, как описано в настоящем документе, и (ii) один или несколько типов липидов. Согласно определенным аспектам один или несколько типов липида содержит катионный липид. Согласно некоторым аспектам липид представляет собой ионизируемый липид. Согласно некоторым аспектам липид представляет собой липидоид, например, N1,N3,N5-трис(3-(дидодециламино)пропил)бензол-1,3,5-трикарбоксамид (ТТЗ). Согласно некоторым аспектам LNP содержит 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), холестерин, С14-РЕG2000 или любую их комбинацию.

[0045] Согласно некоторым аспектам LNP, как описано в настоящем документе, имеет диаметр около 30-500 нм. Согласно определенным аспектам LNP имеет диаметр около 50-400 нм. Согласно некоторым аспектам LNP имеет диаметр около 70-300 нм. Согласно некоторым аспектам LNP имеет диаметр около 100-200 нм. Согласно некоторым аспектам LNP имеет диаметр около 100-175 нм. Согласно некоторым аспектам LNP имеет диаметр около 100-160 нм.

[0046] Согласно некоторым аспектам липид и выделенный полинуклеотид (например, модифицированная РНК) имеют массовое соотношение от около 1:2 до около 2:1. Согласно некоторым аспектам липид и выделенный полинуклеотид (например, модифицированная РНК) имеют массовое соотношение 1:2, 1:1,5, 1:1,2, 1:1,1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1, 6,5:1, 7:1, 7,5:1, 8:1, 8,5:1, 9:1, 9,5:1, 10:1, 10,5:1, 11:1, 11,5:1, 12:1, 12,5:1, 13:1, 13,5:1, 14:1, 14,5:1 или 15:1. Согласно некоторым аспектам липид и выделенный полинуклеотид (например, модифицированная РНК) имеют массовое соотношение около 10:1.

[0047] Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любые из выделенных полинуклеотидов, векторов или LNP, как описано в настоящем документе, и

фармацевтически приемлемый носитель. Согласно определенным аспектам фармацевтическая композиция составлена для внутриопухолевого, интратекального, внутримышечного, внутрилимфатического, внутривенного, ингаляционного, внутрикожного, подкожного, внутриглазного, интраперитонеального, интраплеврального, интраспинального, внутрисосудистого, назального, чрезкожного, сублингвального, подслизистого, трансдермального или трансмукозального введения.

[0048] Настоящее изобретение относится к клетке, содержащей любые из выделенных полинуклеотидов, векторов или LNP, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам клетка представляет собой *in vitro* клетку, *ex vivo* клетку или *in vivo* клетку.

[0049] Настоящее изобретение относится к способу получения полинуклеотида, предусматривающему ферментативный или химический синтез любого из выделенных полинуклеотидов, как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение относится к способу получения белка IL-12, предусматривающему контакт клетки с любые из выделенных полинуклеотидов, клеток или LNP, как описано в настоящем документе. Согласно определенным аспектам контакт происходит *in vivo* или *ex vivo*.

[0050] Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему введение субъекту любых из выделенных полинуклеотидов, векторов, LNP или фармацевтических композиций, как описано в настоящем документе. Согласно определенным аспектам заболевание или нарушение представляет собой рак. Согласно некоторым аспектам раком является меланома, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, плоскоклеточная карцинома легкого, рак брюшной полости, печеночноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак ободочной кишки, колоректальный рак, эндометриальный рак или рак матки, карцинома слюнной железы, рак почек, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарцинома, рак желудка, рак головы и шеи или их комбинации.

[0051] Согласно некоторым аспектам способ лечения заболевания или нарушения, как раскрыто в настоящем документе, дополнительно предусматривает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту. Согласно определенным аспектам по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство содержит химиотерапевтическое лекарственное средство, нацеленную противораковую терапию, онколитическое лекарственное средство, цитотоксическое средство, иммунную терапию, цитокин, хирургическое вмешательство, лучевую терапию, активатор костимулирующей молекулы, ингибитор иммунных контрольных точек, вакцину, клеточную иммунотерапию или любую их комбинацию. Согласно некоторым аспектам ингибитор иммунных контрольных точек содержит анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-LAG-3 антитело, анти-CTLA-4 антитело, анти-GITR антитело, анти-TIM3 антитело или любую их комбинацию.

Краткое описание чертежей

[0052] На фиг. 1А и 1В приведено сравнение объема опухоли у мышей, несущих опухоли, которых обрабатывали однократным внутриопухолевым введением одного из следующего: (i) PBS (контроль, незакрашенный круг), (ii) репРНК, котранскрипционно кэпированная аналогом 5'-кэп (закрашенный круг на фиг. 1А, сплошная линия на фиг. 1В), и (iii) репРНК, посттранскрипционно кэпированная ферментативным добавлением 5'-кэпа (закрашенный квадрат на фиг. 1А, пунктирная линия на фиг. 1В). Объемы опухоли измеряли в различные моменты времени после введения (ось х). На фиг. 1А показан средний объем опухоли. На фиг. 1В показан объем опухоли у отдельных животных.

[0053] На фиг. 2 приведено сравнение экспрессии белка IL-12 в опухоли мышей, обработанных одним из следующего: (i) PBS (контроль, 1-я колонка слева), (ii) репРНК, полученная с использованием вектора A3G+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (2-я колонка), (iii) модифицированная мРНК (несамореплицирующаяся), полученная с использованием котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (3-я колонка), (iv) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (4-я колонка), и (v) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный и ферментативного посттрансляционного кэпирования (последняя колонка).

[0054] На фиг. 3 приведено сравнение анализа выживаемости Каплана-Мейера у мышей, несущих опухоли, которых обрабатывали однократным внутриопухолевым введением одного из следующего: (i) PBS (контроль, незакрашенный круг), (ii) репРНК, полученная с использованием вектора A3G+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (незакрашенный треугольник), (iii) модифицированная мРНК (несамореплицирующаяся), полученная с использованием котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (незакрашенный квадрат), (iv) репРНК, полученная использованием вектора Альтернативный Разработанный котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (закрашенный круг), и (у) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный и ферментативного посттрансляционного кэпирования (закрашенный квадрат).

[0055] На фиг. 4А приведено сравнение эффективности трансфекции *in vitro* различных конструкций РНК, как описано в настоящем документе, как измерено с применением анализа FACS. На фиг. 4В приведено сравнение концентрации белка IL-12, обнаруженной в супернатанте клеток, трансфицированных различными конструкциями РНК, как описано в настоящем документе. Как на фиг. 4А, так и на 4В исследованные конструкции РНК включали следующие: (i) репРНК, полученная с использованием вектора A3G+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (закрашенный круг), (ii) репРНК, полученная с использованием вектора А3G +E1 и ферментативного посттрансляционного кэпирования (закрашенный квадрат), (iii) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный +E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (закрашенный треугольник), (iv) репРНК, полученная с использованием

вектора Альтернативный Разработанный +E1 вектора и ферментативного посттрансляционного кэпирования (закрашенный обратный треугольник), (v) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный +E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (ромб), (vi) репРНК, полученная с использованием вектора Разработанный АЗG+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (незакрашенный круг), (vii) репРНК, полученная с использованием вектора АЗG -E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа (незакрашенный квадрат), и (viii) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный -E1 SGP scar конец (незакрашенный треугольник). Эффективность трансфекции показана как частота клеток IL-12+, наблюдаемых в разных группах. По оси х приведены часы после трансфекции, когда оценивали эффективность трансфекции.

[0056] На фиг. 5 приведено сравнение эффективности трансфекции *in vitro* следующих РНК-конструкций, как измерено с помощью анализа FACS: (i) репРНК, полученная с использованием котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа и A3G + E1 вектором с 3'-концевой терминацией scar фермента рестрикции (круг), (ii) репРНК, полученная с использованием аналога кэпа (альтернативный источник) и вектора A3G +E1 с 3'-концевой терминацией scar фермента рестрикции (квадрат), (iii) репРНК, полученная с использованием котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа и A3G + E1 вектора с 3'-концевой терминацией чистой последовательностью полиА (треугольник), (iv) репРНК, полученная с использованием аналога кэпа (альтернативный источник) и вектора A3G +E1 с 3'-концевой терминацией чистой последовательностью полиА (обратный треугольник). Клетки, обработанные PBS, использовали в качестве контроля (ромб). Эффективность трансфекции показана как частота клеток IL-12+, наблюдаемых в разных группах. По оси х приведены часы после трансфекции, когда оценивали эффективность трансфекции.

[0057] На фиг. 6A и 6B приведено сравнение концентрации белка IL-12, наблюдаемой в опухоли и сыворотке мышей, несущих опухоль, обработанных однократным внутриопухолевым введением конструкции РНК, кодирующей один из следующих мышиных белков IL-12: (i) mIL-12 отдельно («IL-12»), (ii) mIL-12, конъюгированный с альбумином («IL-12-alb»), и (iii) mIL-12, конъюгированный с альбумином и люмиканом («IL-12-alb-lum»). Различные конструкции РНК вводили животным в одной из двух доз, показанных по оси х. На фиг. 6A показана концентрация белка IL-12 в опухоли (верхний график) и сыворотке (нижний график) через 24 часа после введения. На фиг. 6B показана концентрация белка IL-12 в опухоли (верхний график) и сыворотке (нижний график) через 96 часа после введения.

[0058] На фиг. 7A, 7B и 7C приведено сравнение концентрации белка IL-12, наблюдаемой в селезенке, дренирующих лимфатических узлах и недренирующих лимфатических узлах, соответственно, у мышей, несущих опухоль, через 24 часа после однократного внутриопухолевого введения конструкции РНК, кодирующей один из следующих мышиных белков IL-12: (i) mIL-12 отдельно («IL-12»), (ii) mIL-12, конъюгированный с альбумином («IL-12-alb»), и (iii) mIL-12,

конъюгированный с альбумином и люмиканом («IL-12-alb-lum»). Различные конструкции РНК вводили животным в одной из двух доз, показанных по оси х.

[0059] На фиг. 8A, 8B и 8C приведено сравнение концентрации белка IL-12, наблюдаемой в селезенке, дренирующих лимфатических узлах и недренирующих лимфатических узлах, соответственно, мышей, несущих опухоль, через 96 часов после однократного внутриопухолевого введения конструкции PHK, кодирующей один из следующих мышиных белков IL-12: (i) mIL-12 отдельно («IL-12»), (ii) mIL-12, конъюгированный с альбумином («IL-12-alb»), и (iii) mIL-12, конъюгированный с альбумином («IL-12-alb»). Различные конструкции PHK вводили животным в одной из двух доз, показанных по оси х.

[0060] На фиг. 9А и 9В приведено сравнение концентраций белка IL-12 и белка IFN-у, соответственно, измеренных в сыворотке мышей, несущих опухоль, обработанных однократным внутриопухолевым введением конструкции РНК, кодирующей один из следующих мышиных белков IL-12: (i) mIL-12 отдельно (треугольник), (ii) mIL-12, конъюгированный с альбумином (квадрат), и (iii) mIL-12, конъюгированный с альбумином и люмиканом (круг). Конструкции РНК вводили животным при следующих дозах: 0,25 мкг (закрашенные символы) или 2,5 мкг (незакрашенные символы). По оси х приведены моменты времени (после введения), в которые измеряли концентрации IL-12 и IFN-у.

[0061] На фиг. 10 представлено графическое представление данных, относящихся к оптимальности (средняя оценка кодонов «avg_codon_score») по сравнению с минимальной свободной энергией укладки в ккал/моль (MFE) для 1137 различных последовательностей, кодирующих слитый белок лидера легкой цепи человека – hIL12p40 – GGS(GGGS)3 линкер – hIL12p35 – GSGGGS линкер – человеческий сывороточный альбумин в соответствии с Примером 5. Кодон-оптимизированные конструкции L1, L2, L3, M1, M2, M3, H1, H2 и H3 показаны. Как описано в примере 5, символ ромба представляет последовательность с очень высокой кодоноптимальностью и MFE. Треугольник представляет оптимальную последовательность кодонов, содержащую наиболее часто используемый триплет в каждом положении аминокислоты.

[0062] На фиг. 11 приведено сравнение секреции белок IL-12, наблюдаемой в супернатанте клеток, трансфицированных различными конструкциями РНК, содержащими кодоноптимизированную последовательность IL-12 (ось х). Как указано, IL-12 конструкций A1-A4 не был конъюгирован ни с какими другими фрагментами. IL-12 конструкций B1-B4 конъюгирован с альбумином. IL-12 конструкций C1-C3 конъюгирован с альбумином и люмиканом. Отдельные тройные измерения приведены в виде точек, представленных как треугольник, квадрат, восьмиугольник или круг, а горизонтальные полосы показывают среднее значение трехкратных измерений. По оси X приведен используемый вариант, а по оси Y приведены концентрации IL-12 в нг/мл.

[0063] На фиг. 12A, 12B и 12C приведено сравнение концентраций белка IL-12, наблюдаемых в опухоли (фиг. 12A), сыворотке (фиг. 12B) и селезенке (фиг. 12C) мышей, несущих опухоль, которые получали однократное внутриопухолевое введение конструкции РНК,

содержащей (i) кодон-оптимизированную последовательность IL-12, конъюгированную с альбумином и люмиканом (1-й набор кругов слева в каждом PDX1, PDX2 и PDX3), (ii) кодоноптимизированную последовательность IL-12, конъюгированную к альбумину (2-й набор кругов в каждом PDX1, PDX2 и PDX3), или (iii) только кодон-оптимизированную последовательность IL-12 (3-й набор кругов в каждом PDX1, PDX2 и PDX3). Не получавших лечение животных использовали в качестве контроля (последний набор кругов в каждом PDX1, PDX2 и PDX3). «PDX1», «PDX2» и «PDX3» представляют собой ксенотрансплантаты, полученные в результате резекции опухоли у трех отдельных пациентов с тройным негативным раком молочной железы (TNBC). PDX1 и PDX3 были установлены из первично резецированных ER,PR,HER2-отрицательных поражений, а PDX2 был установлен из метастатического ER,PR,HER2-отрицательного поражения в легких пациента с TNBC.

[0064] На фиг. 13 приведено сравнение объема опухоли у мышей TNBC, которых обрабатывали (еженедельно, всего четыре дозы) контрольным носителем (незакрашенный квадрат) или репРНК, кодирующей IL-12 (репРНК). репРНК вводили животным в одной из следующих доз: (i) 5 мкг (закрашенный круг), (ii) 0,5 мкг (закрашенный квадрат) или (iii) 0,05 мкг (закрашенный треугольник).

[0065] На фиг. 14 приведено сравнение объема опухоли у мышей TNBC, которых обрабатывали репРНК, кодирующей rIL-12, модифицированной для включения различных количеств модифицированных нуклеозидтрифосфатов (modNTP): (i) 0% modNTP (m.e., немодифицированная репРНК) (закрашенный круг), (ii) 25% modNTP (закрашенный квадрат), (iii) 37,5% modNTP (закрашенный треугольник) или (iv) 50% modNTP (закрашенный обратный треугольник). Животных, которым вводили контрольный носитель, использовали в качестве контроля (незакрашенный квадрат).

[0066] На фиг. 15А и 15В показаны эффекты конструкций репРНК, как описано в настоящем документе, как на обработанные, так и на необработанные опухоли, соответственно, на мышиной сингенной модели рака В16-F10. Как далее описано в Примере 8, в левый и правый бок животных подкожно вводили опухолевые клетки В16-F10. Как только был достигнут оптимальный размер опухоли, в левый бок внутриопухолево вводили контрольный носитель или репРНК (2,5 мкг) (т.е., обработанная опухоль). Затем оценивали объем опухоли как в левом, так и в правом боку (т.е., необработанная опухоль).

[0067] На фиг. 16 приведено сравнение экспрессии люциферазы (показанной как сигнал биолюминесценции) на мышиной модели TNBC после повторного введения дозы. Как далее описано в Примере 9, мышам вводили первую дозу одной из двух конструкций репРНК, кодирующих люциферазу светлячка (мРНК1 и мРНК2) (5 мкг) («Доза 1»), а затем, через 1 неделю, вводили вторую дозу той же конструкции репРНК (5 мкг) («Доза 2»). Некоторым животным дополнительно еженедельно (две суммарные дозы) вводили анти-IFNAR1 антитело (10 мг/кг).

[0068] На фиг. 17 представлено сравнение концентрации IFN-у в супернатанте, собранном из активированных PBMC человека, обработанных рекомбинантным белком IL-12 человека

(rhIL12), или в кондиционированной среде, как описано в Примере 10 (т.е., супернатант, собранный из клеток BT20, трансфицированных репРНК, кодирующей IL-12,). PBMC обрабатывали rhIL12 в одной из следующих концентраций: 100 нг/мл («3»), 10 нг/мл («4»), 1 нг/мл («5»), 0,1 нг/мл («6») или 0,01 нг/мл («7»). Кондиционированные среды содержали одно из следующих количеств IL-12: 1 нг/мл («1») и 10 нг/мл («2»). Необработанные клетки использовали в качестве контроля («8»).

Подробное описание настоящего изобретения

Определения

[0069] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. В случае конфликта настоящее раскрытие, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Если иное не требуется контекстом, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число.

[0070] В настоящем раскрытии форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким этим объектам, например, «полинуклеотид» означает один или несколько полинуклеотидов. Таким образом, форма единственного числа, фраза «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0071] Кроме того, «и/или», как раскрыто в настоящем документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждой из двух указанных функций или компонентов с другими или без них. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе в настоящем документе, как «А и/или В», подразумевает включение «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогичным образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В, и/или С», охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С. А, В или С, А или С, А или В, В или С, А и С, А и В, В и С, А (отдельно), В (отдельно) и С (отдельно).

[0072] В контексте настоящего изобретения термин «приблизительно» применяют как означающих приблизительно, примерно, около или в диапазоне. Когда термин «приблизительно» применяют в сочетании с числовым диапазоном, он модифицирует этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных числовых значений. Как правило, термин «приблизительно» применяют в настоящем документе для изменения числового значения выше и ниже указанного значения с отклонением на 10 процентов вверх или вниз (выше или ниже), если не указано иное.

[0073] Термин «по меньшей мере» перед числом или рядом чисел, как понимается, включает число, расположенное рядом с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые значения, которые логически могут быть включены, как ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 18 нуклеотидов 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что указанным свойством обладают 18, 19, 20 или 21 нуклеотид. Когда по меньшей мере стоит перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «по меньше мере» может модифицировать

каждое из чисел в ряду или диапазоне. «По меньшей мере» также не ограничивается целыми числами (например, «по меньшей мере 5%» включает 5,0%, 5,1%, 5,18% без учета количества значащих.

[0074] В контексте настоящего изобретения «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» означает последовательность нуклеотидов, соединенных сложными фосфодиэфирными связями. Полинуклеотиды представлены в настоящем документе в направлении от 5' к 3'. Полинуклеотид согласно настоящему изобретению может представлять собой молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или молекулу рибонуклеиновой кислоты (РНК). Нуклеотидные основания обозначены в настоящем документе однобуквенным кодом: аденин (A), гуанин (G), тимин (T), цитозин (C), инозин (I) и урацил (U).

[0075] В контексте настоящего изобретения термин «полипептид» охватывает как пептиды, так и белки, если не указано иное.

[0076] В контексте настоящего изобретения термин «кодирующая последовательность» или «кодирующая» означает область (транскрибируемую область) ДНК или РНК, которая «кодирует» конкретный белок, например, такой как IL-12. Кодирующая последовательность транскрибируется (ДНК) и транслируется (РНК) в полипептид *in vitro* или *in vivo*, когда она расположена под контролем соответствующей регуляторной области, такой как промотор. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5' (амино) конце и стопкодоном трансляции на 3' (карбокси) конце. Кодирующая последовательность может включать без ограничения кДНК прокариот или эукариот, геномную ДНК прокариот или эукариот и синтетические последовательности ДНК. Последовательность терминации транскрипции может быть расположена 3' относительно кодирующей последовательности

[0077] Консенсусная последовательность Козака Козака, консенсус или последовательность Козака известны последовательность, как которая эукариотической мРНК и имеет консенсус (gcc)gccRccAUGG (SEQ ID NO: 174), где R представляет собой пурин (аденин или гуанин) на три основания против хода транскрипции от стартового кодона (AUG), за которым следует другой «G» Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере около 95% или более, например, по меньшей мере 99% идентичную консенсусной последовательности Козака. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит консенсусную последовательность Козака.

[0078] В контексте настоящего изобретения термин «РНК» означает молекулу, которая содержит по меньшей мере один рибонуклеотидный остаток. «Рибонуклеотид» относится к нуклеотиду с гидроксильной группой в 2'-положении β-D-рибофуранозильной группы. Термин включает двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК, выделенную РНК, такую как частично или полностью очищенная РНК, по существу чистую РНК, синтетическую РНК, рекомбинантно полученную РНК, такую как модифицированная РНК, которая отличается от встречающейся в природе РНК добавлением, делецией, заменой и/или изменением одного или нескольких нуклеотидов. Термин «мРНК» означает «информационную РНК» и относится к «транскрипту»,

который создается с использованием ДНК-матрицы и кодирует пептид или белок. Обычно мРНК содержит 5'-UTR, область, кодирующую белок, и 3'-UTR. мРНК обладает только ограниченным временем полужизни в клетках и in vitro. В контексте настоящего изобретения мРНК может быть создана путем транскрипции in vitro с ДНК-матрицы. Методология транскрипции in vitro известна специалисту в данной области техники. Например, множество наборов для транскрипции in vitro коммерчески доступны. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения РНК, предпочтительно мРНК, модифицирована структурой 5'-кэп.

[0079] В контексте настоящего изобретения термин означает взаимосвязь между двумя или более аминокислотными (полипептидными или белковыми) последовательностями или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидными), как определено путем Согласно сравнения последовательностей. определенным аспектам идентичность последовательности вычисляют на основе полной длины двух данных SEQ ID NO или их части. **Часть может означать по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%** обеих SEQ ID NO или любой другой указанный процент. Термин «идентичность» может также означать степень родства последовательностей между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот, случае определения совпадения между цепочками последовательностей.

[0080] Согласно определенным аспектам способы определения идентичности предназначены для получения наибольшего совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства кодифицированы в общедоступных компьютерных программах.

[0081] «Существенная гомология» или «существенное сходство» в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента указывают, что при оптимальном выравнивании соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или комплементарной ей цепью) имеется идентичность нуклеотидной последовательности на по меньшей мере около от 95 до 99% последовательности.

[0082] В контексте настоящего изобретения термины «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» и «достаточное количество», например, композиции, содержащей полинуклеотид, раскрытый в настоящем документе, относятся к количеству, достаточному для того, чтобы при введении субъекту, включая человека, приводить к полезным или желаемым результатам, включая клинические результаты, и, таким образом, «эффективное количество» или его синоним зависит от контекста, в котором оно применяется.

[0083] Количество данного терапевтического средства или композиции будет соответствовать такому количеству, которое будет варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как данное средство, фармацевтический состав, путь введения, тип заболевания или нарушения, признаки субъекта (например, возраст, пол и/или вес) или хозяина, подлежащего лечению, и т.п.

[0084] Термин «время полужизни» относится к периоду времени, необходимому для элиминации половины активности, количества или числа молекул. В контексте настоящего изобретения время полужизни РНК указывает на стабильность указанной РНК. «Развитие» или «прогрессирование» заболевания означает начальные проявления и/или последующее прогрессирование заболевания. Развитие заболевания можно обнаружить и оценить с использованием стандартных клинических способов, хорошо известных в данной области техники. Однако развитие также относится к прогрессу, который может быть непредсказуемым. В контексте настоящего изобретения термин «развитие» или «прогрессирование» относится к биологическому течению симптомов. Развитие включает возникновение, повторение и начало. В контексте настоящего изобретения начало или появление целевого заболевания или нарушение включает начальное наступление и/или рецидив.

Нуклеотиды, экспрессирующие IL-12

[0085] Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду (например, выделенному полинуклеотиду), содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-12. Как описано в настоящем документе, полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, содержат один или несколько признаков, таких, что они отличаются (например, структурно и/или функционально) от эталонного полинуклеотида, встречающегося в природе. Например, как далее описано в другом месте настоящего описания, молекулы нуклеиновой кислоты, например, кодирующие белок IL-12 (например, субъединицу IL-12α и/или субъединицу IL-12β), были кодоноптимизированы (т.е., являются синтетическими).

[0086] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит транслируемую область и одну, две или более чем две модификации. Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, демонстрирует пониженное разрушение в клетке, в которую вводят нуклеиновую кислоту, по сравнению с соответствующей немодифицированной нуклеиновой кислотой.

[0087] Согласно некоторым аспектам модификация может располагаться на сахарной части нуклеотида. Согласно некоторым аспектам модификация может располагаться на фосфатном остове нуклеотида.

[0088] Согласно некоторым аспектам желательно внутриклеточное разрушение модифицированной нуклеиновой кислоты, вводимой в клетку, например, если требуется точное время продукции белка. Таким образом, согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит домен деградации, на который можно воздействовать направленным образом внутри клетки.

[0089] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит по меньшей мере один из модифицированного 5'-кэпа, фрагмента, увеличивающего время полужизни, или регуляторного элемента. [0090] Согласно некоторым аспектам модифицированный 5'-кэп увеличивает стабильность РНК, повышает эффективность трансляции РНК, продлевает трансляцию РНК, увеличивает экспрессию всего белка РНК по сравнению с той же РНК без 5'-кэпа.

[0091] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, подвергается циклизации или конкатемеризации для создания способной к трансляции молекулы, чтобы способствовать взаимодействиям между белками, связывающими поли-А, и белками, связывающими 5'-конец. Механизм циклизации или конкатемеризации может происходить по меньшей мере тремя различными путями: 1) химическим, 2) ферментативным и 3) катализируемым рибозимами. Вновь образованная 5'-/3'-связь может быть внутримолекулярной или межмолекулярной.

[0092] В первом пути 5'-конец и 3'-конец нуклеиновой кислоты содержат химически реакционноспособные группы, которые при сближении образуют новую ковалентную связь между 5'-концом и 3'-концом молекулы. 5'-конец может содержать реакционноспособную группу NHS-сложный эфир, а 3'-конец может содержать 3'-аминоконцевой нуклеотид, так что в органическом растворителе 3'-аминоконцевой нуклеотид на 3'-конце синтетической молекулы мРНК будет подвергаться нуклеофильной атаке на фрагмент 5'- NHS-сложный эфир с образованием новой 5'-/3'-амидной связи.

[0093] Во втором пути РНК-лигаза Т4 может быть использована для ферментативного связывания молекулы 5'-фосфорилированной нуклеиновой кислоты с 3'-гидроксильной группой нуклеиновой кислоты с образованием новой сложной фосфородиэфирной связи. В примере реакции 1 мкг молекулы нуклеиновой кислоты инкубируют при 37°C в течение 1 часа с 1-10 единицами РНК-лигазы Т4 (New England Biolabs, Ipswich, MA) в соответствии с протоколом производителя. Реакция лигирования может происходить в присутствии расщепленного олигонуклеотида, способного образовывать пары оснований как с 5'-, так и с 3'-областями в соседнем положении, чтобы способствовать ферментативной реакции лигирования.

[0094] В третьем пути либо 5'-, либо 3'-конец кДНК-матрицы кодирует последовательность рибозим-лигазы, так что во время транскрипции in vitro полученная молекула нуклеиновой кислоты может содержать активную последовательность рибозима, способную лигировать 5'-конец молекулы нуклеиновой кислоты к 3'-концу молекулы нуклеиновой кислоты. Рибозим-лигаза может происходить из интрона группы I, интрона группы I, дельта-вируса гепатита, рибозима, содержащего шпильку, или может быть выбрана с помощью SELEX (систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения). Реакция рибозим-лигазы может протекать в течение от 1 до 24 часов при температуре от 0 до 37°С.

[0095] Согласно некоторым аспектам несколько различных нуклеиновых кислот, нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, или первичные конструкции могут быть связаны вместе через 3'-конец с использованием нуклеотидов, которые модифицированы на 3'-конце. Химическую конъюгацию можно применять для контроля стехиометрии доставки в клетки. Например, ферменты глиоксилатного цикла, изоцитратлиаза и малатсинтаза могут быть доставлены

в клетки HepG2 в соотношении 1:1 для изменения клеточного метаболизма жирных кислот. Это соотношение можно контролировать путем химического связывания нуклеиновых кислот или модифицированной РНК с использованием 3'-азидо-концевого нуклеотида на одних нуклеиновых кислотах или модифицированной РНК, и С5-этинил- или алкинил-содержащего нуклеотида на противоположных нуклеиновых кислотах или нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12. Нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12, добавляют посттранскрипционно с использованием терминальной трансферазы (New England Biolabs, Ipswich, MA) в соответствии с протоколом производителя. После добавления 3'-модифицированного нуклеотида две нуклеиновые кислоты или нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, могут быть объединены в водном растворе в присутствии или в отсутствие меди с образованием новой ковалентной связи с помощью механизма клик-химии, как описаны в литературе.

[0096] Согласно некоторым аспектам более двух полинуклеотидов могут быть связаны вместе помощью функционализированной линкерной молекулы. Например, функционализированная молекула сахарида может быть химически модифицирована, чтобы она содержала несколько химически реакционноспособных групп (SH—, NH2—, N3, u $m.\partial$.) для реакции с родственным фрагментом на молекуле 3'- функционализированной мРНК (т.е., 3'-3′—NHS-сложный мелаимидный сложный эфир, эфир, алкинил). Количество реакционноспособных групп на модифицированном сахариде контролировать онжом стехиометрически, чтобы непосредственно контролировать стехиометрическое соотношение конъюгированной нуклеиновой кислоты или мРНК.

[0097] Согласно некоторым аспектам для дальнейшего повышения продукции белка нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, полинуклеотиды или первичные конструкции согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы для конъюгации с другими полинуклеотидами, красителями, интеркалирующими агентами (например, акридинами), сшивающими линкерами (например, псорален, митомицин С), порфиринами (ТРРС4, тексафирин, полициклическими ароматическими углеводородами сапфирин), (например, феназин, дигидрофеназин), искусственными эндонуклеазами (например, EDTA), алкилирующими агентами, фосфатом, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, полиамино, алкилом, замещенным алкилом, радиоактивно меченными маркерами, ферментами, гептенами (например, биотин), средствами облегчения транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетическими рибонуклеазами, белками, например, гликопротеинами или пептидами, например, молекулами, имеющими специфическую аффинность с колигандом или антителами, например, антителом, которое связывается с определенным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка, гормонами и рецепторами гормонов, непептидными соединениями, такими как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы или лекарственные средства.

[0098] Конъюгация может привести к увеличению стабильности и/или времени полужизни и может быть особенно полезной для нацеливания нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, или первичных конструкций на конкретные сайты в клетке, ткани или организме.

[0099] Согласно некоторым аспектам первичная конструкция сконструирована для кодирования одного или нескольких представляющих интерес полипептидов или их фрагментов. Представляющий интерес полипептид может включать без ограничения целые полипептиды, множество полипептидов или фрагменты полипептидов, которые независимо могут кодироваться одной или несколькими нуклеиновыми кислотами, множеством нуклеиновых кислот, фрагментами нуклеиновых кислот или вариантами любой из указанных. В контексте настоящего изобретения термин «представляющие интерес полипептиды» относится к любому полипептиду, выбранному для кодирования в первичной конструкции согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего изобретения термин «полипептид» означает полимер аминокислотных остатков (природных или неприродных), соединенных друг с другом чаще всего пептидными связями. Согласно настоящему изобретению термин относится к белкам, полипептидам и пептидам любого размера, структуры или функции. В некоторых случаях кодируемый полипептид составляет менее около 50 аминокислот, и тогда полипептид называют пептидом. Если полипептид представляет собой пептид, он будет иметь длину по меньшей мере около 2, 3, 4 или менее около 5 аминокислотных остатков. Таким образом, полипептиды включают генные продукты, встречающиеся в природе полипептиды, синтетические полипептиды, гомологи, ортологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги указанного. Полипептид может представлять собой одну молекулу или может представлять собой многомолекулярный комплекс, такой как димер, тример или тетрамер. Они также могут содержать одноцепочечные или многоцепочечные полипептиды, такие как антитела или инсулин, и могут быть ассоциированы или связаны. Чаще всего дисульфидные связи встречаются в многоцепочечных полипептидах. Термин полипептид может также применяться к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

[0100] Термин «вариант полипептида» относится к молекулам, которые по своей аминокислотной последовательности отличаются от нативной или эталонной последовательности. Варианты аминокислотной последовательности могут иметь замены, делеции и/или вставки в определенных положениях аминокислотной последовательности по сравнению с нативной или эталонной последовательностью. Обычно варианты будут обладать по меньшей мере около 50% идентичностью (гомологией) с нативной или эталонной последовательностью, и предпочтительно они должны быть на по меньшей мере около 80%, более предпочтительно по меньшей мере около 90% идентичны (гомологичны) нативной последовательности или эталонной последовательности.

[0101] Как таковые, полинуклеотиды, кодирующие представляющие интерес полипептиды, содержащие замены, вставки и/или добавления, делеции и ковалентные модификации по отношению к эталонным последовательностям, включены в объем настоящего изобретения.

Например, метки или аминокислоты последовательности, такие как один или несколько лизинов, могут быть добавлены к пептидным последовательностям согласно настоящему изобретению (например, на N-конце или С-конце). Метки последовательности можно использовать для очистки или локализации пептидов. Лизины можно использовать для повышения растворимости пептидов или для биотинилирования. Альтернативно, аминокислотные остатки, расположенные в карбоксии амино-концевых областях аминокислотной последовательности пептида или белка, могут быть необязательно подвергнуты делеции, обеспечивая усеченные последовательности. Некоторые аминокислоты (например, С-концевые или N-концевые остатки) могут быть альтернативно удалены в зависимости от использования последовательности, например, экспрессии последовательности как части более крупной последовательности, которая растворима или связана с твердой подложкой.

[0102] Как известно специалистам в данной области техники, белковые фрагменты, функциональные белковые домены и гомологичные белки также рассматривают входящими в объем представляющих интерес полипептидов согласно настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение относится к любому белковому фрагменту (означает полипептидную последовательность на по меньшей мере один аминокислотный остаток короче последовательности эталонного полипептида, но в остальном идентичную) эталонного белка 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 аминокислот в длину. В другом примере любой белок, который включает около 20, около 30, около 40, около 50 или около 100 аминокислот, которые на около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95% или около 100% идентичны любой из последовательностей, как описано в настоящем документе, может применяемый согласно настоящему изобретению. Согласно определенным аспектам полипептид, применяемый согласно настоящему изобретению, включают 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций, как показано в любой из последовательностей, представленных или упомянутых в настоящем документе.

[0103] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит модифицированный 5'-кэп, фрагмент, увеличивающий время полужизни, регуляторный элемент или их комбинации.

[0104] Согласно некоторым аспектам модифицированный 5'-кэп выбран из группы, состоящей из m_2 ^{7,2'-O}GppspGRNA, m^7 GpppG, m^7 Gppppm 7 G, m_2 ^(7,3'-O)GpppG, m_2 ^(7,2'-O)GppspG(D1), m_2 ^(7,2'-O)GppspG(D2), m_2 ^{7,3'-O}Gppp(m_1 2'-O)ApG, (m^7 G-3' mppp-G, который может быть эквивалентным образом сконструирован как 3' O-Me- m^7 G(5')ppp(5')G), N^7 ,2'-O-диметил-гуанозин-5'-трифосфат-5'-гуанозина, m^7 Gm-ppp-G, N^7 -(4-хлорфеноксиэтил)-G(5')ppp(5')G, N^7 -(4-хлорфеноксиэтил)- $m^{3'-O}$ OG(5')ppp(5')G, m^2 G(5')ppp(5')N,pN2p, m^2 G(5')ppp(5')NlmpNp, m^2 G(5')-ppp(5')NlmpN2 mp, m^2 G(5')-ppp(5')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up, инозина, m^2 Geaза-гуанозина, m^2 Geaза-гуанозина, m^2 Geaза-гуанозина, m^2 Geasa-гуанозина, m^2 Geasa-гуа

[0105] Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, который содержит как 5'-кэп, так и нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12 согласно настоящему

изобретению (*например*, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид IL12B, полипептид IL12A и/или слитые полипептиды IL12B и IL12A).

[0106] Структура 5'-кэпа природной мРНК участвует в ядерном экспорте, повышая стабильность мРНК, и связывает кэп-связывающий белок мРНК (СВР), который отвечает за стабильность мРНК в клетке и способность к трансляции посредством ассоциации СВР с поли(А) связывающим белком с образованием зрелых циклических мРНК. Кроме того, кэп способствует удалению 5'-проксимальных интронов в ходе сплайсинга мРНК.

[0107] Молекулы эндогенной мРНК могут быть кэпированы на 5'-конце, образуя 5'-ррр-5'-трифосфатную связь между концевым остатком кэпа гуанозина и 5'-концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом молекулы мРНК. Затем этот 5'-гуанилатный кэп может быть метилирован с образованием остатка N7-метилгуанилата. Сахара рибозы концевых и/или предтерминальных транскрибируемых нуклеотидов 5'-конца мРНК необязательно также могут быть 2'-0-метилированы. Удаление 5'-кэпа посредством гидролиза и расщепления структуры гуанилатного кэпа может нацеливать молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, для разрушения.

[0108] Согласно настоящему изобретению 5'-концевые кэпы могут включать эндогенные кэпы или аналоги кэпы. Согласно настоящему изобретению 5'-концевой кэп может содержать аналог гуанина. Полезные аналоги гуанина включают без ограничения инозин, N1- метил-гуанозин, 2'фтор-гуанозин, 7-деаза-гуанозин, 8-оксо-гуанозин, 2-амино- гуанозин, LNA-гуанозин и 2-азидогуанозин.

[0109] Согласно некоторым аспектам структура 5'-концевого кэпа представляет собой СарО, Сарl, ARC A, инозин, Nl-метил-гуанозин, 2'фтор-гуанозин, 7-деаза-гуанозин, 8-оксогуанозин, 2-амино-гуанозин, LNA-гуанозин, 2-азидогуанозин, Сар2, Сар4, 5' метил кэп или их аналог.

[0110] Неограничивающие дополнительные кэпы включают 5'-кэпы, как раскрыто в WO/2017/201350, опубликованной 23 ноября 2017 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

[0111] Согласно некоторым аспектам фрагмент, увеличивающий время полужизни, содержит Fc, альбумин и его фрагмент, альбумин-связывающий фрагмент, последовательность PAS, последовательность HAP, трансферрин или его фрагмент, XTEN или любую их комбинацию.

[0112] Согласно некоторым аспектам фрагмент, увеличивающий время полужизни, содержит Fc. Согласно некоторым аспектам фрагмент, увеличивающий время полужизни, содержит альбумин или его фрагмент.

[0113] Согласно некоторым аспектам регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из по меньшей мере одного элемента энхансера трансляции (TEE), последовательности инициации трансляции, по меньшей мере одного сайта связывания микроРНК или его исходной последовательности, области 3' хвоста связанных нуклеозидов, AU-богатого элемента (ARE), посттранскрипционного контрольного модулятора и их комбинаций.

[0114] Согласно некоторым аспектам регуляторный элемент дополнительно содержит область полиА. Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12 согласно настоящему изобретению (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид IL12B, полипептид IL12A и/или слитые полипептиды IL12B и IL12A), дополнительно содержит поли-А хвост. Согласно некоторым аспектам концевые группы поли-А хвоста могут быть включены для стабилизации. Согласно другим аспектам поли-А хвост содержит дез-3' гидроксильные хвосты. В других аспектах поли-А хвост содержит дез-3'-гидроксильные хвосты. В ходе процессинга РНК длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли-А-хвост) может быть добавлена к полинуклеотиду, такому как молекула мРНК, для повышения стабильности.

[0115] Сразу после транскрипции 3'-конец транскрипта может быть расщеплен с освобождением 3'-гидроксила. Затем поли-А-полимераза добавляет к РНК цепочку адениновых нуклеотидов. Процесс, называемый полиаденилированием, добавляет поли-А-хвост, который может иметь длину, например, от около 80 до около 250, включая около 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 остатков.

[0116] ПолиА хвосты также могут быть добавлены после экспорта конструкции из ядра.

[0117] Согласно настоящему изобретению концевые группы на поли-А хвосте могут быть включены для стабилизации. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут включать дез-3' гидроксильные хвосты. Они также могут включать структурные фрагменты или модификации 2'-Ометил, как раскрыто в Junjie Li, et al. (Current Biology, Vol. 15, 1501-1507, August 23, 2005, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). См. также WO/2017/201350, опубликованную 23 ноября 2017 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки, в отношении дополнительных поли-А хвостов.

[0118] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит любую модификацию или комбинацию модификаций, как описано в настоящем документе.

Модификации концевой структуры: нетранслируемые области (UTR)

[0119] Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5'UTR начинается с сайта начала транскрипции и продолжается до стартового кодона, но не включает стартовый кодон, тогда как 3'UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Появляется все больше доказательств регулирующей роли UTR в отношении стабильности молекул нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные признаки UTR могут быть включены в PHK (например, модифицированную PHK) согласно настоящему изобретению для повышения стабильности молекулы. Специфические функции также могут быть включены для обеспечения контролируемой понижающей регуляции транскриптов в случае, если они неправильно направлены в нежелательные участки органов.

5' UTR и инициация трансляции

[0120] Природные 5'UTR обладают признаками, которые играют роль в инициации трансляции. Они содержат сигнатуры, такие как последовательности Козака, которые, как известно, участвуют в процессе, посредством которого рибосома инициирует трансляцию многих генов. Последовательности Козака имеют консенсус CCR(A/G)CCAUGG, где R представляет собой пурин (аденин или гуанин) на три основания против хода транскрипции от стартового кодона (AUG), за которыми следует другой «G». Также известно, что 5'UTR образует вторичные структуры, которые участвуют в связывании фактора элонгации.

[0121] Вторичные структуры 5'UTR, участвующие в связывании фактора элонгации, могут взаимодействовать с другими РНК-связывающими молекулами в 5'UTR или 3'UTR для регуляции экспрессии генов. Например, фактор элонгации EIF4A2, связывающийся со вторично структурированным элементом в 5'UTR, необходим для репрессии, опосредованной микроРНК (Meijer H A et al., Science, 2013, 340, 82-85, включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Различные вторичные структуры в 5'UTR могут быть включены во фланкирующую область либо для стабилизации, либо для селективной дестализации мРНК в определенных тканях или клетках.

[0122] Путем создания признаков, обычно обнаруживаемых в обильно экспрессируемых генах конкретных органов-мишеней, можно повысить стабильность и продукцию белка нуклеиновыми кислотами или мРНК согласно настоящему изобретению. Например, введение 5'- UTR экспрессируемой в печени мРНК, такой как альбумин, сывороточный амилоид A, аполипопротеин A/B/E, трансферрин, альфа-фетопротеин, эритропоэтин или фактор VIII, можно использовать для усиления экспрессии молекул нуклеиновой кислоты, таких как в виде ммРНК в клеточных линиях печени или печени. Подобным образом, возможно использование 5'-UTR из другой тканеспецифичной мРНК для улучшения экспрессии в этой ткани - для мышц (МуоD, миозин, миоглобин, миогенин, геркулин), для эндотелиальных клеток (Tie-1, CD36), для миелоидных клеток (С/ЕВР, AML1, G-CSF, GM-CSF, CD11b, MSR, Fr-1, i-NOS), для лейкоцитов (CD45, CD18), для жировой ткани (CD36, GLUT4, ACRP30, адипонектин) и для эпителиальные клетки легких (SP-A/B/C/D).

[0123] Другие последовательности, не относящиеся к UTR, могут быть включены в 5'- (или 3'-UTR) UTR. Например, интроны или части последовательностей интронов могут быть включены во фланкирующие области нуклеиновых кислот или мРНК согласно настоящему изобретению. Включение интронных последовательностей может увеличить продукцию белка, а также уровни мРНК.

[0124] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения по меньшей мере один фрагмент последовательностей IRES из гена GTX может быть включен в 5'UTR. В качестве неограничивающего примера фрагмент может представлять собой последовательность из 18 нуклеотидов из IRES гена GTX. В качестве еще одного неограничивающего примера фрагмент последовательности из 18 нуклеотидов из последовательности IRES гена GTX может быть тандемно

повторен в 5'UTR полинуклеотида, как описано в настоящем документе. Последовательность из 18 нуклеотидов может повторяться в 5'UTR по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз или более десяти раз.

[0125] Нуклеотиды могут быть мутированы, заменены и/или удалены из 5' (или 3') UTR. Например, один или несколько нуклеотидов против хода транскрипции от стартового кодона могут быть заменены другим нуклеотидом. Нуклеотид или нуклеотиды, подлежащие замене, могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21., 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более 60 нуклеотидов против хода транскрипции от стартового кодона. В качестве другого примера, один или несколько нуклеотидов против хода транскрипции от стартового кодона могут быть удалены из UTR.

5'UTR, 3'UTR и элементы энхансеры трансляции (TEE)

[0126] Согласно некоторым аспектам 5'UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, содержит по меньшей мере один полинуклеотид энхансер трансляции, элемент энхансер трансляции, элементы энхансера трансляции (вместе называемые «ТЕЕ»). Согласно некоторым аспектам ТЕЕ располагается между промотором транскрипции и стартовым кодоном. Согласно некоторым аспектам РНК (например, модифицированная РНК) с по меньшей мере одним ТЕЕ в 5'UTR содержит кэп при 5'UTR. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере один ТЕЕ может быть расположен в 5'UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, подвергающийся кэп-зависимой или кэп-независимой трансляции.

[0127] Термин «трансляционный энхансерный элемент» или «элемент энхансер трансляции» (вместе упоминаемые в настоящем документе как «ТЕЕ относится к последовательностям, которые увеличивают количество полипептида или белка, продуцируемого из мРНК.

[0128] Согласно одному аспекту ТЕЕ представляют собой консервативные элементы в UTR, которые могут способствовать трансляционной активности нуклеиновой кислоты, такой как без ограничения кэп-зависимая или кэп-независимая трансляция. Консервативность этих последовательностей была ранее показана Panek et al (Nucleic Acids Research, 2013, 1-10, включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте) для 14 видов, включая человека.

[0129] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая ІІ12, имеет по меньшей мере один ТЕЕ, который на по меньшей мере около 50%, по меньшей мере
около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%,
по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей
мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичен
раскрытому заявке на патент США № 2014/0147454, которая включена в настоящий документ
посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым аспектам РНК (например,

модифицированная РНК) включает по меньшей мере один ТЕЕ, который на по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичен ТЕЕ, описанным в публикациях патентов США № US20090226470, US20070048776, US20130177581 и US20110124100, публикациях международных заявок № WO1999024595, WO2012009644, WO2009075886 и WO2007025008, публикациях европейского патента № EP2610341A1 и EP2610340A1, патенте США № 6310197, патенте США № 6849405, патенте США № 7456273, патенте США № 7183395, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0130] Согласно некоторым аспектам 5'UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, может включать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18 по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55 или более 60 последовательностей TEE. Согласно некоторым аспектам последовательности TEE в 5'UTR PHK (например, модифицированной PHK) представляют собой одинаковые последовательности ТЕЕ. Согласно некоторым аспектам последовательности ТЕЕ находятся в паттерне, таком как ABABAB, или AABBAABBAABB, или ABCABCABC, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз. В этих паттернах каждая буква А, В или С представляет собой другую последовательность ТЕЕ на уровне нуклеотидов.

[0131] Согласно некоторым аспектам спейсер, разделяющий две последовательности ТЕЕ, включает другие последовательности, известные в данной области техники, которые регулируют трансляцию РНК (например, модифицированной РНК), такие как без ограничения последовательности miR, как описано в настоящем документе, (например, сайты связывания miR и исходные последовательности miR). Согласно некоторым аспектам каждый спейсер, используемый для разделения двух последовательностей ТЕЕ, включает другую последовательность miR или компонент последовательности miR (например, исходную последовательность miR).

[0132] Согласно некоторым аспектам ТЕЕ, применяемый в 5′UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12 согласно настоящему изобретению, представляет собой последовательность IRES, такую как без ограничения описанные в патенте США № 7468275 и публикации международной заявки № WO2001055369, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0133] Согласно некоторым аспектам ТЕЕ, как описано в настоящем документе, расположены в 5'UTR и/или 3'UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12.

Согласно некоторым аспектам TEE, расположенные в 3'UTR, являются такими же и/или отличными от TEE, расположенными в и/или описанными для включения в 5'UTR.

[0134] Согласно некоторым аспектам 3'UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, может включать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18 по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55 или более 60 последовательностей ТЕЕ. Согласно некоторым аспектам последовательности ТЕЕ в 3'UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12 согласно настоящему изобретению, представляют собой одинаковые или разные последовательности ТЕЕ. Последовательности ТЕЕ находятся в паттерне, таком как АВАВАВ, или ААВВААВВААВВ, или АВСАВСАВС, или их варианты, повторяющиеся один, два или более трех раз. В этих паттернах каждая буква А, В или С представляет собой другую последовательность ТЕЕ на уровне нуклеотидов.

[0135] Согласно некоторым аспектам 3'UTR включает спейсер для разделения двух последовательностей ТЕЕ. Согласно некоторым аспектам спейсер представляет собой спейсер из 15 нуклеотидов и/или другие спейсеры, известные в данной области техники. Согласно некоторым аспектам 3'UTR может включать модуль последовательность ТЕЕ-спейсер, повторяющийся по меньшей мере один раз, по меньшей мере два раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз и по меньшей мере 9 раз или более 9 раз в 3'UTR.

[0136] Согласно некоторым аспектам спейсер, разделяющий две последовательности ТЕЕ, включает другие последовательности, известные в данной области, которые регулируют трансляцию нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, такие как без ограничения последовательности miR, как описано в настоящем документе, (например, сайты связывания miR и исходные последовательности miR). Согласно некоторым аспектам каждый спейсер, используемый для разделения двух последовательностей ТЕЕ, включает другую последовательность miR или компонент последовательности miR (например, исходную последовательность miR).

Включение сайтов связывания микроРНК

[0137] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, дополнительно содержит сенсорную последовательность. Сенсорные последовательности включают, например, сайты связывания микроРНК, сайты связывания факторов транскрипции, структурированные последовательности мРНК и/или мотивы, искусственные сайты связывания, сконструированные таким образом, чтобы действовать как псевдорецепторы для эндогенных связывающих молекул нуклеиновых кислот. Неограничивающие примеры полинуклеотидов, содержащих по меньшей мере одну сенсорную последовательность, описаны в заявке США № 2014/0147454, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0138] Согласно некоторым аспектам профилирование микроРНК (микроРНК) клетокмишеней или тканей проводят для определения присутствия или отсутствия микроРНК в клетках или тканях.

[0139] МикроРНК (или микроРНК) представляют собой некодирующие РНК длиной 19-25 нуклеотидов, которые связываются с З'UTR молекул нуклеиновой кислоты и подавляют экспрессию генов либо посредством снижения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты, либо посредством ингибирования трансляции. Согласно некоторым аспектам РНК (например, модифицированная РНК) содержит одну или несколько целевых последовательностей микроРНК, последовательностей микроРНК или исходных последовательностей микроРНК. Такие последовательности могут соответствовать любой известной микроРНК, такой как описанные в публикации США US 2005/0261218 и публикации США US 2005/0059005, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. В качестве неограничивающего примера известные микроРНК, их последовательности и исходные последовательности в геноме человека описаны в заявке США № 2014/0147454, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0140] Последовательность микроРНК содержит «исходный» участок, т.е., последовательность в диапазоне положений 2-8 зрелой микроРНК, последовательность которой имеет полную комплементарность по Уотсону-Крику с целевой последовательностью микроРНК. Согласно некоторым аспектам исходная последовательность микроРНК содержит 7 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-8 зрелой микроРНК), где исходная последовательность-комплементарный сайт в соответствующей целевой микроРНК фланкирован аденином (А), противоположным положению 1 микроРНК. Согласно некоторым аспектам исходная последовательность микроРНК содержит 6 нуклеотидов (например, нуклеотиды 2-7 зрелой микроРНК), где исходная последовательность-комплементарный сайт в соответствующей целевой микроРНК фланкирован аденином (A), противоположным положению 1 микроРНК. См., например, Grimson A, Farh K, Johnston W K, Garrett-Engele P, Lim L P, Bartel D P, Mol Cell. 2007 Jul. 6, 27(1):91-105. Основания исходной последовательности микроРНК полностью комплементарны последовательности. Путем конструирования целевых последовательностей микроРНК в 3'UTR нуклеиновых кислот или мРНК согласно настоящему изобретению можно нацелить молекулу на разрушение или снижение трансляции, при условии, что рассматриваемая микроРНК доступна. Этот процесс уменьшит опасность побочных эффектов при доставке молекул нуклеиновой кислоты. Сообщалось об идентификации микроРНК, областей целевой микроРНК, их паттернов экспрессии и роли в биологии (Bonauer et al., Curr Drug Targets 2010 11:943-949, Anand and Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176, Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (2011 Dec. 20. doi: 10.1038/leu.2011.356), Bartel Cell 2009 136:215-233, Landgraf et al, Cell, 2007 129:1401-1414, Gentner and Naldini, Tissue Antigens. 2012 80:393-403 и все процитированные в них источники, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0141] Например, если мРНК не предназначена для доставки в печень, но оказывается там, то miR-122, микроРНК, широко распространенная в печени, может ингибировать экспрессию представляющего интерес гена, если один или несколько сайтов-мишеней miR-122 расположены в 3'UTR модифицированных нуклеиновых кислот, далее модифицированных РНК или рибонуклеиновых кислот. Введение одного или нескольких сайтов связывания для разных микроРНК может быть выполнено для дальнейшего снижения долговечности, стабильности и трансляции белков модифицированных нуклеиновых кислот, далее модифицированной РНК или рибонуклеиновых кислот. В контексте настоящего изобретения термин «сайт микроРНК» относится к целевому сайту микроРНК или сайту распознавания микроРНК или любой нуклеотидной последовательности, с которой связывается или ассоциируется микроРНК. Следует понимать, что «связывание» может следовать традиционным правилам гибридизации Уотсона-Крика или может отражать любую стабильную ассоциацию микроРНК с последовательностью-мишенью в сайте микроРНК или рядом с ним.

[0142] Наоборот, для целей нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, согласно настоящему изобретению, сайты связывания микроРНК могут быть сконструированы исключенными из (т.е. удалены) последовательностей, в которых они встречаются в природе, для увеличения экспрессии белка в конкретных тканях. Например, сайты связывания miR-122 могут быть удалены для улучшения экспрессии белка в печени.

[0143] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, включает по меньшей мере один сайт связывания микроРНК в 3'UTR, чтобы направлять цитотоксические или цитопротекторные терапевтические мРНК на конкретные клетки, такие как без ограничения нормальные и/или раковые клетки (*например*, HEP3B или SNU449).

[0144] Примеры тканей, в которых микроРНК, как известно, регулирует экспрессию мРНК и, таким образом, белка, включают без ограничения печень (miR-122), мышцы (miR-133, miR-206, miR-208), эндотелиальные клетки (miR-17-92, miR-126), миелоидные клетки (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), жировую ткань (let-7, miR-30c), сердце (miR-1d, miR-149), почки (miR-192, miR-194, miR-204) и эпителиальные клетки легких (let-7, miR-133, miR-126).

[0145] В частности, известно, что микроРНК различно экспрессируются в иммунных клетках (также называемых гемопоэтическими клетками), таких как антигенпрезентирующие клетки (АРС) (например, дендритные клетки и макрофаги), макрофаги, моноциты, В-лимфоциты, Т-лимфоциты, гранулоциты, природные клетки-киллеры и т.д. МикроРНК, специфичные для иммунных клеток, участвуют в иммуногенности, аутоиммунитете, иммунном ответе на инфекцию, воспалении, а также в нежелательном иммунном ответе после генной терапии и трансплантации тканей/органов. МикроРНК, специфичные для иммунных клеток, также регулируют многие аспекты развития, пролиферации, дифференцировки и апоптоза гемопоэтических клеток (иммунных клеток). Например, miR-142 и miR-146 экспрессируются исключительно в иммунных

клетках, особенно в изобилии в миелоидных дендритных клетках. В данной области техники продемонстрировано, что иммунный ответ на экзогенные молекулы нуклеиновой кислоты отключается путем добавления сайтов связывания miR-142 к 3'UTR доставляемой генной конструкции, что обеспечивает более стабильный перенос генов в тканях и клетках. miR-142 эффективно разрушает экзогенную мРНК в антигенпрезентирующих клетках и подавляет цитотоксическую элиминацию трансдуцированных клеток (Annoni A et al., blood, 2009, 114, 5152-5161, Brown B D, et al., Nat med. 2006, 12(5), 585-591, Brown B D, et al., blood, 2007, 110(13): 4144-4152, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0146] В данной области техники проведено множество исследований экспрессии микроРНК для изучения профиля дифференциальной экспрессии микроРНК в различных раковых клетках/тканях И при других заболеваниях. Некоторые микроРНК аномально сверхэкспрессированы в определенных раковых клетках, а другие недостаточно экспрессированы. Например, микроРНК различно экспрессируются в раковых клетках (WO2008/154098, US2013/0059015, US2013/0042333, WO2011/157294), стволовых раковых клетках (US2012/0053224), при раке и заболеваниях поджелудочной железы (US2009/0131348, US2011/0171646, US2010/0286232, патент США № 8389210), при астме и воспалении (патент США № 8415096), при раке предстательной железы (US2013/0053264), при гепатоклеточной карциноме (WO2012/151212, US2012/0329672, WO2008/054828, патент США № 8,252,538), в клетках рака легкого (WO2011/076143, WO2013/033640, WO2009/070653, US2010/0323357), при кожной Тклеточной лимфоме (WO2013/011378), в клетках колоректального рака (WO2011/0281756, WO2011/076142), в рак-положительных лимфотических узлах (WO2009/100430, US2009/0263803), при раке носоглотки (ЕР2112235), при хроническом обструктивном заболевании легких (US2012/0264626, US2013/0053263), при раке щитовидной железы (WO2013/066678), в клетках рака яичников (US2012/0309645, WO2011/095623), в клетках рака молочной железы (WO2008/154098, WO2007/081740, US2012/0214699), при лейкозе и лимфоме (WO2008/073915, US2009/0092974, US2012/0316081, US2012/0283310, WO2010/018563, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0147] По меньшей мере один сайт микроРНК может быть включен в 3'-UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по меньшей мере девять, по меньшей мере десять или более сайтов микроРНК могут быть включены в 3' UTR нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12. Согласно некоторым аспектам сайты микроРНК, включенные в нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12, представляют собой одинаковые или разные сайты. Согласно некоторым аспектам сайты микроРНК, включенные в нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12, нацелены на одни и те же или разные ткани организма. В качестве неограничивающего примера, посредством введения сайтов связывания микроРНК, специфичных

для ткани, типа клетки или заболевания, в 3'-UTR модифицированной мРНК нуклеиновой кислоты, степень экспрессии в определенных типах клеток (например, гепатоцитах, миелоидных клетках, эндотелиальных клетках, раковых клетках и др.) может быть снижена.

[0148] Согласно некоторым аспектам сайт микроРНК сконструирован около 5′ конца З'UTR, на около половине пути между 5′ концом и 3′ концом З'UTR, и/или около 3′ конца З'UTR. Согласно некоторым аспектам сайт микроРНК сконструирован около 5′ конца З'UTR и на около половине пути между 5′ концом и 3′ концом З'UTR. Согласно некоторым аспектам сайт микроРНК сконструирован около 3′ конца З'UTR и на около половине пути между 5′ концом и 3′ концом З'UTR. Согласно некоторым аспектам сайт микроРНК сконструирован около 5′ конца З'UTR и около 3′ конца З'UTR.

[0149] Согласно некоторым аспектам модифицированная матричная РНК содержит сайты области связывания микроРНК, которые либо обладают 100% идентичностью с известными исходными последовательностями, либо имеют менее чем 100% идентичность с исходными последовательностями. Исходная последовательность может быть частично мутирована для снижения аффинности связывания микроРНК и, таким образом, уменьшения понижающей модуляции этого транскрипта мРНК. В сущности, степень совпадения или несоответствия между целевой мРНК и исходной последовательностью микроРНК может действовать как реостат для более точной настройки способности микроРНК модулировать экспрессию белка. Кроме того, мутация в области, не относящейся к исходной последовательности, сайта связывания микроРНК также может влиять на способность микроРНК модулировать экспрессию белка.

<u>РНК-мотивы для РНК-связывающих белков (RBP)</u>

[0150] РНК-связывающие белки (RBP) могут регулировать многочисленные аспекты ко- и посттранскрипционной экспрессии генов, такие как без ограничения сплайсинг, локализация, трансляция, оборот, полиаденилирование, кэпирование, модификация, экспорт и локализация РНК. РНК-связывающие домены (RBD), такие как без ограничения мотив распознавания РНК (RR) и домены К-гомологии (КН) hnRNP, обычно регулируют ассоциацию последовательностей между RBP и их РНК-мишенями (Ray et al. Nature 2013. 499:172-177, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Согласно некоторым аспектам канонические RBD связывают короткие последовательности РНК. Согласно некоторым аспектам канонические RBD распознают структуру РНК.

- [0151] Неограничивающие примеры РНК-связывающих белков и родственных последовательностей нуклеиновых кислот и белков описаны в заявке США № 2014/0147454, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.
- [0152] Согласно некоторым аспектам для повышения стабильности представляющей интерес мРНК мРНК, кодирующую HuR, подвергают совместной трансфекции или совместной инъекции вместе с представляющей интерес мРНК в клетки или в ткань. Эти белки также могут быть связаны с представляющей интерес мРНК in vitro, а затем вместе введены в клетки. Белок,

связывающий полиА хвост, РАВР взаимодействует с эукариотическим фактором инициации трансляции eIF4G, чтобы стимулировать инициацию трансляции. Совместное введение мРНК, кодирующих эти RBP, вместе с мРНК-лекарственное средство и/или связывание этих белков с мРНК-лекарственное средство in vitro и введение связанной с белком мРНК в клетки может повысить эффективность трансляции мРНК. Та же концепция может быть расширена на совместное введение мРНК вместе с мРНК, кодирующими различные факторы трансляции и фасилитаторы, а также с самими белками, чтобы влиять на стабильность РНК и/или эффективность трансляции.

[0153] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12 содержит по меньшей мере один РНК-связывающий мотив, такой как без ограничения РНКсвязывающий домен (RBD).

[0154] Согласно некоторым аспектам первая область связанных нуклеозидов и/или по меньшей мере одна фланкирующая область содержит по меньшей мере один RBD. Согласно некоторым аспектам первая область связанных нуклеозидов содержит RBD, связанный с факторами сплайсинга, и по меньшей мере одна фланкирующая область содержит RBD для стабильности и/или факторов трансляции.

Другие регуляторные элементы в 3'UTR

[0155] В дополнение к сайтам связывания микроРНК, другие регуляторные последовательности в 3'-UTR природной мРНК, которые регулируют стабильность и трансляцию мРНК в различных тканях и клетках, могут быть удалены или введены в РНК (например, модифицированная матричная РНК). Такие цис-регуляторные элементы могут включать без ограничения регуляторные элементы цис-RNP (рибонуклеопротеин)/RBP (РНК-связывающий белок). AU-богатый элемент (AUE), структурированный элемент «петля-на-стебле», конститутивные элементы редукции (СDE), GC-обогащенность и другие структурированные мотивы мРНК (Parker B J et al., Genome Research, 2011, 21, 1929-1943, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Например, СDE представляют собой класс регуляторных мотивов, которые опосредуют разрушение мРНК посредством их взаимодействия с белками Roquin. В частности, CDE обнаруживаются во многих мРНК, которые кодируют регуляторы развития и воспаления для ограничения продукции цитокинов в макрофагах (Leppek K et al., 2013, Cell, 153, 869-881, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0156] Согласно некоторым аспектам РНК (например, модифицированная мРНК) является ауксотрофной. В контексте настоящего изобретения термин «ауксотрофный» относится к мРНК, которая содержит по меньшей мере один признак, запускающий, облегчающий или индуцирующий разрушение или инактивацию мРНК в ответ на пространственные или временные сигналы, так что экспрессия белка существенно предотвращается или снижается. Такие пространственные или временные сигналы включают местоположение транслируемой мРНК, такое как конкретная ткань,

орган или клеточное окружение. Также рассматриваются сигналы, включающие температуру, значение pH, ионную силу, содержание влаги и т.п.

3' UTR и AU-богатые элементы

[0157] Известно, что 3'UTR имеют участки аденозинов и уридинов. Эти AU-богатые сигнатуры особенно распространены в генах с высокой скоростью оборота. На основании их признаков последовательностей и функциональных свойствах, AU-богатые элементы (ARE) можно разделить на три класса (Chen et al, 1995): ARE класса I содержат несколько распределенных копий мотива AUUUA в пределах U-богатых областей. С-Мус и МуоD содержат ARE класса I. ARE класса II обладают двумя или более перекрывающимися нонамерами UUAUUUA(U/A)(U/A). Молекулы, содержащие этот тип ARE, включают GM-CSF и TNF-а. ARE класса III менее четко определены. Эти U-богатые области не содержат мотив AUUUA. с-Jun и миогенин представляют собой два хорошо изученных примера этого класса. Известно, что большинство белков, связывающихся с ARE, дестабилизируют мессенджер, тогда как члены семейства ELAV, в первую очередь HuR, как было описано, повышают стабильность мРНК. НuR связывается с ARE всех трех классов. Внедрение специфических сайтов связывания HuR в 3'UTR молекул нуклеиновых кислот приведет к связыванию HuR и, таким образом, к стабилизации сообщения in vivo.

[0158] Введение, удаление или модификацию AU-богатых элементов (ARE) 3'-UTR можно использовать для модулирования стабильности нуклеиновых кислот или мРНК согласно настоящему изобретению. При конструировании специфических нуклеиновых кислот или мРНК можно ввести одну или несколько копий ARE, чтобы сделать нуклеиновые кислоты или мРНК согласно настоящему изобретению менее стабильными и, таким образом, ограничить трансляцию и снизить продукцию результирующего белка. Подобным образом, ARE можно идентифицировать и удалить или мутировать для повышения внутриклеточной стабильности и, таким образом, увеличить трансляцию и продукцию результирующего белка. Эксперименты по трансфекции можно проводить на релевантных клеточных линиях с использованием нуклеиновых кислот или мРНК согласно настоящему изобретению, и продукцию белка можно анализировать в различные моменты времени после трансфекции. Например, клетки могут быть трансфицированы различными ARE-сконструированными молекулами и подвергнуты анализу с помощью набора ELISA для релевантного белка и анализу белка, полученного около через 6 часов, около через 12 часов, около через 24 часа, около через 48 часов и/или около через 7 дней после тансфекции.

3' UTR и тройные спирали

[0159] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит тройную спираль на 3'-конце модифицированной нуклеиновой кислоты, улучшенной нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, или рибонуклеиновой кислоты. Согласно некоторым аспектам 3'-конец нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, включает тройную спираль отдельно или в сочетании с поли-А хвостом.

[0160] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит по меньшей мере первую и вторую U-богатые области, консервативную область «петля-на-стебле» между первой и второй областью и А-богатую область. Согласно некоторым аспектам первая и вторая U-богатые области и А-богатая область, связываются с образованием тройной спирали на 3'-конце нуклеиновой кислоты. Эта тройная спираль может стабилизировать нуклеиновую кислоту, повышать эффективность трансляции нуклеиновой кислоты и/или защищать 3'-конец от разрушения. Иллюстративные тройные спирали включают без ограничения последовательность тройной спирали транскрипта 1 ассоциированной с метастазами аденокарциномы легкого (MALAT1), MEN-β и полиаденилированной ядерной (PAN) РНК (См. Wilusz et al., Genes & Development 2012 26:2392-2407, включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

«Петля-на-стебле»

- [0161] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, включает «петлю-на-стебле», такую как без ограничения гистоновая «петля-на-стебле». Согласно некоторым аспектам «петля-на-стебле» представляет собой нуклеотидную последовательность, которая составляет около 25 или около 26 нуклеотидов в длину, как например, без ограничения SEQ ID NO: 7-17, как описано в публикации международной заявки WO2013103659, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Гистоновая «петля-на-стебле» может быть расположена на 3'-конце кодирующей области (например, на 3'-конце кодирующей области). В качестве неограничивающего примера, «петля-на-стебле» может быть расположена на 3'-конце нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе.
- [0162] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, которая содержит гистоновую «петлю-на-стебле», может быть стабилизирована добавлением по меньшей мере одного нуклеозида, обрывающего цепь. Без ограничения теорией, добавление по меньшей мере одного нуклеозида, обрывающего цепь, может замедлить разрушение нуклеиновой кислоты и, таким образом, может увеличить период полужизни нуклеиновой кислоты.
- [0163] Согласно некоторым аспектам нуклеозид, обрывающий цепь, представляет собой нуклеозид, описанный в публикации международной заявки № WO2013103659, которая включена в настоящий документ посредство ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым \ нуклеозидами, обрывающими цепь, являются 3′-деоксиаденозин (кордицепин), 3′-деоксиуридин, 3′-деоксицитозин, 3′-деоксигуанозин, 3′-деокситимин, 2′,3′-дидеоксинуклеозиды, такие как 2′,3′-дидеоксиаденозин, 2′,3′-дидеоксигуанозин, 2′,3′-дидеокситуанозин, 2′,3′-дидеокситимин, 2′,3′-дидеокситуанозин, 2′,3′-дидеокситимин, 2′,3′-деокситимин, 2′,3′-дидеокситуанозин, 2′,3′-дидеокситимин, 2′,3′-дидеокситуанозин, 2′,3′-дидеокситуан
- [0164] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, включает гистоновую «петлю-на-стебле», последовательность полиА хвоста и/или структуру 5'кэп. Согласно некоторым аспектам гистоновая «петля-на-стебле» находится до и/или после

последовательности поли Ахвоста. Нуклеиновые кислоты, содержащие гистоновую «петлю-настебле» и последовательность поли Ахвоста, могут включать нуклеозид, обрывающий цепь, как описано в настоящем документе.

[0165] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит гистоновую «петлю-на-стебле» и структуру 5'-кэпа. Структура 5'-кэпа может включать без ограничения описанные в настоящем документе и/или известные в данной области техники.

5' кэпирование

[0166] Структура 5'-кэпа мРНК участвует в ядерном экспорте, повышая стабильность мРНК, и связывает кэп-связывающий белок мРНК (СВР), который отвечает за стабильность мРНК в клетке и способность к трансляции посредством ассоциации СВР со связывающим поли(А) белком с образованием зрелых циклических мРНК. Кроме того, кэп способствует удалению 5'-проксимальных интронов в ходе сплайсинга мРНК.

[0167] Молекулы эндогенной мРНК могут быть кэпированы на 5'-конце, образуя 5'-ррр-5'-трифосфатную связь между концевым остатком кэпа гуанозина и 5'-концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом мРНК. Затем этот 5'-гуанилатный кэп можно быть метилирован с образованием остатка N7-метилгуанилата. Сахара рибозы концевых и/или предтерминальных транскрибируемых нуклеотидов 5'-конца мРНК необязательно также могут быть 2'-О-метилированы. Удаление 5'-кэпа посредством гидролиза и отщепления структуры гуанилатного кэпа может нацеливать молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, на разрушение.

[0168] Модификации РНК согласно настоящему изобретению могут генерировать негидролизуемую структуру кэпа, предотвращающая удаление кэпа и, таким образом, увеличивая время полужизни мРНК. Поскольку гидролиз структуры кэп требует расщепления 5'-ppp-5' сложных фосфодиэфирных связей, в ходе реакции кэпирования можно использовать модифицированные нуклеотиды. Например, фермент Vaccinia Capping от New England Biolabs (Ipswich, Mass.) можно использовать с α-тио-гуанозиновыми нуклеотидами в соответствии с инструкциями производителя для создания фосфоротиоатной связи в 5'-ppp-5' кэпе. Можно использовать дополнительные модифицированные гуанозиновые нуклеотиды, такие как α-метил-фосфонатные и селенофосфатные нуклеотиды.

[0169] Дополнительные модификации включают без ограничения 2'-О-метилирование рибозных сахаров 5'-концевых и/или 5'-предтерминальных нуклеотидов мРНК (как указано выше) при 2'-гидроксильной группе сахарного кольца. Множественные различные структуры 5'-кэпа могут быть использованы для создания 5'-кэпа молекулы нуклеиновой кислоты, такой как молекула мРНК.

[0170] Аналоги кэпа, которые в настоящем документе также называются синтетическими аналогами кэпа, химическими кэпами, химическими аналогами кэпа или структурными или функциональными аналогами кэпа, отличаются от природных (т.е. эндогенных, дикого типа или физиологических) 5'-кэпов своей химической структурой, сохраняя при этом функцию кэпа.

Аналоги кэпа могут быть химически (т.е. неферментативно) или ферментативно синтезированы и/или связаны с молекулами нуклеиновой кислоты.

[0171] Например, аналог кэпа Anti-Reverse (ARCA) содержит два гуанина, связанных 5'-5'-трифосфатной группой, где один гуанин содержит метильную группу N7, а также 3'-О-метильную группу (т.е., N7,3'-О-диметил-гуанозин-5'-трифосфат-5'-гуанозин (m7G-3' mppp-G, который может быть эквивалентно сконструирован как 3' О-Ме-m7G(5')ppp (5')G). Атом 3'-О другого немодифицированного гуанина связывается с 5'-концевым нуклеотидом кэпированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, мРНК или ммРНК). N7- и 3' -О-метилированный гуанин обеспечивает концевую часть кэпированной молекулы нуклеиновой кислоты (например, мРНК или ммРНК).

[0172] Другим примером кэпа является mCAP, который подобен ARCA, но имеет 2'-β-метильную группу при гуанозине (т.е., N7,2'-О-диметил-гуанозин-5'-трифосфат-5'-гуанозин, m7Gm-ppp-G).

[0173] Согласно некоторым аспектам кэп представляет собой динуклеотидный аналог кэпа. Согласно некоторым аспектам динуклеотидный аналог кэпа модифицирован в различных фосфатных положениях боранофосфатной группой или фосфорселеноатной группой, как например, динуклеотидные аналоги кэпа, описанные в патенте США № 8519110, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0174] Согласно некоторым аспектам кэп представляет собой аналог кэпа, представляющий собой N7-(4-хлорфеноксиэтил)-замещенную дикуклеотидную форму аналога кэпа, как известно в данной области техники и/или как описано в настоящем документе. Неограничивающие примеры N7-(4-хлорфеноксиэтил)-замещенной динуклеотидной формы аналога кэпа включают аналог кэпа N7-(4-хлорфеноксиэтил)-G(5')ppp(5')G и N7-(4-хлорфеноксиэтил)-m3'-OG(5')ppp(5')G (см., например, различные аналоги кэпа и способы синтеза аналогов кэпа, описанные в Коге et al. Віоогдапіс & Medicinal Chemistry 2013 21:4570-4574, содержание которой описано в настоящем документе посредством ссылки во всей своей полноте). Согласно некоторым аспектам аналог кэпа согласно настоящему изобретению представляет собой 4-хлор/ бромфеноксиэтиловый аналог.

[0175] В то время как аналоги кэпа позволяют одновременно кэпировать молекулу нуклеиновой кислоты в реакции транскрипции *in vitro*, до около 20% транскриптов остаются некэпированными. Это, а также структурные отличия аналога кэпа от эндогенных структур 5'-кэпа нуклеиновых кислот, продуцируемых эндогенным механизмом клеточной транскрипции, могут приводить к снижению способности к трансляции и снижению клеточной стабильности. Соответственно, согласно некоторым аспектам способы согласно настоящему изобретению (*см., например*, Примеры 1-3) способны повышать эффективность кэпирования получаемых IL-12-экспрессирующих нуклеотидов, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам посредством способов согласно настоящему изобретению по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около

45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, около 100% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам посредством способов согласно настоящему изобретению по меньшей мере около 50% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 60% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 70% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 80% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 85% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 90% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 95% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 95% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере около 95% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам около 100% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам около 100% полинуклеотидов кэпированы. Согласно некоторым аспектам около 100% полинуклеотидов кэпированы.

[0176] Согласно некоторым аспектам получают РНК с 5'-кэпом или 5'-аналогом кэпа посредством транскрипции ДНК-матрицы in vitro в присутствии указанного 5'-кэпа или аналога 5'-кэпа, где указанный 5'-кэп котранскрипционно включается в сгенерированную цепь РНК.

[0177] Согласно некоторым аспектам РНК может быть получена, например, путем транскрипции in vitro, а 5'-кэп может быть присоединен к РНК посттранскрипционно с использованием кэпирующих ферментов, например, кэпирующих ферментов вируса коровьей оспы. Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, кэпируется посттранскрипционно с использованием ферментов для создания более аутентичных структур 5'-кэпа. В контексте настоящего изобретения «более аутентичный» относится к признаку, который точно отражает или имитирует, либо структурно, либо функционально, признак эндогенного или дикого типа. То есть «более аутентичный» признак лучше отражает эндогенную, дикого типа, природную или физиологическую клеточную функцию и/или структуру по сравнению с синтетическими признаками или аналогами и т.д. предшествующего уровня техники или превосходит соответствующий эндогенный признак, признак дикого типа, природный или физиологический признак в одном или нескольких отношениях. Неограничивающими примерами более аутентичных 5'-кэп-структур согласно настоящему изобретению являются те, которые, среди прочего, обладают усиленным связыванием кэп-связывающих белков, увеличенным временем полужизни, сниженной чувствительностью к 5'-эндонуклеазам и/или уменьшенным удалением 5'кэпа, как по сравнению с синтетическими структурами 5'-кэпа, известными в данной области техники (или со структурой 5'-кэпа дикого типа, природной или физиологической). Например, рекомбинантный фермент кэпирования вируса коровьей оспы и рекомбинантный фермент 2'-Ометилтрансферазы могут создавать каноническую 5'-5'-трифосфатную связь между 5'-концевым нуклеотидом мРНК и кэп-нуклеотидом гуанин, где кэп-гуанин содержит N7 метилирование, и 5'концевой нуклеотид мРНК содержит 2'-О-метил. Этот кэп приводит к более высокой трансляционной способности и клеточной стабильности, а также к уменьшенной активации клеточных провоспалительных цитокинов по сравнению, *например*, с другими структурами аналога 5'-кэпа, известными в данной области техники. Структуры кэпа включают 7mG(5')ppp(5')N,pN2p, 7mG(5')ppp(5')NlmpNp, 7mG(5')-ppp(5')NlmpN2 mp и m(7)Gpppm(3)(6,6,2')Apm(2')Apm(2')Cpm(2)(3,2')Up.

[0178] Согласно некоторым аспектам 5'-концевые кэпы включают эндогенные кэпы или аналоги кэпа. Согласно некоторым аспектам 5'-концевой кэп содержит аналог гуанина. Полезные аналоги гуанина включают инозин, N1-метил-гуанозин, 2' фтор-гуанозин, 7-деаза-гуанозин, 8-оксогуанозин, 2-амино-гуанозин, LNA-гуанозин и 2-азидо-гуанозин.

[0179] Согласно некоторым аспектам 5'-кэп содержит 5'-5' трифосфатную связь. Согласно некоторым аспектам 5'-кэп содержит 5'-5' трифосфатную связь, включая тиофосфатную модификацию. Согласно некоторым аспектам 5'-кэп содержит 2'-О или 3'-О-рибозаметилированный нуклеотид. Согласно некоторым аспектам 5'-кэп содержит модифицированный нуклеотид гуанозин или модифицированный нуклеотид аденозин. Согласно некоторым аспектам 5'-кэп содержит 7-метилгуанилат. Иллюстративные структуры кэпа включают m7G(5')ppp(5')G, m7,2'O-mG(5')ppSp(5')G, m7G(5')ppp(5')2'O-mG и m7,3'O-mG(5')ppp(5')2'O-mA.

[0180] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит модифицированный 5'-кэп. Модификация 5'-кэпа может повысить стабильность мРНК, увеличить время полужизни мРНК и повысить эффективность трансляции мРНК. Согласно некоторым аспектам модифицированный 5'-кэп содержит одну или несколько из следующих модификаций: модификация в 2'- и/или 3'-положении кэпированного гуанозинтрифосфата (GTP), замещение кислорода в сахарном кольце (что приводит к образованию карбоциклического кольца) метиленовым фрагментом (CH2), модификация при фрагменте трифосфатного мостика кэпструктуры или модификация при фрагменте азотистого основания (G).

[0181] Структура 5'-кэпа, которая может быть модифицирована, включает без ограничения кэпы, описанные в заявке США № 2014/0147454 и WO 2018/160540, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Последовательности IRES

[0182] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL12, содержит внутренний аминоацильный сайт рибосомы (IRES). Впервые идентифицированная как
признак PHK вируса Picorna, IRES играет важную роль в инициации синтеза белка в отсутствие
структуры 5'-кэп. IRES может действовать как единственный сайт связывания рибосомы или может
служить одним из нескольких сайтов связывания рибосомы мРНК. Нуклеиновые кислоты или
мРНК, содержащие более одного функционального сайта связывания рибосомы, могут кодировать
несколько пептидов или полипептидов, которые независимо транслируются рибосомами
(«мультицистронные молекулы нуклеиновой кислоты»). Когда нуклеиновые кислоты или мРНК
снабжены IRES, дополнительно необязательно предоставляется вторая транслируемая область.
Примеры последовательностей IRES, которые можно использовать в соответствии с настоящим

изобретением, включают без ограничения последовательности из пикорнавирусов (*например*, ящура), вирусов вредителей (CFFV), полиовирусов (PV), вирусов энцефаломиокардита (ECMV), вирусов ящура (FMDV), вирусов гепатита С (HCV), вирусов европейской чумы свиней (CSFV), вирусов мышиного лейкоза (MLV), вирусов иммунодефицита обезьян (SIV) или вирусов паралича сверчков (CrPV).

Концевые структурные модификации: поли-А хвосты

[0183] В ходе процессинга РНК длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли-А хвост) обычно добавляется к молекулам матричной РНК (мРНК) для повышения стабильности молекулы. Сразу после транскрипции 3'-конец транскрипта отщепляется, высвобождая 3'-гидроксил. Затем поли-А-полимераза добавляет к РНК цепочку адениновых нуклеотидов. Процесс, называемый полиаденилированием, добавляет поли-А хвост длиной от 100 до 250 остатков.

[0184] Согласно некоторым аспектам длина 3' хвоста составляет более около 30 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым аспектам поли-А хвост составляет более около 35 нуклеотидов в длину. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 40 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 45 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 55 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 60 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере 70 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 80 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 90 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 100 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 120 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 140 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 160 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 180 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 200 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 250 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 300 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 350 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 400 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 450 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 500 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 600 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 700 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина составляет по меньшей мере около 800 нуклеотидов. Согласно некоторым аспектам длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 900
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 1100
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 1200
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 1300
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 1500
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 1600
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 составляет
 по
 меньшей
 мере
 около
 1800
 нуклеотидов.
 Согласно
 некоторым
 аспектам
 длина

 <tr

[0185] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL12, сконструирована со включением полиА-G квартета. G-квартет представляет собой циклический массив из четырех гуаниновых нуклеотидов, связанных водородными связями, который может быть образован G-богатыми последовательностями как в ДНК, так и в РНК. Согласно этому аспекту G-квартет включен на конце поли-A хвоста. Полученную нуклеиновую кислоту или мРНК можно анализировать на стабильность, продукцию белка и другие параметры, включая время полужизни, в различные моменты времени. Было обнаружено, что полиА-G квартет приводит к продукции белка, эквивалентной по меньшей мере 75% от наблюдаемой при использовании только поли-A хвоста из 120 нуклеотидов.

[0186] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит полиА хвост и стабилизируется добавлением нуклеозида, обрывающего цепь. Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12 с полиА-хвостом, дополнительно содержит структуру 5'-кэп.

[0187] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12 содержит полиА-G квартет. Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12 с полиА-G квартетом, дополнительно содержит структуру 5'-кэп.

[0188] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, которая содержит полиА хвост или полиА-G квартет, стабилизируется добавлением олигонуклеотида, оканчивающегося на 3'-деоксинуклеозид, 2',3'-дидеоксинуклеозид 3'-0-метилнуклеозиды, 3'-0-этилнуклеозиды, 3'-арабинозиды и другие модифицированные нуклеозиды, известные в данной области техники, и/или как описано в настоящем документе.

[0189] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов. Согласно некоторым аспектам один или несколько модифицированных нуклеозидов содержат 6-аза-цитидин, 2-тио-цитидин, астио-цитидин, псевдо-изо-цитидин, 5-аминоаллил-уридин, 5-йод-уридин, N1-метил-псевдоуридин, 5,6-дигидроуридин, астио-уридин, 4-тио-уридин, 6-аза-уридин, 5-гидрокси-уридин, деокситимидин, псевдо-уридин, инозин, астио-гуанозин, 8-оксо-гуанозин, Об-метил-гуанозин, 7-деазагуанозин, N1-метил-аденозин, 2-амино-6-хлор-пурин, N6-метил-2-амино-пурин, 6-хлор-пурин, N6-метил-аденозин, астио-аденозин, 8-азидо-аденозин, 7-деаза-аденозин, пирроло-цитидин, 5-метил-цитидин, N4-ацетил-цитидин, 5-метил-уридин, 5-йод-цитидин и их комбинации.

[0190] Согласно некоторым аспектам один или несколько уридинов в нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12, замещены модифицированным нуклеозидом. Согласно некоторым аспектам модифицированный нуклеозид, замещающий уридин, представляет собой псевдоуридин (ψ), N1-метил-псевдоуридин (m1ψ) или 5-метил-уридин (m5U).

[0191] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12, как описано в заявке на патент США № 2014/0147454, международной заявке WO2018160540, международной заявке WO2015/196118 или международной заявке WO2015/089511, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

<u> Цитотоксические нуклеозиды</u>

[0192] Согласно некоторым аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит один или несколько цитотоксических нуклеозидов. Например, цитотоксические нуклеозиды могут быть включены в полинуклеотиды, такие как бифункциональные нуклеотидные последовательности, кодирующие IL-12, или мРНК. Цитотоксические нуклеозидные противораковые средства включают без ограничения аденозин арабинозид, цитарабин, цитозин арабинозид, 5-фторурацил, флударабин, флоксиридин, FTORAFUR® (комбинация тегафура и урацила), тегафур ((RS)-5-фтор-1-(тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион) и 6-меркаптопурин.

[0193] Ряд цитотоксических нуклеозидных аналогов находятся в клиническом применении или прошли клинические испытания в качестве противораковых средств. Примеры таких аналогов включают без ограничения цитарабин, гемцитабин, троксацитабин, децитабин, тезацитабин, 2'-деокси-2'-метилиденцитидин (DMDC), кладрибин, клофарабин, 5-азацитидин, 4'-тио-арацитидин, циклопентенилцитозин и 1-(2-С-циано-2-деокси-бета-D-арабино-пентофуранозил)-цитозин. Другим примером такого соединения является флударабинфосфат. Эти соединения можно вводить системно, и они могут иметь побочные эффекты, которые являются типичными для цитотоксических средств, такие как без ограничения небольшая специфичность или отсутствие специфичности в отношении опухолевых клеток по сравнению с пролиферирующими нормальными клетками.

[0194] В данной области также сообщается о ряде пролекарств цитотоксических нуклеозидных аналогов. Примеры включают без ограничения N4-бегеноил-1-бета-D-арабинофуранозилцитозин, N4-октадецил-1-бета-D-арабинофуранозилцитозин, N4-пальмитоил-1-(2-С-циано-2-деокси-бета-D-арабино-пентофуранозил) цитозин и P-4055 (цитарабин-5'-сложный эфир элаидиновой кислоты). Как правило, эти пролекарства могут превращаться в активные лекарственные средства, главным образом, в печени и системном кровотоке, и проявляют незначительное избирательное высвобождение активного лекарственного средства или его отсутствие в опухолевой ткани. Например, капецитабин, пролекарство 5'-деокси-5-фторцитидина (и, в конечном счете, 5-фторурацила), метаболизируется как в печени, так и в опухолевой ткани. Ряд аналогов капецитабина, содержащих «радикал, легко гидролизуемый в физиологических условиях», был заявлен Fujiu et al. (патент США № 4966891) и включен в настоящий документ посредством ссылки. Ряд, описанный Fujiu, включает N4-алкил- и аралкилкарбаматы 5'-деокси-5-фторцитидина, и предполагается, что эти соединения будут активированы путем гидролиза в нормальных физиологических условиях с образованием 5'-деокси-5-фторцитидина.

[0195] Ряд цитарабин N4-карбаматов раскрыт Fadl et al (Pharmazie. 1995, 50, 382-7, включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте), соединения которого разработаны для превращения в цитарабин в печени и плазме. В WO 2004/041203, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыты пролекарства гемцитабина, где некоторые из пролекарств представляют собой N4-карбаматы. Эти соединения были разработаны для преодоления желудочно-кишечной токсичности гемцитабина и предназначены для обеспечения гемцитабина путем гидролитического высвобождения в печени и плазме после всасывания интактного пролекарства из желудочно-кишечного тракта. Nomura et al (Bioorg Med. Chem. 2003, 11, 2453-61, которая включена в настоящий документ посредством ссылки всей своей полноте) описал ацетальные производные **1-(3-С-этинил-β-D-рибо**во пентофаранозил) цитозин, которые, при биовосстановлении обеспечивали промежуточное соединение, которое требовало дальнейшего гидролиза в кислотных условиях для получения цитотоксического нуклеозидного соединения.

[0196] Цитотоксические нуклеотиды, которые могут быть химиотерапевтическими, также включают без ограничения пиразоло[3,4-D]-пиримидины, аллопуринол, азатиоприн, капецитабин, цитозинарабинозид, фторурацил, меркаптопурин, 6-тиогуанин, ацикловир, ара-аденозин, рибавирин, 7-деаза-аденозин, 7-деаза-гуанозин, 6-аза-урацил, 6-аза-цитидин, тимидинрибонуклеотид, 5-бромдезоксиуридин, 2-хлор-пурин и инозин или их комбинации.

Кодирующие последовательности

[0197] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, содержит последовательность, которая кодирует молекулу интерлейкина (IL)-12. Согласно некоторым аспектам молекула IL-12 содержит IL-12, субъединицу

IL-12 (*например*, бета-субъединицу IL-12 или альфа-субъединицу IL-12) или мутантную молекулу IL-12, которая сохраняет иммуномодулирующую функцию.

[0198] IL-12 представляет собой гетеродимерный цитокин с множественными биологическими эффектами на иммунную систему. Он состоит из двух субъединиц, р35 (также известной как альфа-субъединица) и р40 (также известной как бета-субъединица), которые взаимодействуют с образованием активного гетеродимера (также называемого «р70»). Субъединица р35 IL-12 также известна в данной области техники как IL-12α, IL-12A, фактор стимуляции естественных клеток-киллеров 1, фактор созревания цитотоксических лимфоцитов 1, р35, CLMF P35, NKSF1, CLMF или NFSK. Субъединица IL-12 р40 также известна в данной области техники как IL-12β, IL-12B, фактор стимуляции естественных клеток-киллеров 2, фактор созревания цитотоксических лимфоцитов 2, P40, CLMF P40, NKSF2, CLMF2, IMD28 или IMD29. Если не указано иное, термин «IL-12» (или его грамматический вариант) может относиться к субъединице IL-12 р35, субъединице IL-12 р40 или гетеродимерному IL-12 р70.

[0199] Человеческий белок IL-12 р35 дикого типа состоит из 219 аминокислот в длину. Человеческий белок IL-12 р40 дикого типа состоит из 328 аминокислот в длину. Аминокислоты человеческих белков IL-12 дикого типа приведены в Таблице 1 ниже.

[0200] Согласно некоторым аспектам белок IL-12 (например, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе) содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94% по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична SEQ ID NO: 182.

[0201] Согласно некоторым аспектам молекула IL-12 содержит субъединицы IL-12α и/или IL-12β. Согласно некоторым аспектам субъединица IL-12α содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична SEQ ID NO: 183.

[0202] Согласно некоторым аспектам субъединица IL-12β содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94% по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична SEQ ID NO: 184.

[0203] Как описано в настоящем документе, молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению были кодон-оптимизированы. Соответственно, согласно некоторым

аспектам нуклеотидная последовательность, кодирующая белок IL-12 (*например*, IL-12 р35 субъединицу, IL-12 р40 субъединицу или гетеродимерный IL-12 р70), как раскрыто в настоящем документе, отличается от нуклеотидной последовательности дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 186).

[0204] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, как описано в кодирует субъединицу IL-12β содержит настоящем документе, И нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в любой из SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75. Согласно определенным аспектам нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности субъединицы IL-12β любой из конструкций, приведенных в Таблице 1.

[0205] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12 р40 субъединицу, содержит нуклеотидную последовательность, которая на (i) по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, (ii) по меньшей мере 78%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере

79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 52, (iii) по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 53, (iv) по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 54, (v) по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 55, (vi) по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 56, (vii) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 57, (viii) по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 58, (ix) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 59, (x) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, 69 или 74, (xi) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%

идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 66, 70 или 75, (xii) по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 62, (xiii) по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 63, или (xiv) по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 64.

[0206] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 53. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 54. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 55. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 56 Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 58. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 59. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 65. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 66. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 67. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 70. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 71. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 73. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12β, содержит последовательность, как

представлено в SEQ ID NO: 74. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 75. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 62. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 63. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 60. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 61.

[0207] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, кодирует IL-12 р35 субъединицу и содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в любой из SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125. Согласно определенным аспектам нуклеотидная последовательность на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности субъединицы IL-12 пюбой из конструкций, приведенных в Таблице 1.

[0208] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12 р35 субъединицу, содержит нуклеотидную последовательность, которая на (i) по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%,

по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101, (ii) по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 102, (ііі) по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 103, (iv) по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 104, (v) по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 105, (vi) по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 106, (vii) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 107, (viii) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 108, (ix) по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO:

109, (х) по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115, 119 или 124, (хі) по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 116, 120 или 125, (хіі) по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 112, (хііі) по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113, или (хіv) по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113, или (хіv) по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 114.

[0209] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12а, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 101. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12α, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 102. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12α, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 103. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12а, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 104. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІL-12α, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12a, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 106. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12α, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 107. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12а, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 108. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІL-12α, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 109. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12a, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 115. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12а, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 116. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 117. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119]. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 120. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты,

кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 121. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 122. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 123. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 124. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 125. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12α, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 112. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12a, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 113. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу ІІ-12а, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 114. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 110. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 111.

[0210] Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12 р40 субъединицу, и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12 р35 субъединицу, конъюгированы друг с другом. Например, согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему первую нуклеиновую кислоту и вторую нуклеиновую кислоту, где первая нуклеиновая кислота кодирует IL-12 p40 субъединицу, и вторая нуклеиновая кислота кодирует IL-12 р35 субъединицу. Согласно некоторым аспектам субъединица IL-12α и субъединица IL-12β связаны линкером. Согласно некоторым аспектам линкер содержит аминокислотный линкер из по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 аминокислот. Согласно некоторым аспектам линкер содержит линкер (GS). Согласно некоторым аспектам линкер GS имеет формулу (Gly3Ser)n или S(Gly3Ser)n, где n представляет собой положительное целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100. Согласно некоторым аспектам линкер (Gly3Ser)n представляет собой (Gly3Ser)3 или (Gly3Ser)4.

[0211] Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей

мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75, и вторая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено B SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125.

[0212] Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты кодирующая субъединицу IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности субъединицы IL-12β любой из конструкций, приведенных в Таблице 1, и вторая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 79%, по меньшей мере около 80%, по меньшей

83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности субъединицы IL-12α любой из конструкций, приведенных в Таблице 1.

[0213] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101, (ii) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 52, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 102, (ііі) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая

на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 53, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 103, (iv) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 54, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 104, (v) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 55, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 105, (vi) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 56, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 106, (vii) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 57, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 107, (viii) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 58, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 108, (ix) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 59, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 109, (x) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, 69 или 74, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или

100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115, 119 или 124, (xi) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 66, 70 или 75, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 116, 120 или 125, (хіі) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 62, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 112, (xiii) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 63, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113, или (xiv) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115.

[0214] Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 51, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 101. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 102. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 53, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 103. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 54, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 104 Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 55, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID

NO: 56, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 106. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 57, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 107. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 58, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 59, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 65, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 115. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 66, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 116. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 67, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 117. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 68, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 69, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 70, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 120. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 71, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 121. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 72, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 122. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 73, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 123. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 74, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 124. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 75, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 125. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 62, и вторая молекула нуклеиновой кислоты

содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 112. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 63, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 113. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 114. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 60, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 110. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 61, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 111. Согласно некоторым аспектам первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность субъединицы IL-12β любой из конструкций, приведенных в Таблице 1, и вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность субъединицы IL-12α любой из конструкций, приведенных в Таблице 1.

Таблица 1

Описание	Последовательность
Человеческий IL-12	mcparslllvatlvlldhlslaRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK
дикого типа (т.е.,	ARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET
комбинация IL-12а и	SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
субъединицы IL-12βs)	PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL
(аминокислотная	CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASmchqqlviswfslvflasplvaIWELKKDV
последовательность)	YVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTL
(SEQ ID NO: 182)	TIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQK
(сигнальные пептиды	EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV
для субъединиц	TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDA
приведены строчными	VHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
буквами)	WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISV
	RAQDRYYSSSWSEWASVPCS
Человеческая	mcparslllvatlvlldhlslaRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQK
субъединица IL-12α	ARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET
дикого типа	SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD
(сигнальный пептид	PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL
приведен строчными	CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
буквами) (SEQ ID NO:	
183)	

Человеческая субъединица IL-12β дикого типа (сигнальный пептид приведен строчными буквами) (SEQ ID NO: 184)

mchqqlviswfslvflasplvalWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT
PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS
HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWW
LTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV
ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPK
NLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREK
KDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

L1 конструкция (SEQ ID NO: 1) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 26), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 51), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 76), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 101), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 126), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 147)

 $atgcgagttcctgctcagctgcttggtctgttactgctgtggttgccgggcgcacgatgtgct \underline{ATCTGG}$ GAATTAAAGAAGATGTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTAC **CCAGATGCTCCGGGCGAAATGGTTGTACTCACATGCGATACT CCGGAGGAAGACGGTATCACTTGGACATTGGATCAGTCGAG TGAGGTTCTCGGTAGTGGTAAAACACTAACGATCCAAGTCAA** AGAAT<u>TCGGTGATGCGGGGCAATATACCTGTCATAAAGGCG</u> GCGAAGTACTATCTCATAGCCTCCTGCTGTTACACAAGAAGG <u>AAGATGGCATATGGTCCACCGACATCCTTAAGGATCAGAAAG</u> **AACCCAAGAACAAACTTTCTTGCGTTGCGAAGCTAAGAACT ACTCCGGCCGCTTCACATGCTGGTGGTTGACAACGATCAGTA** <u>CGGATCTAACCTTCTGTTAAGTCCAGTCGGGGGAGTTCGG</u> <u>ACCCCCAAGGCGTCACGTGTGGAGCTGCCACACTTTCCGCTG</u> **AGCGCGTACGTGGAGATAATAAAGAGTATGAATACTCCGTTG** AGTGCCAGGAGGACTCCGCGTGCCCGCTGCCGAGGAGAGT **CTCCCCATAGAGGTGATGGTCGACGCTGTTCACAAACTGAAA TATGAGAACTATACCTCATCCTTCTTTATACGTGACATAATTA AGCCAGATCCCCCGAAGAACTTACAATTGAAACCATTGAAGA ATTCACGTCAAGTCGAGGTATCCTGGGAGTATCCCGACACCT GGTCCACGCCACACTCATATTTCTCTCTGACCTTCTGTGTGC** AGGTACAAGGCAAGAGCAAACGAGAAAAAAAGGACAGAGTT **TTCACGGATAAGACTAGCGCCACAGTGATATGTAGGAAAAAC GCATCGATCTCAGTCCGCGCGCAAGATCGGTATTACTCAAGC AGTTGGTCAGAGTGGGCATCGGTGCCCTGCTCG** GGTGGGGCAGTGGAGGAGGATCAGGTGGCGCAGTCGCAATCT ACCCGTGGCAACACCAGACCCGGGAATGTTCCCATGTCTGCA CCACAGTCAAAACCTCTTAAGGGCCGTGTCAAATATGCTACA GAAGGCGAGACAGACTTTAGAATTCTACCCTTGTACAAGCGA GGAGATTGACCACGAGGACATCACCAAAGATAAGACGAGCA CCGTCGAGGCTTGCCTGCCTCTAGAACTAACAAAAAATGAAT CATGCTTGAACTCGAGGGAGACCAGTTTCATTACTAACGGTT CATGTCTTGCATCGAGGAAGACCTCATTCATGATGGCCCTGT

GCCTCTCGTCCATTTATGAAGACCTAAAGATGTACCAGGTAG
AGTTTAAGACCATGAACGCCAAGCTCCTCATGGATCCAAAAC
GGCAAATATTCTTAGATCAGAATATGCTCGCTGTTATCGACG
AACTCATGCAGGCGCTTAACTTCAACTCAGAAACCGTTCCCC
AAAAGTCGAGTCTAGAAGAACCGGACTTTTATAAGACCAAAA
TTAAACTGTGTATACTACTTCACGCCTTCAGGATAAGAGCAG
TGACGATTGACAGGGTGATGTCCTACTTGAATGCATCAGGAT

CAGGGGGAGGCTCGgacgcccataagaagcgaagtcgcccaccgcttcaaggagtttgggtgaa

 $\underline{CAGGGGGAGGCTCG} gacgcccataagagcgaagtcgcccaccgcttcaaggatttgggtgag$ gaaaacttcaaagccctggtcctgatagcgtttgcccaatatttgcagcagtgtccattcgaagatcacgtga $\underline{aattggtgaacgaggtaacagaatttgctaagacttgtgtggctgacgagtcggccgaaaactgtgataaga}$ $\underline{gtcttcatacactgtttggcgataagctatgtactgtcgctacacttagggagacttacggtgagatggccgactacggcactacggtgagatggccgactacggtgagatggccgactacggtgagatggccgactacggactacggcactacggtgagatggccgactacggcactacggtgagatggccgactacggcactacggtgagatggccgactacggcact$ $\underline{tgctgcgccaagcaagaacgaaacgaaacgaatgttttctgcaacataaggacgacaatcccaacctgc}$ ccagattggttcgcctgaagttgatgttatgtgcaccgcatttcacgacaacgaagaaacctttcttaaaaag $\underline{tatctgtacgagatagctcgacgtcacccttacttctacgcgcccgaacttctgtttttcgccaagcgatacaaa}$ gccgctttcacagagtgttgccaagctgccgacaaagccgcttgccttctaccaaagcttgacgagctcagatgaagggaaagctagtteggeaaagcaacgattaaagtgtgeatcactgeaaaaatteggegaacgag cetttaaageatgggcagttgccaggttatcccaaaggttcccgaaagetgaattcgctgaggtgagcaagtt agtcacggaccttacgaaggtacataccgaatgctgccacggggacctcttggagtgcgctgacgacagg geggacttagetaaatacatttgegagaatcaggactcaatcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagtcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagttctaaacttaaagaatgctgegagaaactcagaac<u>cgctcctggaaaaatcacattgcatcgccgaggtggaaaacgatgagatgccagcagatttaccatctctag</u> ttctatacgaatacgctagaaggcatcctgactattctgtcgttttactgcttagactagcgaagacatatgaaa $\underline{cgacgttagagaaatgctgcgcgccgctgacccccacgaatgttacgcgaaggtctttgatgagttcaag}$ $\underline{ccctggttgaggagccgcaaaaccttattaaacagaattgtgagctatttgagcagttaggcgaatataaatt}$ cagaaatctaggaaaggtaggctctaaatgctgcaagcatcccgaagccaagagaatgccatgcgctgaa gactacettagegttgttetgaatcagttgtgtgteetteaegaaaagaegeeggtgagtgategtgteaegaa $\underline{gtgctgtacagagagcctcgtcaaccgtaggccatgtttctccgctctcgaggtggatgaaacatatgtacct}\\$ aaaaagcagacggctcttgtagagttggtcaaacataagcctaaggccactaaagagcagctaaaggcagt $\underline{aatggacgactttgcggctttcgttgagaagtgctgcaaggccgacgataaagagacctgtttcgcggaag}\\$ aaggtaaaaagttagtggccgcctcccaggcggccctgggcctgtag

L2 конструкция (SEQ ID NO: 2) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO:

atgcgcgtgcccgcacaattgctcggactgctgctgctgctgctgctgcggaaATTTG

GGAACTTAAGAAGGACGTATACGTTGTGGAACTTGACTGGTA

CCCTGATGCTCCAGGGGAGATGGTGGTTTTGACGTGTGACAC

CCCGGAAGAAGATGGAATTACATGGACCTTAGACCAATCCTC

CGAGGTTCTTGGCTCGGGCAAAACCTTGACCATTCAGGTCAA

GGAATTTGGCGATGCTGGCCAATACACCTGCCATAAAGGTGG

27), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 52), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 77), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 102), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 127), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEO ID NO: 148)

AGACGGCATTTGGTCGACAGACATATTGAAGGATCAGAAGG <u>AACCTAAGAATAAGACCTTCTTACGATGTGAGGCCAAGAATT</u> <u>ATTCCGGACGTTTTACGTGTTGGTGGTTGACCACGATCTCCA</u> **CTGACTTAACCTTCTCAGTGAAATCCTCACGAGGTAGTTCCG** <u>ATCCCCAGGGTGTGACGTGCGGTGCGGCCACGTTAAGTGCT</u> **GAGAGAGTACGGGGCGACAATAAGGAATACGAGTACTCAGT TGAATGCCAAGAGGACTCGGCCTGTCCCGCGGCAGAGGAGA GTCTCCCTATCGAAGTGATGGTGGATGCGGTGCACAAGCTCA AGTATGAAAATTACACATCATCTTTTTTCATCAGAGACATTAT AAAGCCCGACCCACCAAAGAACCTCCAGTTAAAGCCCTTAAA** GAACAGTAGACAGGTTGAAGTATCATGGGAATACCCAGACAC **CTGGTCCACACCCCATTCGTATTTTTCCTTGACGTTTTGCGTA** <u>CAAGTTCAGGGAAAGTCCAAACGGGAAAAGAAGACCGCGT</u> **CGCATCAATTAGCGTGCGAGCGCAAGACAGATACTATTCAAG TAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGTGTTCCATGTTCT** GGGCGGAGGGTCCGGCGGTGGTAGCGGAGGCGGGAGCAGGAACTTGCCCGTGGCTACTCCAGACCCTGGCATGTTCCCCTGTTTAC ACCACTCCCAGAACTTATTACGTGCTGTTAGCAACATGTTGC AAAAGGCCCGTCAAACCCTCGAGTTTTACCCCTGTACTAGTG ACAGTTGAGGCATGCTTACCCCTGGAGTTAACAAAGAACGAG AGCTGTCTGAACTCTCGAGAGACGAGCTTCATCACCAATGGG AGTTGCCTTGCTTCTCGAAAAACGTCGTTCATGATGGCCCTG TGCCTGTCGTCTATCTATGAGGATCTGAAAATGTATCAGGTT GAATTCAAGACAATGAATGCCAAACTACTCATGGATCCAAAA CGGCAGATATTCCTCGATCAGAATATGCTCGCAGTTATTGAC GAACTAATGCAGGCTCTGAATTTTAACAGCGAGACCGTTCCT CAGAAGTCAAGTTTGGAAGAACCTGACTTCTACAAAACTAAA ATAAAATTATGCATCTTACTGCATGCTTTCAGAATTAGAGCT ${\bf GTCACTATTGATCGAGTGATGTCATACTTGAATGCTTCC} {\it GAT}$ <u>CAGGAGGTGGGAGCgacgcgcacaaaagcgaggtagcgcatcgctttaaagacttaggagag</u> gaaaactttaaggcgctggtgctcatcgcatttgcccaatacttacagcagtgtccttttgaggaccacgtaaa gcttgtaaacgaagtcactgaattcgccaagacatgtgttgctgacgaaagcgcagagaactgtgacaaaa gccttcataccctctttggtgacaaactctgcaccgtggcaactctaagagaaacctacggggaaatggcag $\underline{actgctgcgcaaagcaggaacccgaacgcaatgagtgtttcctgcagcacaaggatgataatcccaatctg}$ atatctgtatgagatcgcaaggcgcaccettacttctacgcacccgaactgttgtttttcgcaaagaggtata <u>aggccgcatttaccgagtgttgtcaggccgctgataaagccgcctgtcttttgccaaaattagatgaactaag</u> ggacgaaggcaaagcgagtagcgccaaacaaagattaaaatgtgcaagcctccaaaaattcggtgaaag $\underline{agcatttaaggcgtgggctgtcgcccgactttcacaacgcttccccaaagctgaattcgctgaggtttcgaaggcgagttcgcaaggcgaattcgctgaggtttcgaaggcgaaggcgaggtttcgaaggcgaggtttcgaaggcgaggtttcgaaggcgaggtttcgaaggcgaaggcgaaggcgaaggcgaggtttcgaaggcgaaggcgaaggcgaggtttcgaaggcgaggtttcgaaggcaaggcgaaggcaaggcgaaggcgaaggcgaaggcaaggcgaaggcgaaggcgaaggcgaaggcaag$ $\underline{ctggttaccgacctaactaaagtgcatacagagtgctgtcatggggatctcttagagtgcgcggatgaccgg}$ gcagacctggctaagtacatatgtgagaaccaggacagtatatcatcaaagctgaaagagtgttgtgagaa gccgctgactttgtagagagcaaggatgtctgtaagaactacgctgaggccaaggatgtctttttggggatgt teetetatgagtaegeeegaegaeaeeetgaetatagtgtagtaettttgettagaetggetaaaaeatatgag $\underline{acgactctcgaaaagtgctgtgccgctgccgatccacacgagtgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcagtgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcaggtgctacgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttgatgagtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttgatgaggtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgtttaagcaggtgctacgctaaggtgctaaggtgctacgctaaggtaaggta$ cgctggtggaggaaccccagaacctgatcaagcagaactgtgaactattcgagcaactaggggagtacaa $\underline{attccagaacgcacttttagtgcggtacaccaaaaaagtgccacaggtcagtacaccaacattagtggaagt}$ atccaggaacctgggcaaagtgggcagcaaatgctgcaaacatccggaggctaagcggatgccctgtgc gacca agt get gac gag t cact gg taa at c gac gac c gt gt ttt t c ag cact ag aa gt t gat gaa act tatgtaccgaaagagtttaacgcagagacctttacattccacgccgacatctgcacgctgtccgagaaggaaag acagattaaaaagcagactgccctagtcgagcttgtcaaacacaaaccgaaggcaaccaaggaacagtta $\underline{aaagcagtgatgattttgctgcgttcgtcgaaaaatgttgcaaagcggacgacaaggagacttgcttc}$ gcagaggaaggaagaaattggttgcggcgtcccaagcggccttagggctatag

L3 конструкция (SEQ ID NO: 3) - включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 28), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 53), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 78), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 103), (5) второй линкер GS (указано курсивом

и подчеркнуто, SEQ ID

atgagagttcctgctcaactactagggctgctgttgttgtggttgcccggcgcgcgatgcgcaATATG **GGAGCTCAAGAAGGACGTTTATGTCGTTGAGCTGGATTGGTA** <u>CCCTGATGCCCCGGGCGAAATGGTTGTGCTTACGTGCGATAC</u> <u>CCCCGAGGAGGATGGCATAACATGGACGTTAGATCAGTCTTC</u> CGAGGTCCTTGGTTCCGGTAAGACTCTTACTATCCAGGTGAA **GGAGTTCGGCGATGCCGGCCAGTACACTTGCCATAAAGGCG GTGAAGTTCTAAGCCACTCTCTACTGCTTTTGCACAAGAAGG** AAGATGGAATATGGTCCACCGACATCTTGAAGGACCAGAAAG <u>AACCAAAAATAAGACATTTTTGAGGTGTGAGGCAAAAAATT</u> **ATTCGGGACGCTTCACCTGCTGGTGGTTGACGACGATTTCAA** CCGACCTCACCTTCTCAGTAAAGAGTTCGAGAGGTAGTTCCG ATCCCCAAGGTGTGACATGTGGCGCTGCGACTCTAAGCGCTG **AACGCGTAAGAGGTGATAACAAAGAGTACGAATACAGTGTG** <u>GAATGCCAAGAAGATAGCGCGTGTCCAGCCGCAGAAGAATC</u> **TTTACCAATAGAGGTTATGGTTGATGCCGTTCACAAATTGAA** ATATGAGAATTACACCTCAAGCTTTTTCATTCGAGACATAATA **AAGCCCGACCCTCCTAAGAATCTTCAGTTAAAACCGCTGAAG** <u>AACAGTAGACAAGTTGAGGTTAGCTGGGAATATCCTGATACC</u> TGGTCAACGCCGCACTCGTATTTCTCCCTGACTTTCTGTGTT

NO: 128), и (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 149)

CAGGTTCAAGGAAAATCTAAAAGGGAGAAGAAGACCGTGT **TTTCACCGACAAGACATCTGCCACAGTCATATGTAGGAAGAA** CGCTTCAATCAGCGTGCGAGCGCAGGACCGATACTACAGCTC **TAGTTGGTCCGAATGGGCCAGCGTACCATGCTCT** CTTCCTGTCGCGACCCCTGATCCCGGCATGTTTCCTTGCCTG CACCACAGTCAGAACTTATTACGCGCCGTTTCCAATATGTTA CAGAAGGCCAGACAGACATTAGAGTTTTATCCTTGCACATCG GAGGAGATCGACCATGAAGATATCACAAAAGATAAAACATCC ACCGTTGAGGCCTGCCTGCCACTTGAACTTACTAAAAACGAG AGCTGCCTGAATAGCCGGGAAACTTCTTTCATCACTAATGGA TCGTGTCTAGCAAGCCGAAAAACCAGCTTCATGATGGCTTTG TGCCTCTCGTCCATCTATGAAGACCTGAAAATGTATCAAGTA GAATTTAAAACGATGAATGCCAAACTGCTTATGGATCCCAAA CGCCAGATATTTCTAGACCAGAATATGCTGGCCGTCATTGAT GAGCTAATGCAGGCTCTCAATTTTAATAGCGAAACAGTGCCC CAAAAAGCTCTTTGGAAGAGCCGGATTTTTACAAAACCAAG ATTAAGCTATGTATCCTGCTGCATGCTTTCAGAATTCGAGCT GTTACAATTGATCGGGTTATGAGCTACTTAAACGCCTCG*GGT* AGTGGCGGGGGAGCgacgcccacaagtctgaagtggcacaccggttcaaggacctcggg gaggagaattttaaagccctcgtgctgatcgctttcgcgcagtacttgcagcagtgcccttttgaggaccatgtcaaattagtaaacgaagtgacggaattcgcaaagacttgcgtagcggatgagtcagcagagaattgcgaca $\underline{agtcgctacacactctgttcggggataagttgtgcacagttgctaccttacgagagacctatggagagatgg}$ $\underline{ctgactgctgcgccaaacaagagcctgaaagaaacgagtgcttcttacaacacaaagacgataacccgaat}\\$ $\underline{ttgccaaggcttgtaagacccgaagtagatgttatgtgcacagcttttcacgacaacgaggagacgttcctta}\\$ agaaatatetgtatgaaatageeegteggeaeeeetatttttatgeteeegaactattgttettegeeaaaegat $\underline{tacggacgaaggtaaggcgagctccgcaaaacagcggttgaaatgcgcgtcactacagaagtttgggg}$ a a agage gtt caa aget t g g c t g t g g cae g at t g ag c caa e g e t t c c caa age ag g t t t g e g a ag t t t g e g ag t t t g e g a ag tcgaaactcgtgacagacttaacaaaggttcacaccgagtgctgtcacggcgatctgctcgaatgcgctgatg $\underline{accgcgctgacttggctaaatacatttgtgagaaccaggactctatatcgagcaaactcaaggaatgctgcg}$ aaaagcccctgcttgagaagtcccactgcatcgctgaggtagagaatgatgagatgcctgcggatcttccg $\underline{agtttagcagctgatttcgtcgagagcaaaagatgtgtgcaaaaattatgccgaagcaaaagacgtatttcttg}$ ggatgttcttatacgagtatgcacggcgccacccagattactccgtagtgctactgttaagattggcgaagacctatgaaaccacattggaaaagtgctgcgccgccgccgaccccacgagtgttacgcgaaggtgttcgatg aatttaaaccgcttgttgaggagccgcaaaacctaataaagcaaaactgtgagctctttgagcaactaggtga $\underline{atacaagtttcagaatgcactcctagttcggtacaccaaaaaagtacctcaggtatctacgccaacgttagtc}$ gaggtetegeggaatttgggtaaagtaggtteeaagtgttgeaaacaceeggaagetaaacgtatgeegtgt

getgaggactateteagegttgtgttaaaceaactttgegtacteeaegagaaaacacetgteteagateggg
taaceaaatgetgeaeggagtegetagtaaategtegeceatgettttetgegttagaggtggaegaaacttat
gtacegaaagaatttaaegeggaaacetttacatteeatgeagatatetgtacactgteegagaaagagag
cagattaagaaacagaeggegetggtggagettgtgaagcacaagcetaaagctacgaaggagaaacatg
aaggeagteatggatgactttgeggegtttgtggagaagtgetgtaaageggaegataaggaaacatgette
geagaagaaggaaggaaagagetggtegeegetageeaageggetetgggeetgtag

М1 конструкция (SEQ ID NO: 4) - включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 29), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 54), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 79), IL-12α **(4)** (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 104), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 129), (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 150)

GAGCTGAAAAAGGACGTGTACGTGGTGGAACTTGACTGGTA <u>CCCCGACGCCCCGGCGAGATGGTGGTACTGACCTGCGACA</u> CTCCCGAGGAAGACGGCATTACCTGGACCTTGGACCAGAGC <u>AGCGAGGTTCTGGGCTCCGGAAAAACCTTGACAATCCAAGTG</u> <u>AAAGAATTCGGCGACGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAGGG</u> CGGCGAGGTGCTGTCCCACAGCCTGCTGCTGCTGCATAAGA AAGAAGACGGGATTTGGAGCACCGATATACTGAAGGATCAG <u>AAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGGTGCGAGGCCAA</u> **AAATTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCACCAT TAGCACAGACCTGACTTTCAGCGTAAAGTCTTCAAGGGGCAG** <u>CTCAGACCCCAGGGAGTAACTTGCGGAGCGGCAACGTTGT</u> <u>CTGCCGAGCGGTCAGAGGCGACAATAAGGAGTACGAGTAT</u> **TCAGTAGAGTGTCAGGAAGATAGCGCCTGTCCCGCCGCGGA** GGAGAGCCTCCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCACA <u>AGTTAAAGTACGAGAATTACACCAGCTCATTTTTTATCAGAG</u> <u>ACATTATCAAGCCGGACCCCCCGAAGAACTTACAGCTTAAAC</u> **CCCTAAAGAACAGCAGGCAGGTTGAGGTCAGCTGGGAATAT CCTGACACCTGGTCAACCCCCCACAGCTACTTCTCCCTTACT TTCTGTGTGCAAGTGCAGGGCAAGAGCAAGAGAAAAGAA** GGACCGGGTGTTTACCGACAAGACTAGCGCCACCGTGATTTG <u>CAGAAAGAACGCCAGCATTAGTGTGAGAGCCCAGGACAGGT</u> **ATTACTCCAGCTCATGGTCTGAGTGGGCTAGTGTGCCTTGCT** AGCCGGAATCTGCCTGTCGCCACTCCAGACCCCGGCATGTTC CCATGTCTGCATCATTCTCAGAACCTGCTGAGGGCCGTATCC AATATGCTGCAGAAAGCCAGACAGACCTTAGAGTTCTATCCC TGTACAAGCGAGGATAGATCACGAGGATATTACGAAGGA CAAAACTTCTACTGTTGAGGCGTGTCTTCCATTAGAGCTGAC CAAGAACGAAAGCTGTCTGAATAGCAGAGAGACTTCATTTAT CACCAATGGGAGTTGCTTGGCTAGCAGAAAGACCAGCTTCAT GATGGCCCTTTGCTTGTCTTCGATATACGAAGATCTTAAGAT

GGATCCCAAGCGCCAAATCTTCCTGGATCAGAACATGTTGGC CGTGATTGACGAGCTGATGCAAGCCCTGAATTTCAACTCCGA GACCGTGCCTCAGAAGAGCAGCCTCGAGGAGCCCGACTTCT ACAAAACAAAGATCAAACTCTGCATCCTTCTGCACGCCTTCA GAATTAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTTATGAGCTACCTGA **ATGCCAGC***GGCAGCGGCGGATCC*gatgcccataaatctgaggtggcccatag $\underline{attcaaggatctgggcgaagaaaacttcaaagccttggtcttgatcgcctttgcccagtacctgcagcagtgc}$ <u>cgccgaaaactgcgacaaaagcctgcacaccctgtttggcgacaagctgtgcaccgtagccaccctgaga</u> gaaacttacggcgagatggctgactgctgcgccaagcaggagcccgagagaaacgagtgctttctgcagc $\underline{acaaggacgacaatcccaacctgcccagactggtgagacccgaagtggatgttatgtgcaccgctttccac}$ gacaatgaagagacatttctcaagaagtacttgtacgagattgcaagaagacacccttacttttacgccccg $\underline{aattactgttcttcgctaagaggtataaggcagccttcactgaatgctgccaggctgccgacaaagcagcttg}$ gccagccttcagaagtttggcgagcgggccttcaaggcatgggccgtggctcgacttagccagcgttttcc caaggctgaatttgcagaggtgagtaaactggttaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtcacg gtgacctcttagagtgcgccgacgacagagccgacctcgccaagtacatttgtgaaaaccaagactcaatct $\underline{cttcaaagttaaaggagtgctgcgaaaagcccctgcttgaaaagagccactgcattgccgaagtcgagaat}\\$ gatgagatgcctgcagacttgcccagcttggcagccgacttcgttgagtctaaggacgtgtgcaagaattacgccgaggcaaaagacgtgttcctgggcatgttcctttatgagtacgctagaagacatcccgactacagcgtg gtcetteteettaggetegetaagaettaegagaeggttggagaagtgttgtgeegetgeggaeeeeeae gagtgctatgccaaagtgttcgatgagtttaaacccctggtggaggaacctcagaaccttatcaagcagaatt gtgagttgttcgaacagctaggcgagtacaagttccagaatgccctgctggtgagatacacaaaaaaggtg $\underline{cccaggtgtcaaccccgaccttagtggaagtgtccagaaacctgggcaaggtgggcagcaagtgctgca}$ agcaccccgaagctaagagaatgccgtgcgcggaggattacctgagcgtggtgctcaaccagctgtgtg getteaegagaaaacaccegtgagegacagggtgacaaaatgttgcacagaaagcettgtgaaccggaga $\underline{ccttgtttcagcgccctggaggttgacgagacctatgttcctaaggagttcaacgctgagactttcacatttca}\\$ $\underline{cgctgatatatgtaccctgagcgagaaagaaagaaagacagatcaagaagcagaccgccctggtcgagctggtg}$ aaacacaagcctaaggccacgaaggagcagctgaaggccgtcatggacgacttcgcagccttcgtcgag aaatgctgcaaagccgacgacaaggaaacctgcttcgccgaagagggaaagaagctggtggccgcctcc caggccgcccttgggctctag

GTATCAAGTGGAATTTAAGACGATGAACGCCAAGCTGCTTAT

М2 конструкция (SEQ ID NO: 5) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO:

atgagagtccccgcccagctgctagggctgctgctgctgtggttacccggcgcccggtgtgcaATTTG

GGAGTTGAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGGT

ACCCGGATGCTCCCGGCGAGATGGTGGTACTCACCTGCGAC

ACACCTGAGGAAGACGGCATCACCTGGACCCTCGATCAGAG

CAGCGAGGTTCTGGGAAGCGGCAAAACCCTGACCATCCAAG

TGAAAGAGTTTGGCGACGCCGGTCAGTACACCTGCCACAAG

30), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 55), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 80), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 105), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 130), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEO ID NO: 151)

GGAGGCGAGGTCCTGTCTCACTCTCTGCTGCTGCTCCATAAG **AAGGAGGACGGTATTTGGAGCACTGACATCTTGAAGGATCAA** <u>AAAGAGCCAAAGAATAAAACGTTCCTGAGGTGCGAAGCTAA</u> <u>GAATTACTCCGGGCGTTTTACGTGCTGGTGGCTGACCACGAT</u> <u>CAGCACCGATCTGACCTTCAGCGTGAAGAGCAGCCGGGGCA</u> <u>GCAGCGACCCCAAGGCGTGACTTGCGGCGCTGCGACCCTG</u> <u>AGCGCTGAGCGTGTGCGCGGCGACAACAAGGAGTATGAGTA</u> **TTCAGTGGAGTGTCAGGAGGACTCCGCCTGTCCCGCGGCCG AAGAGAGTCTGCCTATTGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCAC** <u>AAGCTGAAGTACGAGAACTACACATCGTCATTCTTTATCCGC</u> **GACATCATAAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTGAAG CCTCTCAAGAATTCCCGGCAAGTGGAGGTGAGCTGGGAGTA** CCCTGATACCTGGTCTACCCCTCACAGCTACTTTAGCCTGAC **CTTCTGCGTCCAGGTGCAAGGAAAGTCGAAGCGCGAGAAGA** <u>AAGATAGAGTCTTCACCGATAAAACCAGTGCCACCGTGATTT</u> **GCCGCAAAAACGCCTCCATCAGCGTGCGGGCTCAGGATAGA** TACTACTCTAGCAGCTGGAGCGAATGGGCCTCAGTTCCTTGC <u>AGC</u>GGCGGCAGCGGTGGAGGAAGCGGCGGTGGCAGTGGGGGCGG GAGCAGAAATCTGCCCGTCGCCACTCCAGATCCTGGCATGTTCCCGTGCCTGCATCACAGCCAAAACCTGCTGCGGGCGGTGT CTAACATGCTGCAGAAGGCTAGGCAGACCTTGGAATTCTATC CCTGCACAAGCGAGGAAATAGACCATGAGGACATCACCAAG GATAAGACCAGCACGGTCGAAGCTTGCCTGCCACTGGAACT GACAAAAACGAGAGTTGCCTGAACTCCCGCGAGACATCCTT CATCACAAACGGCAGCTGCCTGGCTAGCAGGAAGACCAGCT TCATGATGGCCCTGTCCTGTCTTCCATCTACGAGGACCTGA AAATGTACCAAGTGGAGTTCAAGACTATGAACGCCAAGCTGC TAATGGATCCCAAGCGACAGATCTTTCTAGACCAGAACATGC TGGCCGTCATTGACGAGCTGATGCAGGCACTCAATTTTAACT CAGAGACCGTGCCACAGAAGTCCAGCCTGGAGGAGCCTGAC TTCTATAAGACCAAGATTAAGCTGTGCATCCTGCTGCATGCC TTCCGAATAAGAGCCGTGACCATTGACCGAGTGATGTCATAC TTGAACGCAAGCGGCTCAGGCGGAGGGAGTgacgcccacaagtctgaagtgg ctcaccggtttaaggaccttggcgaggagaactttaaagccctggtgctgattgcctttgcccagtatttacaa $\underline{caatgccctttcgaagaccacgtgaagctcgtcaatgaggtcaccgagttcgctaagacctgcgtagccga}$ cgaaagtgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggggacaaactctgtaccgtggccacc $\underline{ctacggagacatatggggagatggccgactgctgcgcaaaacaggagcccgagagaaatgagtgcttc}\\$ ctgcagcacaaggatgacaaccccaatctgcccagactggtgcgccccgaggtagacgttatgtgcaccg

 $\underline{ccttccatgacaatgaggagacgttcctgaagaaatacctgtacgagatcgcaagacgtcacccctatttcta}$ $\underline{tgcacctgagctgcttttcttcgccaagagatataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgcttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgcttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgcttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggcagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggccgataaggccgccagccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggccgataaggccgccgataaggccgccttcaccgaatgctgccaggccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccgataaggccgccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccaggccgataaggccgccagccgataaggccgccagccgataaggccgccagaatgccgataaggccgccagaatgccgccagaatgccgcagaatgccgccagaatgccgataaggccgccagaatgccgcagaatgccgcagaatgccgataaggccgccagaatgccgataaggccgcagaatgccgataaggccgccagaatgccgataaggccgccagaatgccgcagaatgccgataaggccgccagaatgccgataaggccgcaatgccgataaggccgccagaatgccgataaggccgccagaatgccgataaggccgcagaatgccgataaggccgcaatgcagaatgccgataaggccgcaatgcagaatg$ ggcagcttgcctcctgccaaagctggacgagctgagagatgagggcaaggcctccagcgcgaagcaga gactcaaatgcgcaagccttcagaagttcggagaacgcgcctttaaagcctgggccgtcgccagactgag ccagcgcttccctaaagccgaattcgcagaagtgagcaagctggtaacggacctgacaaaggtgcatact gagtgctgccatggcgatctgctggagtgcgctgatgacagagcagatttggcgaaatatatttgcgaaaat caggatagcatcagctctaagctcaaggagtgttgtgagaagcccctgctggaaaaaagccactgcattgc agaggttgagaacgatgaaatgccagccgaccttccatcattggccgccgatttcgtggagtcgaaggatgt gtgtaagaactacgccgaggccaaggacgtgttcctgggcatgttcctgtacgagtatgctagaagacatcc cgattacagtgtggtgctgctattgagactggccaagacctacgaaaccaccctggagaaatgttgcgccg <u>cggcagatcctcacgaatgttacgccaaagtgtttgacgaattcaagccactggtagaggagccccagaac</u> $\underline{ttaataaagcagaattgcgagctattcgagcagttgggcgagtacaaattccagaacgcccttctggtgaggt}$ ataccaaaaaggtgccccaggtgtctacccctaccctggtggaggtcagccgaaatctgggaaaggtcgg atccaagtgctgcaagcacccggaggccaagaggatgccttgcgctgaggactatctcagtgtcgtcctga gtgaatcggaggccctgtttctctgcactggaagttgacgagacttacgtcccgaaggaattcaacgccgag acattcaccttccatgctgacatatgtactctgtcagaaaaggagcgtcagatcaagaagcagacagccctg gtggaactggttaagcataagcctaaagcgaccaaagagcagctgaaagccgtgatggacgattttgccgc $\underline{cttcgtggagaaatgttgtaaggcagacgacaaagagacatgtttcgccgaagaggggaagaaactggtg}\\$ gccgcaagccaggccgctctgggtctgtag

М3 конструкция (SEQ ID NO: 6) – включает (1) лидерную последовательность строчными (указано буквами, SEQ ID NO: IL-12β 31), **(2)** (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 56), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 81), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 106), (5) второй линкер

GS (указано курсивом

 $at gag a g t c c a g c t g e t g g g c c t a c t g c t g e t a t g g c t c c c g g e g e g g t g e g c \underline{ATTT}$ **GGGAGCTCAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAACTTGACTGG** <u>TACCCGGACGCCCCGGGGAAATGGTGGTGCTAACCTGTGA</u> CACCCCGAAGAGGACGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGA **GCAGTGAGGTGCTAGGTAGTGGCAAAACGTTAACCATCCAG GTCAAGGAGTTCGGCGACGCCGGGCAATACACCTGTCACAA** GGGGGGGGGGTACTATCCCACTCCCTGCTGCTCCTGCACA <u>AGAAAGAGGACGGGATCTGGAGCACCGACATTCTGAAAGAC</u> CAAAAGGAGCCCAAAAACAAAACCTTCCTTAGATGTGAAGCC AAGAACTACAGCGGCCGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACCACC ATATCTACGGACCTTACCTTTTCGGTGAAGAGCAGCAGGGGG AGTTCCGACCCGCAAGGCGTAACTTGCGGAGCCGCAACCCT <u>GAGCGCCGAGAGAGTGCGCGGCGACAACAAGGAGTACGAGT</u> <u>ATAGCGTGGAGTGCCAAGAGGACAGCGCATGCCCAGCCGCC</u> GAAGAGACCTGCCAATAGAGGTCATGGTAGACGCCGTGCA CAAGCTAAAATATGAAAACTACACCAGCAGCTTTTTCATCAG **GGATATCATCAAACCCGACCCACCAAAAAACTTACAGCTTAA** GCCTCTGAAAAACAGCAGACAAGTTGAGGTCAGCTGGGAGT

и подчеркнуто, SEQ ID NO: 131), и (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 152)

ACCCCGACACTTGGAGCACACCCCACTCCTATTTCAGTTTGA **CATTCTGCGTGCAGGTGCAGGGTAAAAGCAAGAGAAAAG AAGGACAGAGTGTTCACAGATAAGACCTCAGCCACAGTGATC** TGCCGTAAGAATGCCAGCATCAGCGTCCGGGCTCAGGACAG GTACTACTCTCATGGAGCGAGTGGGCCTCTGTCCCCTG GTTCAAGAAACCTCCCAGTCGCTACCCCGATCCCGGAATGTT CCCCTGCCTGCACCACTCCCAGAATCTGCTCCGAGCCGTTAG CAACATGCTGCAAAAGGCCCGGCAGACCCTGGAGTTCTACCC ATGCACCTCGGAAGAAATCGATCACGAGGACATCACCAAGG ACAAGACTAGCACCGTCGAGGCCTGCCTGCCGCTGGAACTA ACCAAGAATGAAAGCTGCCTCAACTCGCGGGAGACCTCTTTC ATAACCAACGGCTCATGCCTGGCCAGCCGGAAAACTAGCTTT ATGATGGCTCTGTGCTTAAGCAGCATCTACGAGGATCTGAAG ATGTACCAGGTAGAGTTCAAGACCATGAATGCCAAGCTGCTG ATGGACCCCAAGAGACAAATCTTCCTGGACCAGAACATGCTG GCCGTAATTGATGAACTGATGCAGGCCCTGAATTTCAACAGC GAGACCGTACCCCAGAAAAGCTCACTGGAGGAGCCCGACTT TTATAAGACGAAAATAAAGTTGTGCATCCTTCTTCACGCTTTC CGGATTAGAGCCGTGACCATCGATAGAGTGATGTCATACCTG **AACGCATCG**GGGAGTGGCGGTGGCAGCgatgcccacaaaagcgaagtcgcaca cagattcaaggacttgggtgaggagaactttaaagccctggtgctgatcgccttcgcgcagtatctccagca gtgccccttcgaagatcatgtgaaactggtgaacgaggtaaccgagttcgcgaagacatgcgttgctgatga gagcgccgaaaattgcgacaaaagcctgcatactctgttcggggacaagctgtgcacggtcgcaaccctg agagaaacctacggcgagatggcagactgctgcgccaagcaggagcctgagaggaacgagtgttttctg cagcacaaggacgataatcctaaccttcctcgtctagtgagaccgaagtggacgttatgtgtaccgcctttc $\underline{acgacaatgaggaaacattcctgaaaaagtacctgtacgagatcgccagacggcacccatatttctacgcc}$ $\underline{cccgagctgctcttcttcgcaaagaggtacaaggctgccttcaccgagtgctgccaggcggccgacaagg}$ cggcgtgtttgctgcctaagctggacgaactacgtgacgaaggaaaagctagcagcgccaagcagagact taagtgcgcgtccttacagaagtttggcgaaagagcgtttaaggcctgggccgtggcaaggctgtctcaaa gattccccaaggcggagttcgccgaggtgtcaaaactggtgaccgacttaaccaaggtgcacaccgaatg ctgccacggcgatctgctcgagtgcgccgacgacagagccgatctggcaaaatacatctgcgaaaaccag gatagcatcagctccaaactgaaggagtgctgtgaaaaaccactgcttgaaaaaatcgcattgtatagcggag gtggagaatgacgagatgcccgccgacctgccaagcctggccgccgatttcgttgaatccaaggacgtttg caagaactatgcagaagcgaaggacgtgttcttaggaatgttcctatacgagtacgcgagaagacatcccg actacagcgtggttctgctgttgagattagccaagacgtatgagacaaccctcgaaaagtgctgcgccgcc $\underline{gccgaccccacgagtgttacgcaaaaggtgttcgatgagtttaaaccgctggttgaggaaccgcaaaacct}\\$ gatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctggtgaatacaagtttcagaatgcactgttggtgcgata

H1 конструкция (SEQ ID NO: 7) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 32), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 57), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 82), **(4)** IL-12 α (выделено минциж шрифтом, SEQ ID NO: 107), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 132), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 153)

 $atgagagtgcccgcccagttgcttggcctgctgctcctatggcttcccggcgccagatgcgcc \underline{ATCTG}$ **GGAGCTGAAGAAGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGGT** <u>ACCCCGACGCCCCCGGTGAAATGGTGGTTCTGACCTGCGAC</u> <u>ACACCAGAGGAGGACGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGTC</u> CAGCGAGGTCCTGGGCTCTGGCAAGACCCTGACCATCCAGG TTAAGGAATTTGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAAAG <u>GCGGCGAGGTCCTTTCGCACAGTCTGCTGCTGCTGCATAAAA</u> **AGGAGGACGCATTTGGAGCACCGACATTCTGAAGGATCAG AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTTCTGAGATGTGAGGCCAAA** <u>AACTACTCTGGACGCTTCACCTGTTGGTGGCTGACCACCATC</u> <u>AGCACAGACCTGACCTTCTCGGTGAAGTCTAGTAGGGGCAG</u> CAGTGACCCCCAGGGCGTAACATGCGGCGCCGCTACCCTGA GCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGATAACAAGGAGTACGAGTAC **TCCGTGGAGTGCCAAGAGGACTCAGCCTGCCCGCCGCCGA GGAGTCGCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCAGTGCACA AGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGTAGCTTTTTCATCAGAG** <u>ATATCATTAAACCCGACCCTCCCAAGAACCTGCAGCTGAAGC</u> **CCTTAAAGAACAGCCGGCAGGTGGAAGTGTCATGGGAGTAC** CCAGACACCTGGAGCACTCCGCACAGCTACTTCAGCCTGACC **TTCTGCGTTCAGGTGCAGGGAAAAAGCAAGAGAGAGAA** <u>AGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCAACCGTGATCT</u> **GTAGAAAGAACGCCTCGATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAGA** TACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGTGTACCTTG GCAGCAGAAATCTGCCCGTAGCCACCCCGACCCCGGCATGT TTCCCTGTCTGCACCATTCTCAAAACCTGTTACGGGCCGTGA GCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACACTGGAGTTTTACC CCTGTACCTCAGAGGAGATCGATCATGAGGACATTACTAAGG ACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCCCTAGAGCTA ACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACTCTAGAGAGACAAGCTTC

ATCACGAACGCTCATGCCTGGCCAGTAGGAAAACCAGCTTC ATGATGGCTCTGTGCCTGAGCTCCATATATGAGGACCTTAAG ATGTACCAGGTGGAGTTCAAAACCATGAACGCCAAGCTGCTG ATGGACCCAAAGAGACAGATCTTCCTTGACCAGAACATGCTG GCCGTTATCGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGC GAGACCGTGCCCCAGAAGAGCAGCCTGGAGGAACCCGACTT CTACAAAACCAAGATCAAGCTGTGCATTCTGCTGCATGCCTT CCGCATTAGAGCCGTGACCATCGATAGGGTGATGAGCTACCT **GAACGCCAGC**GGCTCTGGCGGCGGCAGTgacgcccacaagtccgaggtcgcc $\underline{cacagattcaaggatttgggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgccttcgcccagtacttgcag}$ $\underline{cagtgtcccttcgaggaccatgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgtgtggccga}\\$ cgagagcgccgagaactgcgataagtctctgcacaccctttttggcgacaaactgtgcaccgtggccaccc tgagagagacctacggcgagatggccgactgctgtgcgaagcaggagcccgagcgcaatgagtgtttcct gcagcataaggacgacaaccccaacctgcccagactggtgagacccgaggtggacgtgatgtgcaccgc $\underline{cttccacgacaacgaggagacctttctgaaaaaatacctgtacgagatcgcaagacgccacccctacttcta}\\$ cgccccgagctgctgttcttcgccaagcgctacaaggctgccttcaccgagtgctgccaggccgccgata agattgaagtgtgccagcctgcagaaattcggtgagagagccttcaaggcctgggccgtggccagattatc $\underline{a cag cggttccccaag gctgaat tcgccgag gtgagcaaacttgtcaccgatctgacaaaagtgcacaccg}$ $\underline{agtgctgccatggcgacctgctggagtgcgccgacctggccaagtacatctgcgaga}$ $\underline{accaggacagcatctccagcaagctgaaggagtgctgcgagaagcccctgctggagaagagccactgca}$ tegecgaggtggagaatgacgaaatgceggcgacetgccagcetggcggcgacttegtggaaagca <u>aggacgtgtgcaaaaattacgccgaagccaaggatgtgttcttgggcatgttcttgtacgagtacgccagac</u> $\underline{gccaccccgactacagcgtggtgctgctgctgctgctgctgccaagacctacgagaaccaccctggagaagt}$ $\underline{gctgtgctgccgccgacccccacgagtgctacgccaaggtatttgacgagttcaagccctggtggagga}\\$ gcctcagaacctgattaagcagaactgtgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccc tcctggtgagatacaccaaaaaggtgcctcaggtaagcactcccacctggtggaggtgagcaggaacct cggcaaggtgggcagcaaatgctgcaagcacccagaggccaaaagaatgccctgcgcagaagactacc t cag cg tg g t c ct g a a c cag ct g t g c t g ca c g a a a a g a c c c t g t g a g c g a t a g a g t g a c a a a g t g c g a c a a g t g a c a a a g a c c c t g t g a g a c a a a g a c c c t g t g a g a c a a a g a c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a g a c c c c t g t g a c a a a a g a c c c c t g t g a c a a a a g a c c c c t g t g a c a a a a g a c c c c t g t g a c a a a a g a c c c c t g t g a c a a a a a g a c c c c t g t g a c a a a a a g a c c c c t g t g a c a a a a a c c c c t g a c a a a a a c c c c t g a a c a a a a a c c c c t g a a c a a a a actgcaccgagagcctggtgaacagaagaccctgttttagcgccctggaggtggacgagacctacgtgccc $\underline{aaggagttcaacgccgagacgttcactttccacgcggacatctgcaccctgagcgagaaggagagacaaa}$ tcaagaagcagaccgccctagtcgagctggtaaaacacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaag gccgtgatggacgactttgcagccttcgtggagaagtgctgcaaggctgacgacaaggagacctgcttcgc cgaggagggcaagaagctcgtagccgccagccaggccgctctcggcctttag

H2 конструкция (SEQ ID NO: 8) – включает (1) лидерную последовательность

atgagagtgcccgcccagctgctgggcctgctgctcttatggctgcccggcgcccgctgtgct<u>ATTTG</u>

<u>GGAGCTGAAGAAGGACGTGTACGTGGAGCTGGATTGGT</u>

<u>ATCCAGACGCCCCGGCGAGATGGTCGTGTTGACCTGCGAT</u>

ACTCCCGAGGAGGACGGAATCACCTGGACACTTGACCAGAG

(указано строчными буквами, SEQ ID NO: 33), IL-12β **(2)** (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 58), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 83), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 108), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 133), (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 154)

CAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGGAAGACCCTGACTATCCAGG **TGAAGGAGTTTGGCGATGCCGGACAGTACACCTGCCACAAG GGCGGCGAGGTGTTATCTCATAGCCTGCTGCTGCTGCACAAA** <u>AAGGAGGACGGGATCTGGAGCACTGACATCCTGAAGGACCA</u> **GAAGGAGCCCAAAAACAAGACCTTCCTGCGTTGCGAGGCCA AGAACTACAGCGGGAGATTCACCTGTTGGTGGCTGACCACTA TCAGCACTGACCTAACCTTCAGCGTGAAGAGCAGCCGGGGA** <u>AGCTCTGACCCCCAGGGGGTGACATGCGGCGCCGCCACACT</u> GAGCGCCGAGAGGGTGAGAGGGGACAATAAGGAATACGAGT <u>ATAGCGTGGAGTGTCAGGAAGATTCCGCCTGCCCGCCGCC</u> **GAGGAGAGCCTGCCTATCGAGGTCATGGTGGACGCCGTCCA TAAACTGAAGTACGAAAACTATACTTCAAGCTTCTTCATCAG** AGACATCATAAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTAAA <u>GCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTCGAAGTGAGCTGGGAGT</u> <u>ACCCCGATACCTGGAGCACCCCGCACAGCTACTTCAGCCTGA</u> **CCTTTTGCGTCCAGGTGCAGGGCAAGAGAGAGAGAGAG** AAGGACAGGGTGTTCACTGACAAGACAAGCGCCACTGTTATC **TGCAGAAAGAACGCCAGTATCAGCGTGCGCGCCCAAGACAG GTATTACTCCAGCAGCTGGTCTGAATGGGCCAGCGTGCCTTG** GGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACACCCGATCCCGGCATG TTCCCCTGTCTGCACCACAGCCAAAACCTGCTGCGTGCCGTG AGCAACATGCTGCAGAAGGCGCGGCAGACCCTGGAGTTCTA TCCCTGCACCAGTGAGGAGATTGACCACGAGGATATCACCAA AGACAAGACCAGCACCGTGGAGGCCTGCCTCCCCCTGGAGC TGACCAAGAACGAGTCCTGCTTGAATTCAAGAGAGACCAGCT TCATCACCAACGCCTCCTGCTTAGCCAGCAGAAAGACTAGCT TCATGATGGCCTTGTGCTTGTCTAGCATCTATGAGGATCTGA AGATGTACCAGGTCGAGTTCAAGACTATGAACGCCAAGCTGC TGATGGACCCCAAAAGACAGATCTTCCTGGACCAGAACATGC TGGCCGTCATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTTAATTTCAATA GCGAGACAGTGCCCCAGAAATCTTCTCTGGAGGAGCCCGATT TTTACAAAACCAAGATCAAACTATGCATCCTGTTGCACGCCT TCCGGATCCGCGCCGTGACCATCGACAGAGTAATGTCCTACC TGAACGCCAGCGGCAGCGGCGGCGGTAGCgacgcccacaagagcgaagtgg cccatagattcaaggacctgggggggagaacttcaaggccctcgtgctgatcgccttcgcccagtacctg $\underline{cag cag t g c c c t t t c g ag g ac c a c g t t a a c t g g t g a a t g a g t t c g c c a a a a c c t g c g t g g c g a g t t c g c c a a a a c c t g c g t g g c g a g t c g c a a a a c c t g c g t g g c g a g t c g c a a a a c c t g c g t g g c g a g t c g c a a a a c c t g c g t g g c g a g t c g c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g t g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t g c g c c a a a a c c t$ cgacgagtctgccgaaaattgcgacaaaagcttacacaccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtggcca

cettaagagaaacctacggcgagatggccgactgctgcgctaagcaggagcccgagagaaacgaatgct $\underline{tcctgcagcacaaggacgataacccaaatctgcctagactggtgagacccgaggtggacgtgatgtgcac}$ $\underline{agcettccacgataacgaagagacattcctgaaaaagtacctgtacgagatcgccagaagacatccttactt}$ $\underline{ctatgccccgagcttctgttcttcgccaagagatataaggccgccttcaccgagtgctgccaagccgccga}$ agagactgaagtgcgcctcctgcagaagttcggcgagagagcctttaaggcctgggccgtggccagatt $\underline{acagaatgttgccatggcgatctcctggaatgcgccgatgacagggccgacctggccaagtacatctgtga}$ gaaccaggacagcatttcgagcaagctgaaggagtgctgcgagaaacccctgctggagaagtcccactg catcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccgacctgcccagcctggccgcagatttcgtggagag $\underline{caaggacgtatgcaagaactacgcagaggccaaggatgttcctgggcatgttcctgtacgaatacgcca}$ gaaggcaccccgactacagcgtcgtgctgttactgagactggccaagacctacgagacaaccttagagaa gtgctgcgcgcgcagacccgcacgagtgctacgccaaggtgttcgacgagttcaagcccctggtgga ggaacctcagaatctgattaagcagaattgtgagctgttcgagcagctgggagagtacaagttccagaacg cgctgctggtgagatataccaagaaggtgccccaggtgagcacccccaccctggtggaggtgagtcgcaa cctgggcaaggtggggagcaagtgttgcaagcatcccgaggccaaaagaatgccctgcgcagaggacta tctgagcgttgtgcttaaccagctgtgcgtgctgcacgagaagacccccgtgagcgacagagtgaccaagt gttgcaccgagagcctggtaaacagaagaccctgcttcagcgccctggaggtggacgagacctacgtgcc caaggagttcaacgccgagacctttaccttccacgcagacatttgcaccctgagcgagaaagagggcag atcaagaaacagaccgctctggtcgagcttgtgaagcacaagcccaaagctaccaaggagcagctgaag gccgtgatggatgatttcgccgccttcgtagagaaatgctgcaaggccgacgataaagagacctgctttgccgaggaggcaagaaactggtggccgccagccaggcggccctgggcctgtag

Н3 конструкция (SEQ ID NO: 9) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 34), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 59), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 84), (4) IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO:

atgagagtgcccgcccagctgctgggcctgctgttgctgtggctgcccggcgccagatgcgccATCT **GGGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTGGAGCTGGATTGG TACCCCGACGCCCCGGCGAGATGGTCGTGCTGACCTGTGA** CACCCTGAGGAGGACGGAATCACATGGACCCTGGACCAGA GCAGCGAAGTGTTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAA **GTGAAGGAATTCGGCGACGCGGGCCAGTATACTTGCCACAA GGGCGGGAGGTTCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTCCACA** AGAAAGAGGATGGCATCTGGTCTACCGACATCCTGAAGGAC CAAAAGGAGCCAAAGAACAAGACCTTCCTAAGATGCGAGGC CAAGAACTACTCAGGTCGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACCAC <u>AATCTCCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAGAGCAGCCGCG</u> GCAGTAGCGACCCACAGGGCGTGACCTGCGGGGCCGCCACT CTGAGCGCCGAGAGAGTGCGCGGCGATAATAAGGAATACGA **GTACAGCGTGGAGTGCCAGGAAGACTCAGCCTGCCCGCCG** <u>CAGAAGAAAGTCTGCCAATAGAGGTGATGGTTGACGCCGTG</u> CACAAGCTAAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTTATC

109), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 134), и (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 155)

CGGGACATCATCAAGCCAGATCCCCCCAAGAACCTGCAGCTT **AAGCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGTCATGGGA ATACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCATAGCTACTTCTCACT** AGAAGGATAGGGTATTCACGGACAAGACCTCAGCCACCGTG **ATCTGCCGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGA** CAGATACTATAGCTCCTCGTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTAC CGGGGGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACCCCGACCCCGG GATGTTTCCTTGCCTGCACCACTCCCAGAACCTCCTGAGAGC CGTGTCCAACATGCTGCAGAAAGCCAGACAGACCCTCGAGTT CTATCCCTGCACAAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATCA CTAAGGACAAGACCAGCACAGTGGAAGCCTGCCTCCCGCTG GAGCTGACTAAGAACGAGAGCTGTCTGAACAGCAGGGAGAC CAGCTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCGAGCAGAAAA CCTCCTTTATGATGGCGCTCTGCCTGAGCTCAATCTATGAGG ACCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTTAAAACCATGAATGCCA AGCTGCTTATGGACCCTAAGAGACAGATTTTCCTGGATCAGA ACATGCTGGCCGTGATTGATGAATTAATGCAGGCGCTGAACT TTAACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAGAGCAGCCTGGAGGAG CCCGACTTTTACAAGACCAAGATCAAGTTGTGCATCCTCCTG CACGCCTTCAGAATCAGAGCGGTGACGATCGACAGAGTCAT GAGCTACCTCAACGCTAGCGGCAGCGGTGGCGGCAGCgacgcccac aagagegaggtggcccacagattcaaggatcteggggaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgcct tegea cagtac et geage agtgeecette gaggae caegtaaa actggtgaa egaggtgae gagttegeagagttegeagagtgae gaggtgae gaggcaagacctgtgttgccgacgagtcggccgagaattgcgacaagagcctgcataccctgttcggcgacaag gagagaaacgagtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgccccggctggtgagacccga ggtggacgtgatgtgcaccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtatctgtacgagatcg ccagaagacaccettatttttacgccccgagetgctcttcttcgctaagagatataaggcagccttcaccga gtgttgtcaggccgctgataaggccgcttgcctgctgcccaagttggacgagctcagagacgaggcaag gcgagcagcgccaagcagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagggccttcaaggc gacctgaccaaggtgcacaccgagtgttgccacggcgacctgctggaatgcgccgatgaccgtgccgac $\underline{ctggccaagtacatctgcgagaatcaggactccatcagcagcaaactgaaggagtgttgcgagaagcccc}\\$ tgctggagaagagccattgcatcgctgaggtggaaaacgacgagatgcccgcagacctgcccagcctgg $\underline{ccg} caga cttt \underline{gtg} \underline{gaa} \underline{agta} \underline{agga} \underline{cgt} \underline{gtg} \underline{caa} \underline{gaa} \underline{ctac} \underline{gcg} \underline{aggc} \underline{caa} \underline{agac} \underline{gtg} \underline{tttct} \underline{ggcat} \underline{g}$ ttcctatacgagtatgccagaagacaccccgactacagcgttgtgttattgctgagactggccaagacctacg agactaccttggagaagtgctgcgccgccgccgccgaccccacagagtgctatgccaaggtgttcgacgagttc
aagcccctggtggaggagccccagaatctgattaagcagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagta
taagttccagaacgccctgctggtgagatacaccaaaaaggtacctcaggtgagcacccccaccctggtgg
aggtgagcagaaatctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcacccggaggccaagagaatgccc
tgtgccgaggattacctgtcagtggtgctgaaccagctgtgcgttctgcacgaaaagacgcccgtgtcgga
cagagtgaccaagtgctgcacggaggacctggtgaaccagaagaccgtgttcagcgcctagaggtgga
cgagacctacgtgcccaaggaggtcaacgcggagaccttcaccttcacgccgacatctgtaccctgtcag
agaaggagagaacagatcaagaagcagaccgccttagtggagctggtgaagcacaagcccaaggccacc
aaggagcagctgaaagccgtgatggacgatttcgcagccttcgtcgagaagtgctgcaaggccgacgaca
aggaaacttgcttcgccgaggagggcaagaagctggtggtgatgctgcaaggccgacgaca
aggaaacttgcttcgccgaggagggcaagaagctggtggtgatgctgcaaggccgcctgtag

CO конструкция (SEQ ID NO: 10) - включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 35). **(2)** IL-12B (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 60), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 85), **(4)** IL-12 α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 110), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 135), (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 156)

at gag a g t g c c c g c t g**GGGAGCTGAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGG** TACCCCGACGCCCCGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGA CACCCCGAGGAGGACGCATCACCTGGACCCTGGACCAGA <u>GCAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAG</u> **GTGAAGGAGTTCGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAA GGGCGGCGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACA** <u>AGAAGGAGGACGCATCTGGAGCACCGACATCCTGAAGGAC</u> <u>CAGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGC</u> CAAGAACTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCAC CATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAGAGCAGCAGAG <u>GCAGCAGCGACCCCCAGGGCGTGACCTGCGGCGCCGCCACC</u> **CTGAGCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGACAACAAGGAGTACGA GTACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCGCCG CCGAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTG** CACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATC AGAGACATCATCAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTG <u>AAGCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGAGCTGGGA</u> **GTACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCACAGCTACTTCAGCCT** AGAAGGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTG ATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGA <u>CAGATACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTGC</u> **CCTGCAGC**GGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCAGCGG CGGCGGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACCCCGACCCCGGCATGTTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGC CGTGAGCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACCCTGGAGT TCTACCCCTGCACCAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATC

ACCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAGGCCTGCCTGCCCCT GGAGCTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGA CCAGCTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCCAGCAGAAAG ACCAGCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAG GACCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAACGC CAAGCTGCTGATGGACCCCAAGAGACAGATCTTCCTGGACCA GAACATGCTGGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTGA ACTTCAACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAGAGCAGCCTGGAG GAGCCCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTG CTGCACGCCTTCAGAATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTG **ATGAGCTACCTGAACGCCAGC**GGCAGCGGCGGCAGCgacgcc $\underline{cacaagagcgaggtggcccacagattcaaggacctgggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatc}\\$ gccttcgcccagtacctgcagcagtgccccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagt tegecaagacetgegtggeegaegagagegeegagaaetgegaeaagageetgeaeaceetgtteggeg acaagetgtgcaccgtggccaccctgagagagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcag gagcccgagagaaacgagtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcccagactggtgaga cccgaggtggacgtgatgtgcaccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacg agategecagaagacacccctacttetaegececegagetgetgttettegecaagagatacaaggeegee gagggcaaggccagcagcagcagagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagag ccttcaaggcctgggccgtggccagactgagccagagttccccaaggccgagttcgccgaggtgagca agctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccaccggcgacctgctggagtgcgccgacg $\underline{acagagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcagcaggagtgct}$ gcgagaagcccctgctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccgac $\underline{ctgcccagcctggccgacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaagga}$ cgtgttcctgggcatgttcctgtacgagtacgccagaagacaccccgactacagcgtggtgctgctgctgag actggccaagacctacgagaccaccctggagaagtgctgcgccgccgccgacccccacgagtgctacgc caaggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggagccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctg ttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccctgctggtgagatacaccaagaaggtgccccaggtgagcaccccacctggtggaggtgagcagaaacctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcac cacgagaagacccccgtgagcgacagagtgaccaagtgctgcaccgagagcctggtgaacagaagaccctgette agegeet t gaggt gaggae agacet t ac gtgeec a aggagt te ac geg gagae et te ac gtgeec ag gagt te ac geg gaggae et te ac gtgeec ag gaggae et te ac gtgeec ag gaggaet te ac gaggaet te ac gtgeec ag gaggaet te ac gaggaet te ac gaggaet te ac gaggaet te ac gaggaet ag gaggaet te ac gaggaet ag gaggaet te ac gaggaet ag gaggacgccgacatctgcaccctgagcgagaaggagagacagatcaagaagcagaccgcctggtggagctg gtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccgccttcgtg gagaagtgctgcaaggccgacgacaaggagacctgcttcgccgaggagggcaagaagctggtggccgc cagccaggccgcctgtag

СР конструкция (SEQ ID NO: 11) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 36), (2) IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 61), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 86), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 111), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 136), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 157)

atgagggtcccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggtgcacgatgtgccATCTG **GGAGCTGAAGAAGGATGTGTATGTGGTGGAGCTGGACTGGT** <u>ACCCAGATGCCCCTGGAGAGATGGTGGTGCTGACCTGTGAC</u> <u>ACCCCAGAGGAGGATGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGAG</u> CAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAGG **TGAAGGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAG GGCGGGGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACAA** <u>GAAGGAGGATGGCATCTGGAGCACAGACATCCTGAAGGACC</u> **AGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGCGCTGTGAGGCC** <u>AAGAACTACAGCGGCCGCTTCACCTGCTGGTGGCTGACCACC</u> <u>ATCAGCACAGACCTGACCTTCTCTGTGAAAAGCAGCCGGGGC</u> <u>AGCAGTGACCCCCAGGGCGTGACCTGTGGGGCCGCCACCCT</u> GTCTGCTGAGCGGGTGCGGGGGGACAACAAGGAGTATGAGT <u>ACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCTGCT</u> **GAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCTGTGCA** CAAGCTGAAGTATGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCCG GGACATCATCAAGCCAGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTGAA <u>GCCCCTGAAGAACAGCCGGCAGGTGGAGGTGTCCTGGGAGT</u> **ACCCAGACACCTGGAGCACCCCCACAGCTACTTCAGCCTGA CCTTCTGTGTGCAGGTGCAGGGCAAGAGCAAGCGGGAGAAG** <u>AAGGACAGAGTCTTCACAGACAAGACCAGCGCCACCGTCATC</u> **TGCAGGAAGAATGCCAGCATCTCTGTGCGGGCCCAGGACCG** <u>CTACTACAGCAGCTCCTGGAGCGAGTGGGCCTCTGTGCCCTG</u> GGCAGCAGGAACCTGCCTGTGGCCACCCCAGACCCCGGCATG TTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGCGGGCTGTG AGCAACATGCTGCAGAAGGCCCGGCAGACCCTGGAGTTCTA CCCCTGCACCAGCGAGGAGATTGACCACGAGGACATCACCA AGGACAAGACCAGCACAGTGGAGGCCTGCCTGCCCTGGAG CTGACCAAGAATGAAAGCTGCCTGAACAGCCGGGAGACCAG CTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCCAGCAGGAAGACCA GCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTATGAGGACC TGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCCAAGC TGCTGATGGACCCCAAGAGGCAGATCTTCCTGGACCAGAACA TGCTGGCCGTGATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCA ACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGCCA GACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCAC GCCTTCCGCATCCGGGCTGTGACCATCGACAGAGTGATGAG

CTACCTGAATGCCAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGTgatgcccacaagtct gaggtggcccaccgcttcaaggacctggggggggagaacttcaaggccctggtgctgattgcctttgccca $\underline{gtacctgcagcagtgcccctttgaggaccacgtgaagctggtgaatgaggtgacagaatttgccaagacct}\\$ gtgtggctgatgaatctgctgagaactgtgacaagagcctgcacaccctgtttggagacaagctgtgcaccg tggccaccctgcgggagacctatggagagatggctgactgctgtgccaagcaggagcctgagagaaatg aatgetteetgeageacaaggatgaeaaccceaacctgeeeggetggtgeggeetgaggtggatgtgat $\underline{gtgcacagccttccatgacaatgaggagaccttcctgaagaagtacctgtatgaaattgcccggcggcacc}$ $\underline{cctacttctacgccctgagctgctgttctttgccaagcgctacaaggccgccttcacagagtgctgccaggc}$ cgctgacaaggccgcctgctgcccaagctggatgagctgagagatgagggcaaggccagcagcg $\underline{ccaagcagaggctgaagtgtgccagcctgcagaagtttggagagcgggccttcaaggcctgggccgtgg}$ cccgctgagccagcgcttccccaaggccgagtttgctgaggtgtccaagctggtgacagacctgaccaa ggtgcacacagagtgctgccacggggacctgctggagtgtgctgatgacagagctgacctggccaagtac atctgtgagaaccaggacagcatcagcagcagctgaaggagtgctgtgagaagcccctgctggaaaag $\underline{agccactgcatcgccgaggtggagaatgatgatgatgctgctgacttgcccagcctggccgctgactttgt}$ ggagagcaaggatgtgtgcaagaactatgcagaggccaaggatgttcctgggcatgttcctgtatgaata tgcccggcggcacccagactacagcgtggtgctgctgctgctgctggccaagacctatgagaccaccctg gagaagtgctgtgccgctgctgacccccatgaatgttatgccaaggtgtttgatgagttcaagcccctggtgg <u>aggagccccagaacctgatcaagcagaactgtgagctgtttgagcagctgggggagtacaagttccagaa</u> $\underline{tgccttgctggtgcgctacaccaagaaggtgccccaggtgtccaccccaccctggtggaggtgtccagg}$ <u>aacctgggcaaggtgggcaagtgctgcaagcaccctgaggccaagaggatgccctgtgccgagga</u> $\underline{ctacctgtctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgacaa}\\$ gtgctgcacagagagcctggtgaacagaagaccctgcttcagcgccctggaggtggatgagacctacgtg $\underline{cccaaggagttcaatgctgagaccttcaccttccacgccgacatctgcaccctgtctgagaaggagcggca}\\$ gatcaagaagcagacagcctggtggagetggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctga $\underline{aggctgtgatggatgactttgctgcctttgtggagaagtgctgcaaggcagatgacaaggagacctgctttg}$ ctgaggagggcaagaagctggtggccgccagccaggccgccctgggcctg

vH1 конструкция (SEQ ID NO: 12) – включает (1) лидерную последовательность строчными (указано буквами, SEQ ID NO: 37), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 62), (3) первый линкер GS (указано

курсивом, SEQ ID NO: 87), (4) IL-12 α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 112), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 137). (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 158)

TGAGCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGACAACAAGGAGTACGAG **TACAGCGTGGAGTGCCAGGAAGACAGCGCCTGCCCCGCTGC AGAGGAGTCTCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTGC** ACAAGCTTAAGTACGAGAACTACACCAGCTCCTTCTTCATTA **GAGACATCATCAAGCCCGACCCGCCCAAAAACCTGCAGCTGA AGCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTCAGCTGGGAG** TACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCACAGCTACTTCAGCCTG ACCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAA GAAGGACAGAGTGTTCACCGACAAAACCAGCGCCACCGTGA **TCTGCAGAAAAACGCCAGCATTAGCGTGAGAGCTCAGGATA** GATACTACAGCAGCAGCTGGAGTGAGTGGGCCAGCGTGCCC CGGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACGCCCGACCCCGGCATGTTTCCCTGCCTGCACCATAGCCAGAATCTGCTGAGAGCCGT GAGCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACGCTCGAGTTCT ACCCCTGCACCAGCGAGGAGATTGACCACGAGGACATCACC AAGGACAAGACCAGCACCGTGGAGGCCTGCCTCGA GCTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGACCA GCTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCCAGCAGAAAGACC AGCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGAC CTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACAATGAACGCCAA GCTGCTGATGGACCCCAAGAGGCAGATTTTTCTGGACCAGAA CATGCTGGCCGTTATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTGAATTT CAATAGCGAAACCGTGCCCCAGAAGAGCAGCCTGGAGGAGC CTGACTTCTACAAAACCAAGATCAAGCTTTGCATCCTGCTGC ACGCCTTCAGAATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGA **GCTACCTGAACGCCAGC***GGCAGCGGCGGCAGC*gacgcccacaag agegaggtggeccataggttcaaggacctgggegaggagaacttcaaggccctggtactcatcgccttcg cccaatacctgcaacagtgccccttcgaggaccatgttaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgcgtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctg $\underline{tgcaccgtggccaccctgagagagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccga}$ acgtaacgagtgetteetgeageacaaggacgacaaccccaacctgecccgactggteagaccegaggt ggacgtgatgtgcacagccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctctacgagatcgcca gaagacatccatacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaagaggtacaaggccgccttcacagagt gctgccaggccgccgacaaggccgcttgcctgctgcctaagttggacgagctgagagacgaggcaag gccagcagcgccaagcagagactgaagtgcgcaagcctgcagaaattcggcgagagagcctttaaggcc $\underline{tgggccgtggccagactgagccagcgcttccccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggtgacc}$ gacetgaceaaagtgeacacegagtgetgeeaeggegacetgetggagtgegeegaegaeagageega

vH2 конструкция (SEQ ID NO: 13) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 38), (2) IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 63), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 88), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 113), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 138), (6) альбумин (указано строчными буквами и

 $atgagagtgcccgccagctgctggggcctgctgctgctgctgctgctgccggcgccagatgtgcc \underline{ATCT}$ **GGGAGCTGAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGG** <u>TACCCCGACGCCCCCGGAGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGA</u> <u>CACCCCGAAGAGGACGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGA</u> <u>GCAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGGAAGACCCTGACCATCCAG</u> **GTGAAGGAGTTCGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGTCACAA** <u>GGGCGGCGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACA</u> <u>AGAAGGAGGACGCATATGGAGCACCGACATCCTGAAGGAC</u> CAGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTTCTGAGATGCGAGGC **TAAGAATTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCAC** <u>CATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAGAGCAGCAGAG</u> GCAGCAGCGACCCCAGGGCGTGACATGCGGCGCCGCCACC **CTGAGCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGACAACAAGGAGTACGA GTACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACTCCGCTTGCCCCGCCG** CCGAGGAGAGCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTG CACAAGCTCAAGTACGAAAACTACACCAGCAGCTTCTTCATC AGAGACATCATCAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTG <u>AAGCCCCTGAAAAACAGCAGACAGGTGGAGGTGAGCTGGGA</u> <u>GTACCCCGACACCTGGAGCACCCCCACAGCTACTTCAGCCT</u> **AGAAGGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTG** <u>ATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCTCCGTGAGAGCCCAGGA</u> CAGATACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTGC

подчеркнуто, SEQ ID NO: 159)

CGGCGGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACCCCGACCCCGGCATGTTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGC CGTGAGCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACCCTGGAGT TCTACCCCTGCACCAGCGAGGAGATCGACCATGAGGACATCA CCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAGGCCTGCCTGCCCCTG GAGCTGACCAAGAACGAAAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGAC CAGCTTTATGATGGCCCTGTGCCTGTCTAGCATCTACGAGGA TCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAA GCTGCTGATGGACCCCAAGAGACAGATCTTCCTGGACCAGAA CATGTTAGCCGTGATTGACGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTT CAATAGCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGC CCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGC ACGCCTTCAGAATCAGAGCCGTAACCATCGACAGAGTGATGA GCTACCTGAACGCCAGTGGCAGCGGCGGTGGCAGCgacgctcacaaga gegaggtggcccacagattcaaggacetgggcgaggagaacttcaaggccetggtcetgatcgcettegc $\underline{ccagtacctgcagcagtgccccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaag}$ acctgcgtggccgacgagtcggccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgacaagctg tgcaccgtggccaccctgagagaaacctacggggagatggccgactgctgcgcaaagcaggagcccga gcgaaacgagtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacttgcccagactggtaagacccgaggt ggacgtcatgtgcaccgctttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgagatcgcca gaagacacccctatttctatgcccctgagctgctgttcttcgccaagcgctacaaggccgccttcaccgagtg <u>ctgccaggccgccaaggccgcctgcctgctccccaagctgacgaggtgagagacgaaggcaagg</u> $\underline{ccag} cag cg ccaag cag aga ctg aag tg cg ccag cctg cag aag tt cg gcg aga gag cctt caag gcct}$ gggccgtggccagactgtcgcagagattccccaaggccgagttcgccgaggtgagcaagctggttaccg acetgactaaggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgctggagtgcgccgacgacagagccgacc $\underline{tggccaagtacatctgcgagaaccaggatagcatcagcagcagcaggaggagtgctgcgagaagcccc}$ ttctggagaagtcccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccgacctgcctagcctggccgccgacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggacgtgttcctgggcat gttcctgtacgagtacgccagaagacaccccgactacagcgtggtgctgctgctgagactggccaagacct acgagactaccettgagaagtgetgegeegeegeegacceacatgagtgetacgeeaaggtgttegacga gttcaagccctggtggaagagccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggc gagtacaagttccagaacgcccttctggtgagatacaccaagaaggtgcctcaggtgagcaccccaccct tgtggaggtgagcagaaacctcggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcatccagaggccaagagaat $\underline{agcgacagagtgaccaagtgctgcaccgagagtctggtgaacagaagaccctgcttcagcgccctggag}$ gtggacgagacctacgtgcccaaggagttcaacgccgagaccttcaccttccacgccgacatctgcaccct

vH3 конструкция (SEQ ID NO: 14) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 39), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 64), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 89), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 114), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 139), (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 160)

 $atgagagtgcccgcccagettctgggcctgctgctgctgctgctgccggcgccagatgcgcc\underline{ATCT}$ GGGAGCTGAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGG <u>TACCCGGACGCCCCGGGCGAGATGGTCGTGCTGACCTGCGA</u> CACCCCGAGGAGGACGCCATCACCTGGACCCTGGACCAGT <u>CTAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAG</u> **GTGAAGGAGTTCGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAA GGGCGGCGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACA** <u>AGAAGGAGGACGCATCTGGAGCACCGACATCCTGAAGGAC</u> CAGAAGGAGCCTAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGTGAGGC CAAGAACTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCAC <u>CATCAGCACCGATCTGACCTTCAGCGTGAAGAGCAGCAGAG</u> <u>GCAGCTCAGACCCCCAGGGCGTGACCTGCGGCGCCGCGACC</u> **CTGAGCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGACAACAAGGAGTACGA** <u>GTACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCCGCGG</u> **CCGAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTG** CATAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATC AGAGACATCATCAAGCCCGATCCCCCAAGAACCTGCAGCTG AAGCCACTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGAGCTGGGA **GTACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCACAGCTACTTCAGCCT** <u>AGAAGGACCGGGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACTGTG</u> <u>ATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGA</u> CAGATACTACAGCTCCAGCTGGTCAGAGTGGGCCAGCGTGC CGGCGGAAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACCCCTGACCCCGG CATGTTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGC CGTAAGCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACTCTGGAGT TCTACCCCTGCACCAGCGAGGAGATCGATCACGAGGACATCA CCAAGGACAAGACCAGTACCGTGGAGGCCTGCCTGCCCCTG GAGCTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGAC CAGCTTTATAACCAACGGCAGCTGTCTGGCTAGCAGAAAGAC CAGCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGGA CTTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCAA GCTTCTGATGGACCCCAAGAGACAGATCTTTCTGGACCAGAA

CATGCTGGCCGTGATCGATGAACTGATGCAGGCCCTGAACTT CAACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAGAGCAGTCTGGAGGAGC CCGACTTCTACAAGACTAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGC ACGCCTTCAGAATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGA **GCTACCTGAACGCCTCA***GGCAGCGGCGGGGGGGGGGG*cccacaag agcgaggtggcccacagattcaaggacctcggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgctttcg $\underline{cccagtacctgcagcagtgccccttcgaggaccacgtgaaactggtgaacgaggtgaccgagttcgccaa}$ gacctgcgtggccgacgagggcccgagaactgcgacaaggcctgcacacgttgttcggcgacaagct gtgcaccgtggccaccctgagagagacctacggcgagatggccgactgctgcgccaagcaggagcccg agagaaacgaatgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcccggctggtgagacccgagg tggacgtgatgtgcaccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacttgtacgagatcgca agaagacacccgtacttctacgccccgagctgctgttcttcgccaagagatacaaggccgccttcaccga gtgctgccaggccgccaaaggccgcctgcctgctgccaagctggacgagctcagagacgaggca aggccagcagcgccaagcagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagagcctttaag gcctgggccgtggccagactgagccagagattccccaaggccgagttcgccgaagtgagcaagctggtg agacetggccaagtacatetgegagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgetgegagaa gccctgctggagaagagccactgcatcgccgaggtggagaacgacgagatgcccgccgacctgccca gtctggccgcagacttcgtggagagcaaggatgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggacgtgttcct gggcatgttcctgtacgagtacgcaagaagacaccccgactacagcgtggtgctgctgctgagactggcc aagacctacgagaccaccctggagaagtgctgcgccgccgccgaccccacgagtgctacgccaaggt gttcgacgagttcaagcccctggtggaggagccccagaacctgatcaagcagaactgcgaactgttcgag $\underline{cagettggcgagtacaagtttcagaacgccctgctggtcagatacaccaagaaggtgccccaggtgagca}$ ccccacctggtggaggtgtccagaaacctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcacccgag agaccccgtgagcgacagagtgaccaagtgctgcaccgagagcctggtgaatagaagaccctgcttca gcgcactggaggtggacgagacctacgtgcccaaggagttcaacgccgagacattcaccttccacgccga tatctgcaccctgagcgagaaggagagacagatcaagaagcagaccgccctggtggagctggtgaagca $\underline{caagcccaaggccaccaaggagcagttgaaggccgtgatggacgacttcgccgccttcgtggagaaatg}$ gccgcctgggcctgtag

A1 конструкция (SEQ ID NO: 15) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 40), (2) IL-12β

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG

GGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAGCTTGACTGGT

ACCCCGACGCCCCCGGTGAAATGGTGGTTCTGACCTGCGAC

ACACCAGAGGAGGACGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGTC

CAGCGAGGTCCTGGGATCTGGCAAGACCCTGACCATCCAGG

TTAAGGAATTTGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAAAG

GCGGCGAGGTCCTTTCGCACAGTCTGCTGCTGCTGCATAAAA

(выделено жирным шрифтом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 65), (3) линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 90), и (4) IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 115)

AGGAGGACGCATTTGGAGCACCGACATTCTGAAGGATCAG **AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTTCTGAGATGTGAGGCCAAA AACTACTCTGGACGCTTCACCTGTTGGTGGCTGACCACCATC** <u>AGCACAGACCTGACCTTCTCGGTGAAGTCTAGTAGGGGCAG</u> CAGTGACCCCCAGGGCGTAACATGCGGCGCCGCTACCCTGA **GCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGATAACAAGGAGTACGAGTAC TCCGTGGAGTGCCAAGAGGACTCAGCCTGCCCGCCGCCGA** GGAGTCGCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCAGTGCACA **AGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGTAGCTTTTTCATCAGAG** <u>ATATCATTAAACCCGACCCTCCCAAGAACCTGCAGCTGAAGC</u> **CCTTAAAGAACAGCCGGCAGGTGGAAGTGTCATGGGAGTAC** CCAGACACCTGGAGCACTCCGCACAGCTACTTCAGCCTGACC TTCTGCGTTCAGGTGCAGGGAAAAAGCAAGAGAGAGAAGAA <u>AGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCAACCGTGATCT</u> **GTAGAAAGAACGCCTCGATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAGA TACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGTGTACCTTG** CAGCGGTGGAAGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGGAGTGGCGGAG GCAGCAGAAATCTTCCAGTAGCTACCCCCGACCCCGGCATGTTTCCCTGTCTGCACCATTCTCAAAACCTGTTACGGGCCGTGA GCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACACTGGAGTTTTACC CCTGTACCTCAGAGGAGATCGATCATGAGGACATTACTAAGG ACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCCCTAGAGCTA ACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACTCTAGAGAGACAAGCTTC ATCACGAACGCTCATGCCTGGCCAGTAGGAAAACCAGCTTC ATGATGGCTCTGTGCCTGAGCTCCATATATGAGGACCTTAAG ATGTACCAGGTGGAGTTCAAAACCATGAACGCCAAGCTGCTG ATGGACCCAAAGAGACAGATCTTCCTTGACCAGAACATGCTG GCCGTTATCGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGC GAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAACCCGACTT CTACAAAACCAAGATCAAGCTGTGCATTCTGCTGCATGCCTT CCGCATTAGAGCCGTGACCATCGATAGGGTGATGAGCTACCT **GAACGCCAGC**

А2 конструкция (SEQ ID NO: 16) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO:

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG

GGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTGGAGCTGGATTGGT

ACCCCGACGCCCCCGGCGAGATGGTCGTGCTGACCTGTGAC

ACCCCTGAGGAGGACGGAATCACATGGACCCTGGACCAGAG

CAGCGAAGTGTTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAG

TGAAGGAATTCGGCGACGCGGGCCAGTATACTTGCCACAAG

41), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом И подчеркнуто, SEQ ID NO: 66), (3) линкер GS курсивом, (указано SEQ ID NO: 91), и (4) IL-12α (выделено жирным шрифтом, **SEQ ID NO: 116)**

GGCGGGGAGGTTCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTCCACAA GAAAGAGGATGGCATCTGGTCTACCGACATCCTGAAGGACC **AAAAGGAGCCAAAGAACAAGACCTTCCTAAGATGCGAGGCC** AAGAACTACTCAGGTCGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACCACA <u>ATCTCCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAAAGCAGCCGCGGC</u> <u>AGTAGCGACCCACAGGGCGTGACCTGCGGGGCCGCCACTCT</u> <u>GAGCGCCGAGAGAGTGCGCGCGATAATAAGGAATACGAGT</u> <u>ACAGCGTGGAGTGCCAGGAAGACTCAGCCTGCCCCGCCGCA</u> GAAGAAAGTCTGCCAATAGAGGTGATGGTTGACGCCGTGCA <u>CAAGCTAAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTTATCCG</u> **GGACATCATCAAGCCAGATCCCCCCAAGAACCTGCAGCTTAA GCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGTCATGGGAAT** ACCCCGACACCTGGAGCACCCCCATAGCTACTTCTCACTGA <u>AAGGATAGGGTATTCACGGACAAGACCTCAGCCACCGTGATC</u> TGCCGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAG ATACTATAGCTCCTCGTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTACCTTG **CAGC**GGCGGGGGCGCGCGCGCGGAGGTGGCAGTGGCGGAG GCAGCAGAAACCTCCCGTGGCAACCCCTGACCCCGGGATGTTTCCTTGCCTGCACCACTCCCAGAACCTCCTGAGAGCCGTGT CCAACATGCTGCAGAAAGCCAGACAGACCCTCGAGTTCTATC CCTGCACAAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATCACTAAG GACAAGACCAGCACAGTGGAAGCCTGCCTCCCGCTGGAGCT GACTAAGAACGAGAGCTGTCTGAACAGCAGGGAGACCAGCT TCATCACCAACGCCAGCTGCCTGGCGAGCAGAAAAACCTCCT TTATGATGGCGCTCTGCCTGAGCTCAATCTATGAGGACCTGA AGATGTACCAGGTGGAGTTTAAAACCATGAATGCCAAGCTGC TTATGGACCCTAAGAGACAGATTTTCCTGGATCAGAACATGC TGGCCGTGATTGATGAATTAATGCAGGCGCTGAACTTTAACA GCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGCCCGAC TTTTACAAGACCAAGATCAAGTTGTGCATCCTCCTGCACGCC TTCAGAATCAGAGCGGTGACGATCGACAGAGTCATGAGCTAC CTCAACGCT

А3 конструкция (SEQ ID NO: 17) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными

atgagggtcccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG

GGAGCTGAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGGT

ACCCCGACGCCCCCGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGAC

ACCCCCGAGGAGGACGCATCACCTGGACCCTGGACCAGAG

CAGCGAGGTGCTGGGCAGCGCAAGACCCTGACCATCCAGG

буквами, SEQ ID NO: 42), **(2)** IL-12β жирным (выделено шрифтом И подчеркнуто, SEQ ID NO: 67), (3) линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 92), и (4) IL-12α (выделено жирным шрифтом, **SEQ ID NO: 117)**

TGAAGGAGTTCGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAAG **GGCGGCGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACAA** GAAGGACGCATCTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACC **AGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCC** AAGAACTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCACC <u>ATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAAAGCAGCAGAGG</u> <u>CAGCAGCGACCCCAGGGCGTGACCTGCGGCGCCGCCACCC</u> **TGAGCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGACAACAAGGAGTACGAG** TACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCCGCCGC <u>CGAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTGC</u> **ACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCA** GAGACATCATCAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTGA AGCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGAGCTGGGAG **TACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCACAGCTACTTCAGCCTG** GAAGGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGA TCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGAC <u>AGATACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTGCC</u> **CTGCAGC**GGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCGCCGCC GGCGGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACCCCGACCCCGGC ATGTTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCC GTGAGCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACCCTGGAGTT CTACCCCTGCACCAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATCA CCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAGGCCTGCCTGCCCCTG GAGCTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGAC CAGCTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCCAGCAGAAAGA CCAGCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGG ACCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCA AGCTGCTGATGGACCCCAAGAGACAGATCTTCCTGGACCAGA ACATGCTGGCCGTGATCGACGACCTGATGCAGGCCCTGAAC TTCAACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGA GCCCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCT GCACGCCTTCAGAATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGAT **GAGCTACCTGAACGCCAGC**

А4 конструкция (SEQ ID NO: 18) – включает (1) лидерную последовательность

atgagggtcccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG

GGAGCTGAAGAAGGATGTGTATGTGGTGGAGCTGGACTGGT

ACCCAGATGCCCCTGGAGAGATGGTGGTGCTGACCTGGACCAGAG

ACCCCAGAGGAGGATGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGAG

(указано строчными буквами, SEQ ID NO: 43), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 68), (3) линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 93), и (4) IL-12α (выделено жирным шрифтом, **SEQ ID NO: 118)**

CAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAGG **TGAAGGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAG GGCGGGGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACAA** <u>GAAGGAGGATGGCATCTGGAGCACAGACATCCTGAAGGACC</u> AGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGCGCTGTGAGGCC **AAGAACTACAGCGGCCGCTTCACCTGCTGGTGGCTGACCACC** <u>ATCAGCACAGACCTGACCTTCTCTGTGAAAAGCAGCCGGGGC</u> AGCAGTGACCCCAGGGCGTGACCTGTGGGGCCGCCACCCT GTCTGCTGAGCGGGTGCGGGGGGACAACAAGGAGTATGAGT <u>ACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCTGCT</u> <u>GAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCTGTGCA</u> <u>CAAGCTGAAGTATGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCCG</u> GGACATCATCAAGCCAGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTGAA <u>GCCCCTGAAGAACAGCCGGCAGGTGGAGGTGTCCTGGGAGT</u> <u>ACCCAGACACCTGGAGCACCCCCACAGCTACTTCAGCCTGA</u> **CCTTCTGTGTGCAGGTGCAGGGCAAGAGCAAGCGGGAGAAG** AAGGACAGAGTCTTCACAGACAAGACCAGCGCCACCGTCATC **TGCAGGAAGAATGCCAGCATCTCTGTGCGGGCCCAGGACCG** <u>CTACTACAGCAGCTCCTGGAGCGAGTGGGCCTCTGTGCCCTG</u> GGCAGCAGGAACCTGCCTGTGGCCACCCCAGACCCCGGCATG TTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGCGGGCTGTG AGCAACATGCTGCAGAAGGCCCGGCAGACCCTGGAGTTCTA CCCCTGCACCAGCGAGGAGATTGACCACGAGGACATCACCA AGGACAAGACCAGCACAGTGGAGGCCTGCCTGCCCCTGGAG CTGACCAAGAATGAAAGCTGCCTGAACAGCCGGGAGACCAG CTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCCAGCAGGAAGACCA GCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTATGAGGACC TGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCCAAGC TGCTGATGGACCCCAAGAGGCAGATCTTCCTGGACCAGAACA TGCTGGCCGTGATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCA ACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGCCA GACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCAC GCCTTCCGCATCCGGGCTGTGACCATCGACAGAGTGATGAG **CTACCTGAATGCCAGC**

В1 конструкция (SEQID NO: 19) – включает(1) лидерную

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctccaggtgcacgatgtgcc<u>ATCTG</u>

<u>GGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGAGCTTGACTGGT</u>

ACCCCGACGCCCCGGTGAAATGGTGGTTCTGACCTGCGAC

последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 44), **(2)** IL-12B (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 69), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 94), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 119), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 140), (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 161)

ACACCAGAGGAGGACGCATCACCTGGACCCTGGACCAGTC CAGCGAGGTCCTGGGATCTGGCAAGACCCTGACCATCCAGG **TTAAGGAATTTGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAAAG GCGGCGAGGTCCTTTCGCACAGTCTGCTGCTGCTGCATAAAA** <u>AGGAGGACGCATTTGGAGCACCGACATTCTGAAGGATCAG</u> **AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTTCTGAGATGTGAGGCCAAA** <u>AACTACTCTGGACGCTTCACCTGTTGGTGGCTGACCACCATC</u> <u>AGCACAGACCTGACCTTCTCGGTGAAGTCTAGTAGGGGCAG</u> CAGTGACCCCCAGGGCGTAACATGCGGCGCCGCTACCCTGA **GCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGATAACAAGGAGTACGAGTAC TCCGTGGAGTGCCAAGAGGACTCAGCCTGCCCGCCGCCGA GGAGTCGCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCAGTGCACA** AGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGTAGCTTTTTCATCAGAG <u>ATATCATTAAACCCGACCCTCCCAAGAACCTGCAGCTGAAGC</u> **CCTTAAAGAACAGCCGGCAGGTGGAAGTGTCATGGGAGTAC** CCAGACACCTGGAGCACTCCGCACAGCTACTTCAGCCTGACC TTCTGCGTTCAGGTGCAGGGAAAAAGCAAGAGAGAGAAGAA <u>AGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCAACCGTGATCT</u> **GTAGAAAGAACGCCTCGATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAGA** TACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGTGTACCTTG CAGCGGTGGAAGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGGAGTGGCGGAG *GCAGCAGAAATCTTCCAGTAGCTACCCCCGACCCCGGCATGT* TTCCCTGTCTGCACCATTCTCAAAACCTGTTACGGGCCGTGA GCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACACTGGAGTTTTACC CCTGTACCTCAGAGGAGATCGATCATGAGGACATTACTAAGG ACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCCCTAGAGCTA ACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACTCTAGAGAGACAAGCTTC ATCACGAACGCTCATGCCTGGCCAGTAGGAAAACCAGCTTC ATGATGGCTCTGTGCCTGAGCTCCATATATGAGGACCTTAAG ATGTACCAGGTGGAGTTCAAAACCATGAACGCCAAGCTGCTG ATGGACCCAAAGAGACAGATCTTCCTTGACCAGAACATGCTG GCCGTTATCGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGC GAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAACCCGACTT CTACAAAACCAAGATCAAGCTGTGCATTCTGCTGCATGCCTT CCGCATTAGAGCCGTGACCATCGATAGGGTGATGAGCTACCT GAACGCCAGCGCTCTGGCGGCGGCAGTgacgcccacaagtccgaggtcgcc $\underline{cacagattcaaggatttgggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgccttcgcccagtacttgcag}$ cagtgtcccttcgaggaccatgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgtgtggccga

cgagagcgccgagaactgcgataagtctctgcacaccctttttggcgacaaactgtgcaccgtggccaccc tgagagagacctacggcgagatggccgactgctgtgcgaagcaggagcccgagcgcaatgagtgtttcct gcagcataaggacgacaaccccaacctgcccagactggtgagacccgaggtggacgtgatgtgcaccgc $\underline{cttccacgacaacgaggagacctttctgaaaaaatacctgtacgagatcgcaagacgccacccctacttcta}\\$ cgccccgagctgctgttcttcgccaagcgctacaaggctgccttcaccgaatgctgccaggccgccgata aggccgcgtgcttactgccaaagctggacgagctgagagaggggaaagcctctagcgccaaacag $\underline{agattgaagtgtgccagcctgcagaaattcggtgagagagccttcaaggcctgggccgtggccagattatc}$ acagcggttccccaaggctgaattcgccgaggtgagcaaacttgtcaccgatctgacaaaagtgcacaccg agtgctgccatggcgacctgctggagtgcgccgaccgggccgacctggccaagtacatctgcgaga accaggacagcatctccagcaagctgaaggagtgctgcgagaaagcccctgctggagaaaagccactgca tcgccgaggtggagaatgacgaaatgcccgccgacctgcccagcctggccgccgacttcgtggaaagca $\underline{aggacgtgtgcaaaaattacgccgaagccaaggatgtgttcttgggcatgttcttgtacgagtacgccagac}$ gccaccccgactacagcgtggtgctgctgctgctgctgccaagacctacgagaccaccctggagaagt gctgtgctgccgccgaccccacgagtgctacgccaaggtatttgacgagttcaagcccctggtggagga gcct caga acctg attaag caga actgt gag ctgtt cgag cagctg gg cgag tacaag ttccaga accccctcctggtgagatacaccaaaaaggtgcctcaggtaagcactcccaccctggtggaggtgagcaggaacctcggcaaggtgggcagcaaatgctgcaagcacccagaggccaaaagaatgccctgcgcagaagactacc $\underline{tcagcgtggtcctgaaccagctgtgcgtgctgcacgaaaagacccctgtgagcgatagagtgacaaagtg}$ $\underline{ctgcaccgagagcctggtgaacagaagaccctgttttagcgccctggaggtggacgagacctacgtgccc}\\$ $\underline{aaggagttcaacgccgagacgttcactttccacgcggacatctgcaccctgagcgagaaggagagacaaa}$ tcaagaagcagaccgcctagtcgagctggtaaaacacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaag gccgtgatggacgactttgcagccttcgtggagaagtgctgcaaggctgacgacaaggagacctgcttcgc cgaggagggcaagaagctcgtagccgccagccaggccgctctcggcctt

В2 конструкция (SEQ ID NO: 20) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 45), **(2)** IL-12B (выделено жирным шрифтом И подчеркнуто, SEQ ID NO: 70), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 95), **(4)** IL-12 α (выделено жирным

шрифтом, SEQ ID NO: 120), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 141), и (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 162)

CAAGCTAAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTTATCCG **GGACATCATCAAGCCAGATCCCCCCAAGAACCTGCAGCTTAA GCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGTCATGGGAAT** ACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCATAGCTACTTCTCACTGA **CCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCAAGAGAGAGAGAGAG AAGGATAGGGTATTCACGGACAAGACCTCAGCCACCGTGATC** TGCCGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAG ATACTATAGCTCCTCGTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTACCTTG GCAGCAGAAACCTCCCGTGGCAACCCCTGACCCCGGGATGTTTCCTTGCCTGCACCACTCCCAGAACCTCCTGAGAGCCGTGT CCAACATGCTGCAGAAAGCCAGACAGACCCTCGAGTTCTATC CCTGCACAAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATCACTAAG GACAAGACCAGCACAGTGGAAGCCTGCCTCCCGCTGGAGCT GACTAAGAACGAGAGCTGTCTGAACAGCAGGGAGACCAGCT TCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCGAGCAGAAAAACCTCCT TTATGATGGCGCTCTGCCTGAGCTCAATCTATGAGGACCTGA AGATGTACCAGGTGGAGTTTAAAACCATGAATGCCAAGCTGC TTATGGACCCTAAGAGACAGATTTTCCTGGATCAGAACATGC TGGCCGTGATTGATGAATTAATGCAGGCGCTGAACTTTAACA GCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGCCCGAC TTTTACAAGACCAAGATCAAGTTGTGCATCCTCCTGCACGCC TTCAGAATCAGAGCGGTGACGATCGACAGAGTCATGAGCTAC **CTCAACGCTAGC***GGCAGCGGTGGCGGCAGC*gacgcccacaagagcgaggt ggccacagattcaaggatctcggggaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgccttcgcacagtacc tgcagcagtgcccttcgaggaccacgtaaaactggtgaacgaggtgacggagttcgccaagacctgtgtt gccgacgagtcggccgagaattgcgacaagagcctgcataccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtgg gtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcccggctggtgagacccgaggtggacgtgat gtgcaccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtatctgtacgagatcgccagaagacac $\underline{cct} tatttttacgccccgagctgctgttcttcgctaagagatataaggcagccttcaccgagtgttgtcaggc$ cgccgataaggccgcttgcctgctgcccaagttggacgagctcagagacgagggcaaggcgagcagcg $\underline{ccaagcagaagtagagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagggccttcaaggcctgggcggtg}$ aggtgcacaccgagtgttgccacggcgacctgctggaatgcgccgatgaccgtgccgacctggccaagta catctgcgagaatcaggactccatcagcagcaaactgaaggagtgttgcgagaagcccctgctggaaaag $\underline{agccattgcatcgctgaggtggaaaacgacgagatgcccgcagacctgcccagcctggccgcagactttg}$ tggaaagtaaggacgtgtgcaagaactacgcggaggccaaagacgtgtttctgggcatgttcctatacgag

tatgccagaagacaccccgactacagcgttgtgttattgctgagactggccaagacctacgagactaccttg
gagaagtgctgcgccgccgccgacccccacgagtgctatgccaaggtgttcgacgagttcaagccctgg
tggaggagccccagaatctgattaagcagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagtataagttccaga
acgccctgctggtgagatacaccaaaaaaggtacctcaggtgagcacccccaccctggtggaggtgagca
gaaatctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcacccggaggccaagagaatgccctgtgcgag
gattacctgtcagtggtgctgaaccagctgtgcgttctgcacgaaaagacgccgtgtggagcagagtgac
caagtgctgcacggagagcctggtgaacagaagaccgtgcttcagcgccctagaggtgacgagaccta
cgtgcccaaggagttcaacgccgagaccttcaccttccacgccgacatctgtaccctgtcagagaggag
gacagatcaagaagcagaccgccttagtggagctggtgaagcacaagcccaaggccacaaggagaactt
gctgaaagccgtgatggacgatttcgcagccttcgtcgagaagtgctgcaaggccgacaaaggaaactt
gcttcgccgaggagggcaagaagctggtggctgctcgcaggccgcctcggcctg

В3 конструкция (SEQ ID NO: 21) - включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 46), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 71), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 96), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 121), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 142), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID

NO: 163)

 $atgagggtcccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggtgcacgatgtgcc \underline{ATCTG}$ GGAGCTGAAGAAGGACGTGTACGTGGTGGAGCTGGACTGGT **ACCCCGACGCCCCGGCGAGATGGTGGTGCTGACCTGCGAC** <u>ACCCCCGAGGAGGACGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGAG</u> CAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAGG **TGAAGGAGTTCGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAAG** <u>GGCGGCGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACAA</u> <u>GAAGGAGGACGCATCTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACC</u> **AGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCC** AAGAACTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCACC <u>ATCAGCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAAAGCAGCAGAGG</u> CAGCAGCGACCCCAGGGCGTGACCTGCGGCGCCGCCACCC **TGAGCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGACAACAAGGAGTACGAG** <u>TACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCCGCCGC</u> <u>CGAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTGC</u> ACAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCA **GAGACATCATCAAGCCCGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTGA AGCCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGAGCTGGGAG TACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCACAGCTACTTCAGCCTG** GAAGGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCCACCGTGA **TCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGAC** AGATACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTGCC GGCGCAGCAGAAACCTGCCCGTGGCCACCCCGACCCCGGC ATGTTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGAGAGCC GTGAGCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACCCTGGAGTT

CTACCCCTGCACCAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATCA CCAAGGACAAGACCAGCACCGTGGAGGCCTGCCTGCCCCTG GAGCTGACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACAGCAGAGAGAC CAGCTTCATCACCAACGCCAGCTGCCTGGCCAGCAGAAGA CCAGCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTACGAGG ACCTGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAACGCCA AGCTGCTGATGGACCCCAAGAGACAGATCTTCCTGGACCAGA ACATGCTGGCCGTGATCGACGACCTGATGCAGGCCCTGAAC TTCAACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGA GCCCGACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCT GCACGCCTTCAGAATCAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTGAT GAGCTACCTGAACGCCAGCGGCAGCGGCGGCAGCGacgcccac aagagcgaggtggcccacagattcaaggacctgggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgcc $\underline{ttcgcccagtacctgcagcagtgccccttcgaggaccacgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcg}\\$ $\underline{cca} \underline{agacctgcgtggccgacgagagcgccgagaactgcgacaagagcctgcacaccctgttcggcgac}$ aagetgtgeacegtggeeacectgagagagacetaeggegagatggeegaetgetgegeeaageagga gecegagagaaacgagtgetteetgeageacaaggaegacaaccccaacetgeceagaetggtgagace cgaggtggacgtgatgtgcaccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtacctgtacgag $\underline{ategecagaagacacccctacttctaegccccgagctgctgttcttegccaagagatacaaggccgccttc}$ $\underline{ttcaaggcctgggccgtggccagactgagccagagattccccaaggccgagttcgccgaggtgagcaag}$ ctggtgaccgacctgaccaaggtgcacaccgagtgctgccacggcgacctgctggagtgcgccgacgac <u>agagccgacctggccaagtacatctgcgagaaccaggacagcatcagcagcaagctgaaggagtgctgc</u> gaga ag c c c t g c t g ag a a a ag c c a c t g c t g ag a t g c c g ag at g c c g ag at g agcccagcctggccgacttcgtggagagcaaggacgtgtgcaagaactacgccgaggccaaggacg $\underline{tgttcctgggcatgttcctgtacgagtacgccagaagacaccccgactacagcgtggtgctgctgctgagac}$ tggccaagacctacgagaccaccctggagaagtgctgcgccgccgccgaccccacgagtgctacgcca aggtgttcgacgagttcaagccctggtggaggagccccagaacctgatcaagcagaactgcgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgcctgctggtgagatacaccaagaaggtgcccaaggt acgagaagaccccgtgagcgacagagtgaccaagtgctgcaccgagagcctggtgaacagaagaccc tgettcagegecetggaggtggaegagacetaegtgeceaaggagttcaaegeegagaeettcaeetteea cgccgacatctgcacctgagcgagaagagagagacagatcaagaagcagaccgcctggtggagctgg tgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaaggccgtgatggacgacttcgccgccttcgtgg agaagtgctgcaaggccgacgacaaggaggacctgcttcgccgaggagggcaagaagctggtggccgcc agccaggccgcctgggcctg

В4 конструкция (SEQ ID NO: 22) - включает **(1)** лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 47), (2) IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 72), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 97), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 122), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 143), И (6) альбумин (указано строчными буквами и подчеркнуто, SEQ ID NO: 164)

atgagggtcccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctcccaggtgcacgatgtgccATCTG **GGAGCTGAAGAAGGATGTGTATGTGGTGGAGCTGGACTGGT** <u>ACCCAGATGCCCCTGGAGAGATGGTGGTGCTGACCTGTGAC</u> ACCCCAGAGGAGGATGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGAG CAGCGAGGTGCTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAGG **TGAAGGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAG GGCGGGGAGGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCACAA** <u>GAAGGAGGATGGCATCTGGAGCACAGACATCCTGAAGGACC</u> **AGAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGCGCTGTGAGGCC** <u>AAGAACTACAGCGGCCGCTTCACCTGCTGGTGGCTGACCACC</u> <u>ATCAGCACAGACCTGACCTTCTCTGTGAAAAGCAGCCGGGGC</u> <u>AGCAGTGACCCCCAGGGCGTGACCTGTGGGGCCGCCACCCT</u> GTCTGCTGAGCGGGTGCGGGGGGACAACAAGGAGTATGAGT <u>ACAGCGTGGAGTGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCTGCT</u> <u>GAGGAGAGCCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCTGTGCA</u> CAAGCTGAAGTATGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTCATCCG GGACATCATCAAGCCAGACCCCCCAAGAACCTGCAGCTGAA <u>GCCCCTGAAGAACAGCCGGCAGGTGGAGGTGTCCTGGGAGT</u> **ACCCAGACACCTGGAGCACCCCCACAGCTACTTCAGCCTGA CCTTCTGTGTGCAGGTGCAGGGCAAGAGCAAGCGGGAGAAG** <u>AAGGACAGAGTCTTCACAGACAAGACCAGCGCCACCGTCATC</u> **TGCAGGAAGAATGCCAGCATCTCTGTGCGGGCCCAGGACCG CTACTACAGCAGCTCCTGGAGCGAGTGGGCCTCTGTGCCCTG** GGCAGCAGGAACCTGCCTGTGGCCACCCCAGACCCCGGCATG TTCCCCTGCCTGCACCACAGCCAGAACCTGCTGCGGGCTGTG AGCAACATGCTGCAGAAGGCCCGGCAGACCCTGGAGTTCTA CCCCTGCACCAGCGAGGAGATTGACCACGAGGACATCACCA AGGACAAGACCAGCACAGTGGAGGCCTGCCTGCCCTGGAG CTGACCAAGAATGAAAGCTGCCTGAACAGCCGGGAGACCAG CTTCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCCAGCAGGAAGACCA GCTTCATGATGGCCCTGTGCCTGAGCAGCATCTATGAGGACC TGAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCCAAGC TGCTGATGGACCCCAAGAGGCAGATCTTCCTGGACCAGAACA TGCTGGCCGTGATTGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCA ACAGCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGCCA GACTTCTACAAGACCAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCAC GCCTTCCGCATCCGGGCTGTGACCATCGACAGAGTGATGAG

CTACCTGAATGCCAGCGGCAGCGGCGGCGGCAGTgatgcccacaagtct gaggtggcccaccgcttcaaggacctggggggggagaacttcaaggccctggtgctgattgcctttgccca $\underline{gtacctgcagcagtgcccctttgaggaccacgtgaagctggtgaatgaggtgacagaatttgccaagacct}\\$ gtgtggctgatgaatctgctgagaactgtgacaagagcctgcacaccctgtttggagacaagctgtgcaccg tggccaccctgcgggagacctatggagagatggctgactgctgtgccaagcaggagcctgagagaaatg aatgetteetgeageaeaaggatgaeaaceceaacetgeeeggetggtgeggeetgaggtggatgtgat $\underline{gtgcacagccttccatgacaatgaggagaccttcctgaagaagtacctgtatgaaattgcccggcggcacc}$ $\underline{cctacttctacgccctgagctgctgttctttgccaagcgctacaaggccgccttcacagagtgctgccaggc}$ cgctgacaaggccgcctgctgcccaagctggatgagctgagagatgagggcaaggccagcagcg $\underline{ccaagcagaggctgaagtgtgccagcctgcagaagtttggagagcgggccttcaaggcctgggccgtgg}$ cccgctgagccagcgcttccccaaggccgagtttgctgaggtgtccaagctggtgacagacctgaccaa ggtgcacacagagtgctgccacggggacctgctggagtgtgctgatgacagagctgacctggccaagtac atctgtgagaaccaggacagcatcagcagcagctgaaggagtgctgtgagaagcccctgctggaaaag $\underline{agccactgcatcgccgaggtggagaatgatgatgatgctgctgacttgcccagcctggccgctgactttgt}$ ggagagcaaggatgtgtgcaagaactatgcagaggccaaggatgttcctgggcatgttcctgtatgaata tgcccggcggcacccagactacagcgtggtgctgctgctgctgctggccaagacctatgagaccaccctg gagaagtgctgtgccgctgctgacccccatgaatgttatgccaaggtgtttgatgagttcaagcccctggtgg <u>aggagccccagaacctgatcaagcagaactgtgagctgtttgagcagctgggggagtacaagttccagaa</u> $\underline{tgccttgctggtgcgctacaccaagaaggtgccccaggtgtccaccccaccctggtggaggtgtccagg}$ <u>aacctgggcaaggtgggcaagtgctgcaagcaccctgaggccaagaggatgccctgtgccgagga</u> $\underline{ctacctgtctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgacaa}\\$ gtgctgcacagagagcctggtgaacagaagaccctgcttcagcgccctggaggtggatgagacctacgtg $\underline{cccaaggagttcaatgctgagaccttcaccttccacgccgacatctgcaccctgtctgagaaggaggggca}\\$ gatcaagaagcagacagcctggtggagetggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcagctga $\underline{aggctgtgatggatgactttgctgcctttgtggagaagtgctgcaaggcagatgacaaggagacctgctttg}$ ctgaggagggcaagaagctggtggccgccagccaggccgccctgggcctg

С1 конструкция (SEQ ID NO: 23) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 48), **(2)** IL-12β (выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 73), (3) первый линкер GS (указано

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG

GGAGCTGAAAAAGGACGTGTACGTGGTGGAACTTGACTGGT

ACCCCGACGCCCCCGGCGAGATGGTGGTACTGACCTGCGAC

ACTCCCGAGGAAGACGGCATTACCTGGACCTTGGACCAGAG

CAGCGAGGTTCTGGGCTCCGGAAAAACCTTGACAATCCAAGT

GAAAGAATTCGGCGACGCTGGCCAGTACACCTGCCACAAGG

GCGGCGAGGTGCTGTCCCACAGCCTGCTGCTGCTGCATAAG

AAAGAAGACGGGATTTGGAGCACCTGCTGCTGCATAAG

GAAGGAGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGGTGCGAGGCCA

AAAATTACAGCGGCAGATTCACCTGCTGGTGGCTGACCACCA

TTAGCACAGACCTGACTTTCAGCGTAAAGTCTTCAAGGGGCA

GCTCAGACCCCCAGGGAGTAACTTGCGGAGCGCAACGTTG

курсивом, SEQ ID NO: 98), (4) IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 123), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 144), (6) альбумин (указано строчными буквами подчеркнуто, SEQ ID NO: 165), (7) третий линкер GS (указано строчными буквами и указано курсивом, SEQ ID NO: 168), и (8) люмикан (указано строчными буквами, указано курсивом, и подчеркнуто, SEQ ID NO: 171)

TCTGCCGAGCGGTCAGAGGCGACAATAAGGAGTACGAGTA **TTCAGTAGAGTGTCAGGAAGATAGCGCCTGTCCCGCCGCGG AGGAGAGCCTCCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCCGTGCAC** AAGTTAAAGTACGAGAATTACACCAGCTCATTTTTTATCAGA **GACATTATCAAGCCGGACCCCCGAAGAACTTACAGCTTAAA CCCCTAAAGAACAGCAGGCAGGTTGAGGTCAGCTGGGAATA TCCTGACACCTGGTCAACCCCCCACAGCTACTTCTCCCTTAC** TTTCTGTGTGCAAGTGCAGGGCAAGAGCAAGAGAAAAGA AGGACCGGGTGTTTACCGACAAGACTAGCGCCACCGTGATTT **GCAGAAAGAACGCCAGCATTAGTGTGAGAGCCCAGGACAGG TATTACTCCAGCTCATGGTCTGAGTGGGCTAGTGTGCCTTGC** TAGCCGGAATCTGCCTGTCGCCACTCCAGACCCCGGCATGTTCCCATGTCTGCATCATTCTCAGAACCTGCTGAGGGCCGTATC CAATATGCTGCAGAAAGCCAGACAGACCTTAGAGTTCTATCC CTGTACAAGCGAGGAGATAGATCACGAGGATATTACGAAGG ACAAAACTTCTACTGTTGAGGCGTGTCTTCCATTAGAGCTGA CCAAGAACGAAAGCTGTCTGAATAGCAGAGAGACTTCATTTA TCACCAATGGGAGTTGCTTGGCTAGCAGAAAGACCAGCTTCA TGATGGCCCTTTGCTTGTCTTCGATATACGAAGATCTTAAGA TGTATCAAGTGGAATTTAAGACGATGAACGCCAAGCTGCTTA TGGATCCCAAGCGCCAAATCTTCCTGGATCAGAACATGTTGG CCGTGATTGACGAGCTGATGCAAGCCCTGAATTTCAACTCCG AGACCGTGCCTCAGAAAAGCAGCCTCGAGGAGCCCGACTTC TACAAAACAAAGATCAAACTCTGCATCCTTCTGCACGCCTTC AGAATTAGAGCCGTGACCATCGACAGAGTTATGAGCTACCTG **AATGCCAGC**GGCAGCGGCGGCGGATCCgatgcccataaatctgaggtggcccat agegeegaaaactgegacaaaageetgeacaccetgtttggegacaagetgtgcaccgtagecaccetga gagaaacttacggcgagatggctgactgctgcgccaagcaggagacccgagagaaacgagtgctttctgca gcacaaggacgacaatcccaacctgcccagactggtgagacccgaagtggatgttatgtgcaccgctttcc acgacaatgaagagacatttctcaagaagtacttgtacgagattgcaagaagacacccttacttttacgcccc cgaattactgttcttcgctaagaggtataaggcagccttcactgaatgctgccaggctgccgacaaagcagc tgcgccagccttcagaagtttggcgagcgggccttcaaggcatgggccgtggctcgacttagccagcgtttt $\underline{cccaaggctgaatttgcagaggtgagtaaactggttaccgatctgacaaaggtgcacaccgagtgctgtca}\\$ cggtgacctcttagagtgcgccgacgacagagccgacctcgccaagtacatttgtgaaaaccaagactcaa

tetetteaaagttaaaggagtgetgegaaaageeeetgettgaaaagageeaetgeattgeegaagtegaga atgatgagatgcctgcagacttgcccagcttggcagccgacttcgttgagtctaaggacgtgtgcaagaatt $\underline{acgccgaggcaaaagacgtgttcctgggcatgttcctttatgagtacgctagaagacatcccgactacagcg}$ $\underline{tggtccttctccttaggctcgctaagacttacgagacgacgttggagaagtgttgtgccgctgcggaccccc}$ $\underline{acgagtgctatgccaaagtgttcgatgagtttaaacccctggtggaggaacctcagaaccttatcaagcaga}$ attgtgagttgttcgaacagctaggcgagtacaagttccagaatgccctgctggtgagatacacaaaaaagg $\underline{tgccccaggtgtcaaccccgaccttagtggaagtgtccagaaacctgggcaaggtggcagcaagtgctg}$ $\underline{caagcaccccgaagctaagagaatgccgtgcgcggaggattacctgagcgtggtgctcaaccagctgtgt}$ gtgcttcacgagaaaacacccgtgagcgacagggtgacaaaatgttgcacagaaagccttgtgaaccgga gacettgttt cagegeettg aggttg ac gagaettatgtteeta aggagtte aac get gagaettte ac att teach to the state of th $\underline{cacgetgatatatgtaccetgagegagaaagaaagacagatcaagaagcagacegcetggtegagetgg}$ tgaaacacaagcctaaggccacgaaggagcagctgaaggccgtcatggacgacttcgcagccttcgtcga gaaatgctgcaaagccgacgacaaggaaacctgcttcgccgaagagggaaagaagctggtggccgcctc <u>ccaggccgccttgggcggttctggtggcggttctcagtactacgattacgacttcccctga</u> gtatctacggtcagtcctcacctaactgcgccccagagtgtaactgccccgaaagctacccgagcgcca tgtactgcgacgagctgaagttgaagtccgtgcccatggtgcccccaggcatcaagtacttatacttgag gaacaaccaaatcgatcatatcgacgagaaggccttcgaaaacgtaaccgacctgcagtggctgatac tggatcacaatctgctagagaattccaagatcaagggcagagtgttctcgaagctgaaacaactgaag <u>aagetgeacateaaceataacaateteacegagagegtgggteecetgeecaagtegetggaggaeet</u> geagetgacceacaacaaataaccaaactaggeagettegaggggttggtgaatetgacetteateca tttgcagcataacagactaaaggaggatgccgtgagcgccgccttcaaaggcctcaagagccttgagt acctggacctgagcttcaaccagatcgcccggctgcccagtgggctgcccgtgagcctgctgacgctgt <u>atctggacaataacaaaatcagcaacatccccgacgaatacttcaaaagattcaacgccttacagtacc</u> tgcgactcagccacaatgagctcgctgacagcggcatccctggcaacagcttcaacgtgtcatccctggt ggagetggacetgagttacaataagetgaagaacateecaactgteaatgagaatttggaaaactaeta cctggaggtgaaccagctggagaagttcgacattaagagcttttgcaaaatcctgggcccactgtcatat $\underline{agcaagatcaagcacctgcgactggacggcaaccgaatcagtgaaacttccctaccccctgacatgta}$ cgagtgcctgagagtagcaaatgaggtgaccctgaac

С2 конструкция (SEQ ID NO: 24) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 49), (2) IL-12β (выделено жирным шрифтом и подчеркнуто, SEQ ID

atgagggtcccgctcagctcctggggctcctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG
GGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAGCTTGACTGGT
ACCCCGACGCCCCCGGTGAAATGGTGGTTCTGACCTGCGAC
ACACCAGAGGAGGACGGCATCACCTGGACCCTGGACCAGTC
CAGCGAGGTCCTGGGATCTGGCAAGACCCTGACCATCCAGG
TTAAGGAATTTGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGCCACAAAG
GCGGCGAGGTCCTTTCGCACAGTCTGCTGCTGCTGCATAAAA
AGGAGGACGGCATTTGGAGCACCTTCTGAAGGATCAG
AAAGAGCCCAAGAACAAGACCTTTCTGAGATGTGAGGCCAAA
AACTACTCTGGACCGTTCACCTGTTGGTGGCTGACCACCATC

NO: 74), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 99), IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 124), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 145), (6) альбумин (указано строчными буквами подчеркнуто, SEQ ID NO: 166), (7) третий линкер GS (указано строчными буквами и указано курсивом, SEQ ID NO: 169), и (8) люмикан (указано строчными буквами, указано курсивом, и подчеркнуто, SEQ ID NO: 172)

AGCACAGACCTGACCTTCTCGGTGAAGTCTAGTAGGGGCAG CAGTGACCCCCAGGGCGTAACATGCGGCGCCGCTACCCTGA **GCGCCGAGAGAGTGAGAGGCGATAACAAGGAGTACGAGTAC TCCGTGGAGTGCCAAGAGGACTCAGCCTGCCCGCCGCCGA GGAGTCGCTGCCCATCGAGGTGATGGTGGATGCAGTGCACA AGCTGAAGTACGAGAACTACACCAGTAGCTTTTTCATCAGAG** <u>ATATCATTAAACCCGACCCTCCCAAGAACCTGCAGCTGAAGC</u> **CCTTAAAGAACAGCCGGCAGGTGGAAGTGTCATGGGAGTAC** CCAGACACCTGGAGCACTCCGCACAGCTACTTCAGCCTGACC **TTCTGCGTTCAGGTGCAGGGAAAAAGCAAGAGAGAGAA** <u>AGACAGAGTGTTCACCGACAAGACCAGCGCAACCGTGATCT</u> **GTAGAAAGAACGCCTCGATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAGA TACTACAGCAGCAGCTGGAGCGAGTGGGCCAGTGTACCTTG** CAGCGGTGGAAGCGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGGAGTGGCGGAG GCAGCAGAAATCTTCCAGTAGCTACCCCCGACCCCGGCATGTTTCCCTGTCTGCACCATTCTCAAAACCTGTTACGGGCCGTGA GCAACATGCTGCAGAAGGCCAGACAGACACTGGAGTTTTACC CCTGTACCTCAGAGGAGATCGATCATGAGGACATTACTAAGG ACAAGACCAGCACCGTGGAAGCCTGCCTGCCCCTAGAGCTA ACCAAGAACGAGAGCTGCCTGAACTCTAGAGAGACAAGCTTC ATCACGAACGCTCATGCCTGGCCAGTAGGAAAACCAGCTTC ATGATGGCTCTGTGCCTGAGCTCCATATATGAGGACCTTAAG ATGTACCAGGTGGAGTTCAAAACCATGAACGCCAAGCTGCTG ATGGACCCAAAGAGACAGATCTTCCTTGACCAGAACATGCTG GCCGTTATCGATGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGC GAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAACCCGACTT CTACAAAACCAAGATCAAGCTGTGCATTCTGCTGCATGCCTT CCGCATTAGAGCCGTGACCATCGATAGGGTGATGAGCTACCT GAACGCCAGCGCTCTGGCGGCGGCAGTgacgcccacaagtccgaggtcgcc cacagattcaaggatttgggcgaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgccttcgcccagtacttgcag $\underline{cagtgtcccttcgaggaccatgtgaagctggtgaacgaggtgaccgagttcgccaagacctgtgtggccga}$ cgagagcgccgagaactgcgataagtctctgcacaccctttttggcgacaaactgtgcaccgtggccaccc tgagagagacctacggcgagatggccgactgctgtgcgaagcaggagcccgagcgcaatgagtgtttcct gcagcataaggacgacaaccccaacctgcccagactggtgagacccgaggtggacgtgatgtgcaccgc cttccacgacaacgaggagacctttctgaaaaaatacctgtacgagatcgcaagacgccaccctacttcta cgccccgagctgctgttcttcgccaagcgctacaaggctgccttcaccgaatgctgccaggccgccgata $\underline{aggccgcgtgcttactgccaaagctggacgagctgagagacgaggggaaagcctctagcgccaaacag}$ agattgaagtgtgccagcctgcagaaattcggtgagagagccttcaaggcctgggccgtggccagattatc

 $\underline{acageggttccccaaggctgaattcgccgaggtgagcaaacttgtcaccgatctgacaaaagtgcacaccg}$ agtgctgccatggcgacctgctggagtgcgccgaccgggccgacctggccaagtacatctgcgaga accaggacagcatctccagcaagctgaaggagtgctgcgagaaagcccctgctggagaaaagccactgca $\underline{tcgccgaggtggagaatgacgaaatgcccgccgacctgcccagcctggccgacctcgtggaaagca}$ gccacccgactacagcgtggtgctgctgctgctgcggctggccaagacctacgagaccaccctggagaagt gctgtgctgccgccgaccccacgagtgctacgccaaggtatttgacgagttcaagcccctggtggagga gcctcagaacctgattaagcagaactgtgagctgttcgagcagctgggcgagtacaagttccagaacgccc tectggtgagatacaccaaaaaggtgectcaggtaagcactccacctggtggaggtgagcaggaacct <u>cggcaaggtgggcagcaaatgctgcaagcacccagaggccaaaagaatgccctgcgcagaagactacc</u> tcagcgtggtcctgaaccagctgtgcgtgctgcacgaaaagacccctgtgagcgatagagtgacaaagtg $\underline{ctgcaccgagagcctggtgaacagaagacctgttttagcgccctggaggtggacgagacctacgtgccc}\\$ aaggagttcaacgccgagacgttcactttccacgcggacatctgcaccctgagcgagaaggagagacaaa $\underline{tcaagaagcagaccgccctagtcgagctggtaaaacacaagcccaaggccaccaaggagcagctgaag}$ gccgtgatggacgactttgcagccttcgtggagaagtgctgcaaggctgacgacaaggagacctgcttcgc gttctcagtattacgactacgatttccccctgagcatctatggccagagcagccctaactgcgccccgga $\underline{gtgcaactgccccgaaagctacccaagcgccatgtactgcgatgaagctgaagctgaagctgaagtctgtgcctat}$ <u>ggtgcctcccggcatcaagtacctgtacctgagaaacaaccagatagaccacatcgatgagaaagcct</u> tcgagaacgtcaccgacctgcagtggctgattctggaccacaatttactggagaactccaagatcaagg geagagtgtteteeaagttaaageagetgaagaaaetgeacateaateacaacaacetgaeegagage gtgggcccactgcccaagagcctagaggatctgcagctcacccacaacaagatcactaagttgggca <u>gcttcgagggcctcgtaaacttgacattcatacatctgcagcacaacagacttaaggaagacgccgtga</u> <u>gtgcggcetttaagggtctgaaaagcctggagtacttagacctgagettcaaccagatcgcaaggctgc</u> <u>ccageggeetteeggteagtetgetgaceetgtatetggacaacaacaagateageaacateeeegaeg</u> agtacttcaageggtttaacgeeeteeagtaeetgagaetgageeacaaegagttagetgaetegggeat acceggtaacagetteaatgttageagectagttgagettgagetagagetacaagettaagaacate <u>ccaaccgtgaacgagaacctcgagaattactacctggaagtcaaccagctggagaagttcgacattaa</u> gagettetgeaaaateetgggeeeaetgteetatageaagateaageaeetgegeettgaeggaaaeag aattagegagaccageetteeaccagacatgtaegagtgeetgagggtggeeaacgaggtgaccetga ac

С3 конструкция (SEQ ID NO: 25) – включает (1) лидерную последовательность (указано строчными буквами, SEQ ID NO: 50), (2) IL-12β

atgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctctggctccaggtgcacgatgtgccATCTG

GGAACTGAAGAAGGACGTCTACGTGGTGGAGCTGGATTGGT

ACCCCGACGCCCCGGCGAGATGGTCGTGCTGACCTGTGAC

ACCCCTGAGGAGGACGGAATCACATGGACCCTGGACCAGAG

CAGCGAAGTGTTGGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAG

TGAAGGAATTCGGCGACGCGGGCCAGTATACTTGCCACAAG

GGCGGGGGAGGTTCTGAGCCACAGCCTGCTGCTCCACAA

(выделено жирным шрифтом подчеркнуто, SEQ ID NO: 75), (3) первый линкер GS (указано курсивом, SEQ ID NO: 100), **(4)** IL-12α (выделено жирным шрифтом, SEQ ID NO: 125), (5) второй линкер GS (указано курсивом и подчеркнуто, SEQ ID NO: 146), (6) альбумин (указано строчными буквами подчеркнуто, SEQ ID NO: 167), (7) третий линкер GS (указано строчными буквами и указано курсивом, SEQ ID NO: 170), и (8) люмикан (указано строчными буквами, указано курсивом, и подчеркнуто, SEQ ID NO: 173)

GAAAGAGGATGGCATCTGGTCTACCGACATCCTGAAGGACC **AAAAGGAGCCAAAGAACAAGACCTTCCTAAGATGCGAGGCC AAGAACTACTCAGGTCGTTTCACCTGCTGGTGGCTGACCACA** <u>ATCTCCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAAAGCAGCCGCGGC</u> <u>AGTAGCGACCCACAGGGCGTGACCTGCGGGGCCGCCACTCT</u> GAGCGCCGAGAGAGTGCGCGGCGATAATAAGGAATACGAGT <u>ACAGCGTGGAGTGCCAGGAAGACTCAGCCTGCCCGCCGCA</u> **GAAGAAAGTCTGCCAATAGAGGTGATGGTTGACGCCGTGCA** CAAGCTAAAGTACGAGAACTACACCAGCAGCTTCTTTATCCG **GGACATCATCAAGCCAGATCCCCCCAAGAACCTGCAGCTTAA GCCCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAGGTGTCATGGGAAT** <u>ACCCCGACACCTGGAGCACCCCCCATAGCTACTTCTCACTGA</u> <u>AAGGATAGGGTATTCACGGACAAGACCTCAGCCACCGTGATC</u> **TGCCGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTGAGAGCCCAGGACAG ATACTATAGCTCCTCGTGGAGCGAGTGGGCCAGCGTACCTTG** GCAGCAGAAACCTCCCGTGGCAACCCCTGACCCCGGGATGTTTCCTTGCCTGCACCACTCCCAGAACCTCCTGAGAGCCGTGT CCAACATGCTGCAGAAAGCCAGACAGACCCTCGAGTTCTATC CCTGCACAAGCGAGGAGATCGACCACGAGGACATCACTAAG GACAAGACCAGCACAGTGGAAGCCTGCCTCCCGCTGGAGCT GACTAAGAACGAGAGCTGTCTGAACAGCAGGGAGACCAGCT TCATCACCAACGGCAGCTGCCTGGCGAGCAGAAAAACCTCCT TTATGATGGCGCTCTGCCTGAGCTCAATCTATGAGGACCTGA AGATGTACCAGGTGGAGTTTAAAACCATGAATGCCAAGCTGC TTATGGACCCTAAGAGACAGATTTTCCTGGATCAGAACATGC TGGCCGTGATTGATGAATTAATGCAGGCGCTGAACTTTAACA GCGAGACCGTGCCCCAGAAAAGCAGCCTGGAGGAGCCCGAC TTTTACAAGACCAAGATCAAGTTGTGCATCCTCCTGCACGCC TTCAGAATCAGAGCGGTGACGATCGACAGAGTCATGAGCTAC **CTCAACGCTAGC**GGCAGCGGTGGCGGCAGCgacgcccacaagagcgaggt ggcccacagattcaaggatctcggggaggagaacttcaaggccctggtgctgatcgccttcgcacagtacc tgcagcagtgcccttcgaggaccacgtaaaactggtgaacgaggtgacggagttcgccaagacctgtgtt gccgacgagtcggccgagaattgcgacaagagcctgcataccctgttcggcgacaagctgtgcaccgtgg $\underline{gtgcttcctgcagcacaaggacgacaaccccaacctgcccggctggtgagacccgaggtggacgtgat}$ gtgcaccgccttccacgacaacgaggagaccttcctgaagaagtatctgtacgagatcgccagaagacac

cettatttttacgccccgagctgctgttcttcgctaagagatataaggcagccttcaccgagtgttgtcaggc cgccgataaggccgcttgcctgctgcccaagttggacgagctcagagacgaggcaaggcgagcagcg $\underline{ccaagcagagactgaagtgcgccagcctgcagaagttcggcgagagggccttcaaggcctgggcggtg}$ <u>aggtgcacaccgagtgttgccacggcgacctgctggaatgcgccgatgaccgtgccgacctggccaagta</u> catetgegagaateaggaeteeateageageaaactgaaggagtgttgegagaageeeetgetggaaaag agccattgcatcgctgaggtggaaaacgacgagatgcccgcagacctgcccagcctggccgcagactttg $\underline{tggaaagtaaggacgtgtgcaagaactacgcggaggccaaagacgtgtttctgggcatgttcctatacgag}$ tatgccagaagacaccccgactacagcgttgtgttattgctgagactggccaagacctacgagactaccttg gagaagtgctgcgccgccgccgaccccacgagtgctatgccaaggtgttcgacgagttcaagccctgg $\underline{tggaggagccccagaatctgattaagcagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctttttgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagctgggcgagtataagttccagaattgcgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagcagaattgcgagcagctgggcgagtataagttccagaattgcgagcagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcgagaattgcagaattgcgagaattgcagaattgcagaattgcgagaattgcagaattgcagaattgcgagaattgc$ $\underline{acgcctgctggtgagatacaccaaaaaggtacctcaggtgagcacccccaccctggtggaggtgagca}$ gaaatctgggcaaggtgggcagcaagtgctgcaagcacccggaggccaagagaatgccctgtgccgag $\underline{caagtgctgcacggagagcctggtgaacagaagaccgtgcttcagcgccctagaggtggacgagaccta}\\$ cgtgcccaaggagttcaacgccgagacettcacettccacgccgacatetgtaccetgtcagagaaggaga gacagatcaagaagcagaccgccttagtggagctggtgaagcacaagcccaaggccaccaaggagcag $\underline{ctgaaagccgtgatggacgatttcgcagccttcgtcgagaagtgctgcaaggccgacgacaaggaaactt}\\$ <u>gcttcgccgaggagggcaagaagctggtggctgcctcgcaggccgccctcggcctgggtggcgggtctg</u> $gtggeggttct\underline{cagtactacgactacgatttccccctatccatctacgggcagagctcgcctaactgcgcc}$ ccegagtgtaactgccccgagtcgtaccccagcgccatgtactgtgacgagctgaagctgaaaagcgt gcccatggtgcccccggcatcaagtacctgtacttgagaaacaaccagatcgaccacattgacgaaa <u>aggeettegagaaegtaaeegaeetgeagtggetgateetggaeeaeaaeetgettgagaaeageaag</u> <u>atcaagggccgcgtgttcagcaagctgaagcagctgaagaagctgcacatcaaccacaacaacttga</u> <u>ctgagtctgttggcccctaccaaagagcctggaggacctgcagctgacccacaataagataaccaag</u> ctgggctcattcgagggcctggtgaacttgacctttattcacctgcagcataacagactgaaggaggacg <u>ccgtgagcgccgcctttaaggggctgaaaagcctggagtacctggacctgagttttaaccagatcgcca</u> gactgccctcaggcctgccgtgagtttgctgactctgtacctggacaacaataagatcagcaacattcct gacgagtatttcaaaagattcaatgctctgcagtacctgagactaagccacaacgagctggccgacag cggaatccccggcaacagcttcaacgtgagcagcttggtggagttggacctgagctacaacaaactga <u>agaacatccccaccgtcaatgagaacttggagaattactacctcgaggttaaccagcttgagaagttcg</u> a cat caa gaget tet geaa gateet gggeeeeet caget acagea agatea agaa et t gagaet ggaegggaacagaatcagcgaaaccagccttcctcccgacatgtacgagtgccttagagtggcaaatgaggt gaccctgaac

[0215] Согласно некоторым аспектам выделенный полинуклеотид, как описано в настоящем документе, *т.е.*, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую IL-12 (*например*, субъединицу IL-12 и/или субъединицу IL-12 р), содержит один или несколько

гетерологичных фрагментов (*например*, ген (гены), представляющий (представляющие) экспериментальный и/или терапевтический интерес). В контексте настоящего изобретения термин «гетерологичный фрагмент» относится к любой молекуле (химической или биологической), которая отличается от белка IL-12 (*например*, субъединицы IL-12α и/или субъединицы IL-12β), кодируемого молекулой нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем документе. Такие гетерологичные фрагменты могут быть генетически слиты, конъюгированы и/или иным образом связаны с белком IL-12. Например, согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент может быть слит с 3'-концом субъединицы IL-12α. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент может быть конъюгирован с 3'-концом субъединицы IL-12β. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент может быть слит с 3'-концом субъединицы IL-12β. Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент может быть конъюгирован с 3'-концом субъединицы IL-12β линкером (*например*, линкер GS).

[0216] Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент содержит фрагмент, увеличивающий время полужизни. Термин «фрагмент, увеличивающий время полужизни» относится к фармацевтически приемлемому фрагменту, домену или молекуле, ковалентно связанным («конъюгированным» или «слитым») с белком IL-12 (например, субъединица IL-12α и/или субъединица IL-12β), кодируемым молекулой нуклеиновой кислоты, как раскрыто в настоящем описании, необязательно посредством неприродно кодируемой аминокислоты, непосредственно или через линкер, который предотвращает или ослабляет *in vivo* протеолитическое расщепление или другую химическую модификацию белка IL-12, снижающую активность, увеличивает период полужизни и/или улучшает или изменяет другие фармакокинетические или биофизические свойства, включая без ограничения повышение скорости всасывания, снижение токсичности, улучшение растворимости, снижение агрегации белков, повышение биологической активности и/или селективности белок IL-12, повышение технологичности и/или снижение иммуногенности белка IL-12, по сравнению с эталонным соединением, таким как неконъюгированная или неслитая форма белка IL-12.

[0217] В контексте настоящего изобретения термин «слитый» или «слияние» указывает, что по меньшей мере две полипептидные цепи (например, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты, как раскрыто в настоящем документе) были функционально связаны и рекомбинантно экспрессированы. Согласно некоторым аспектам две полипептидные цепи могут быть «слиты» в результате химического синтеза. В контексте настоящего изобретения термины «конъюгат» или «конъюгация» означают, что два молекулярных объекта (например, два полипептида или полипептид и полимер, такой как РЕG) были химически связаны.

[0218] Согласно некоторым аспектам фрагмент, увеличивающий время полужизни, содержит область Fc, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, жирную кислоту, Pro/Ala/Ser (PAS), глицин-богатый гомоаминокислотный полимер (HAP), субъединицу β С-концевого пептида (СТР) человеческого хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоль (РЕG), гидроксиэтилкрахмал (HES), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности

аминокислот (XTEN), альбумин-связывающие малые молекулы или их комбинации. *См.*, *например*, WO 2013/041730 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно определенным аспектам фрагмент, увеличивающий время полужизни, представляет собой альбумин (*например*, человеческий сывороточный альбумин).

[0219] Согласно некоторым аспектам гетерологичный фрагмент содержит люмикан. Люмикан связывается с коллагеном, который обильно и повсеместно экспрессируется в опухолях. Согласно определенным аспектам конъюгация люмикана с белком IL-12 (например, субъединицей IL-12α и/или субъединицей IL-12β) может улучшить нацеливание белка IL-12 на опухоли (например, посредством предотвращения и/или снижения белка попадания IL-12 в системный кровоток) и тем самым снизить токсичность белка IL-12. Дополнительное раскрытие, относящееся к люмикану (например, последовательности), который можно применять, представлено в другом месте настоящего раскрытия.

[0220] Согласно некоторым аспектам гетерологичные фрагменты кодируют цитокины, хемокины или факторы роста, отличные от IL-12. Цитокины известны в данной области техники, и сам термин относится к обобщенной группе малых белков, которые секретируются некоторыми клетками иммунной системы и оказывают влияние на другие клетки. Цитокины, как известно, усиливают клеточный иммунный ответ и согласно настоящему изобретению могут включать без ограничения TNFa, IFN-q, IFN-a, TGFβ, IL-1, IL-2, IL-4, IL-10., IL-13, IL-17, IL-18 и хемокины. Хемокины полезны для исследований, изучающих ответ на инфекцию, иммунные ответы, воспаление, травму, сепсис, рак и репродукцию, среди прочих применений. Хемокины известны в данной области техники и представляют собой тип цитокинов, которые индуцируют хемотаксис в близлежащих реагирующих клетках, обычно лейкоцитах, в местах инфекции. Неограничивающие примеры хемокинов включают ССL14, CCL19, CCL20, CCL21, CCL25, CCL27, CXCL12, CXCL13, CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 и CXCL10. Факторы роста известны в данной области техники, и сам термин иногда взаимозаменяем с термином цитокины. В контексте настоящего изобретения термин «факторы роста» относится к веществу природного происхождения, способному передавать сигналы между клетками и стимулировать клеточный рост. В то время как цитокины могут быть факторами роста, определенные типы цитокинов также могут оказывать ингибирующее действие на рост клеток, таким образом различая эти два термина. Неограничивающие примеры факторов роста включают адреномедуллин (AM), ангиопоэтин (Ang), аутокринный фактор миграции, костные морфогенетические белки (ВМР), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор ингибирования лейкоза (LIF), интерлейкин-6 (IL-6), макрофагальный колониестимулирующий фактор (m-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), эпидермальный фактор роста (EFG), Эфрин A1, Эфрин А2, Эфрин А3, Эфрин А4, Эфрин А5, Эфрин В1, Эфрин В2, Эфрин В3, эритропоэтин (ЕРО), фактор роста фибробластов 1 (FGF1), Фактор роста фибробластов 2 (FGF2), Фактор роста фибробластов 3 (FGF3), Фактор роста фибробластов 4 (FGF4), Фактор роста фибробластов 5 (FGF5), Фактор роста фибробластов 6 (FGF6), Фактор роста фибробластов 7 (FGF7), Фактор роста фибробластов 8 (FGF8), Фактор роста фибробластов 9 (FGF9), Фактор роста фибробластов 10 (FGF10), Фактор роста фибробластов 11 (FGF11), Фактор роста фибробластов 12 (FGF12), Фактор роста фибробластов 13 (FGF13), Фактор роста фибробластов 14 (FGF14), Фактор роста фибробластов 15(FGF15), Фактор роста фибробластов 16 (FGF16), Фактор роста фибробластов 17 (FGF17), Фактор роста фибробластов 18 (FGF18), Фактор роста фибробластов 19 (FGF19), Фактор роста фибробластов 20 (FGF20), Фактор роста фибробластов 21 (FGF21), Фактор роста фибробластов 22 (FGF22), Фактор роста фибробластов 23 (FGF23), эмбриональный бычий соматотропин (FBS), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротурин, персефин, артемин, фактор роста и дифференцировки-9 (GDF9), фактор роста гепатоцитов (HGF), Гепатома-происходящий фактор роста (HDGF), инсулин, инсулиноподобный ростовой фактор-1 (IGF-1), инсулиноподобный ростовой фактор -2 (IGF-2), интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, кератиноцитарный фактор роста (KGF), стимулирующий миграцию фактор (MSF), макрофагстимулирующий белок (MSP), миостатин (GDF-8), Нейрегулин 1 (NRG1), Нейрегулин 2 (NRG2), Нейрегулин 3 (NRG3), Нейрегулин 4 (NRG 4), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин-3 (NT-3), нейротрофин-4 (NT-4), плацентный фактор роста (TCGF), тромбопоэтин (TPO), трансформирующий фактор роста альфа (TGF-а), трансформирующий фактор роста бета (TGF-β), фактор некроза опухоли альфа (TNF-α) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF).

[0221] Согласно некоторым аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) согласно настоящему изобретению дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность. В контексте настоящего изобретения термин «лидерная последовательность» относится к последовательности, расположенной на амино-конце формы-предшественника белка. Лидерные последовательности отщепляются в ходе созревания. Согласно определенным аспектам лидерная последовательность Термин «сигнальный пептид» относится к лидерной содержит сигнальный пептид. последовательности, обеспечивающей поступление белка в секреторный путь. Дополнительное описание лидерных последовательностей приведено в, например, US 2007/0141666 A1, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым аспектам лидерная последовательность, которую можно применять согласно настоящему изобретению, содержит аминокислотную последовательность MRVPAQLLGLLLLWLPGARCA (SEQ ID NO: 180). Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такую лидерную последовательность, содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 26 - 50. Согласно некоторым аспектам молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая лидерную последовательность, содержит последовательность, кодирующую лидерную последовательность любой из конструкций, приведенных в Таблице 1.

[0222] Как очевидно на основании приведенного выше раскрытия, согласно некоторым аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) согласно настоящему

изобретению содержит несколько молекул нуклеиновой кислоты. Например, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит (в направлении от 5' к 3'): (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (іі) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу ІС-12β, (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую линкер, (например, линкер GS), и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу IL-12α. Как описано в настоящем документе, согласно некоторым аспектам такой полинуклеотид дополнительно содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп, (2) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность, (3) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу ІІ-12В, (4) третью нуклеотидную последовательность, кодирующую линкер (например, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12α, и (6) поли(A) хвост. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп, (2) 5'-UTR, (3) промотор, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, (5) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу ІL-12β, (6) третью нуклеотидную последовательность, кодирующую линкер (например, линкер GS), (7) четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12α, (8) 3'-UTR, и (9) поли(А) хвост. Дополнительное описание иллюстративных конструкций представлено ниже.

[0223] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая лидерную последовательность) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 40, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая субъединицу IL-12β) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 65, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая линкер) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 90, и (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая субъединицу IL-12α) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 115. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 15. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 40 (*m.е.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 65 (m.e., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 90 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую

последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 115 (*m.e.*, субъединица IL-12 α), и (6) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «A1 конструкция.»

[0224] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 41, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 66, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 91, и (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 116. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 16. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 41 (*m.e.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 66 (*m.e.*, субъединица IL- 12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 91 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 116 (т.е., субъединица IL-12а), и (6) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «А2 конструкция.»

[0225] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 42, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 67, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 92, и (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 117. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 42 (*m.e.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 67 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 92 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 117 (т.е., субъединица IL-12а), и (6) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «А3 конструкция.»

[0226] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 43, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 68, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 93, и (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 43 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 68 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 93 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118 (*m.е.*, субъединица IL-12a), и (6) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «А4 конструкция.»

[0227] Согласно некоторым аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу IL-12β, (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер (например, первый линкер GS), (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу IL-12α, (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер (например, второй линкер GS), и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фрагмент, увеличивающий время полужизни, (например, человеческий сывороточный альбумин). Как описано в настоящем документе, согласно некоторым аспектам такой полинуклеотид дополнительно содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): 5'-кэп, **(1) (2)** первую нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность, (3) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу ІС-12β, (4) третью нуклеотидную последовательность, кодирующую первый линкер (например, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу $IL-12\alpha$, (6) пятую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй линкер (например, линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, кодирующую фрагмент, увеличивающий время полужизни, (например, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп, (2) 5'-UTR, (3) промотор, (4) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность, (5) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12β, (6) третью нуклеотидную последовательность, кодирующую первый линкер (например, линкер GS), (7) четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12α, (8) пятую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй линкер (например, линкер GS), (9) шестую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный фрагмент (например, альбумин), (10) 3'-UTR, и (11) поли(A) хвост. Дополнительное описание таких иллюстративных конструкций представлено ниже.

[0228] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая лидерную последовательность) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 26, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая субъединицу IL-12β) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 51, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая первый линкер) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 76, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты (*m.e.*, кодирующая субъединицу IL-12α) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 101, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая второй линкер) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 126, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты (*m.e.*, кодирующая фрагмент, увеличивающий время полужизни,) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 147. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 26 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 51 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 76 (*m.e.*, первый линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 101 (*m.e.*, субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 126 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 147 (т.е., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «L1 конструкция.»

[0229] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 27, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 77 (iv) четвертая молекула

нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 102, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 127, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 148. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 27 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 77 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 102 (*т.е.*, субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 127 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 148 (*m.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «L2 конструкция.»

[0230] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 28, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 53, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 78, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 103, (у) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 128, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 149. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 28 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 53 (*m.e.*, субъединица IL- 12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 78 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 103 (*т.е.*, субъединица IL- 12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность,

содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 128 (*m.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 149 (*m.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «L3 конструкция.»

[0231] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 29, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 54, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 79, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 104, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 129, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEO ID NO: 150. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 29 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 54 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 79 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 104 (*m.e.*, субъединица IL- 12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 129 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 150 (*m.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «М1 конструкция.»

[0232] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 30, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 55, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 80, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 130, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 151. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно

некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 30 (*т.е.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 55 (*т.е.*, субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 80 (*т.е.*, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105 (*т.е.*, субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 130 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 151 (*т.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «М2 конструкция.»

[0233] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 31, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 56, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 81, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 106, (у) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 131, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 152. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 31 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 56 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 81 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 106 (*m.e.*, субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 131 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 152 (*m.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «М3 конструкция.»

[0234] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 32, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 57, (iii) третья молекула нуклеиновой

кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 82, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 107, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 132, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 153. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 7. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 32 (*m.e.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 57 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 82 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 107 (*m.e.*, субъединица IL- 12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 132 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 153 (*m.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «Н1 конструкция.»

[0235] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 33, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 58, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 83, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 108, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 133, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 154. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 33 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 58 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 83 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено

в SEQ ID NO: 108 (*т.е.*, субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 133 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 154 (*т.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «Н2 конструкция.»

[0236] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 34, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 59, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 84, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 109, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 134, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 155. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 34 (т.е., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 59 (m.e., субъединица IL-12 β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 84 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 109 (*m.e.*, субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 134 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 155 (*m.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «Н3 конструкция.»

[0237] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 37, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 62, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 87, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 112, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 137, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 158. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один

или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 37 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 62 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 87 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 112 (m.e., субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 137 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 158 (т.е., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «vH1 конструкция.»

[0238] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 38, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 63, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 88, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 113, (у) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 138, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 159. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 13. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 38 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 63 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 88 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 113 (т.е., субъединица IL-12a), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 138 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 159 (т.е., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «vH2 конструкция.»

[0239] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 39, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 89, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 114, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 139, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 160. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 39 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 89 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 114 (m.e., субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 139 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 160 (m.e., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «vН3 конструкция.»

[0240] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 44, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 69, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 94, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 140, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 161. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (*например*, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 44 (*m.e.*, лидерная

последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 69 (*т.е.*, субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 94 (*т.е.*, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119 (*т.е.*, субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 140 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 161 (*т.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «В1 конструкция.»

[0241] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 45, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 70, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 95, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 120, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 141, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 162. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 45 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 70 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 95 (*т.е.*, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 120 (m.e., субъединица IL-12a), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 141 (*m.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 162 (m.e., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «В2 конструкция.»

[0242] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 46, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 71, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 96, (iv) четвертая молекула

нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 121, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 142, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 163. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 21. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 46 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 71 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 96 (*m.е.*, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 121 (m.e., субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 142 (*m.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 163 (т.е., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «ВЗ конструкция.»

[0243] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 47, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 72, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEO ID NO: 97, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 122, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 143, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 164. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 22. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 47 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 72 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 97 (*m.е.*, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую

последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 122 (*т.е.*, субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 143 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 164 (*т.е.*, человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «В4 конструкция.»

[0244] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 35, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 60, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 85, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 110, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEO ID NO: 135, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 156. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 10. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 35 (*m.e.*, лидерная **(3)** вторую последовательность), нуклеотидную последовательность, последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 60 (т.е., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 85 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 110 (m.e., субъединица IL-12α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 135 (*m.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEO ID NO: 156 (т.е., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «СО конструкция.»

[0245] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 36, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 61, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 86, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 111, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 136, и (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 157. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например,

выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 11. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 36 (m.e., лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 61 (m.e., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 86 (m.e., линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 111 (m.e., субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 136 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 157 (т.е., человеческий сывороточный альбумин), и (8) поли(А) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «СР конструкция.»

[0246] Согласно некоторым аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (іі) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу IL-12β, (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер (например, первый линкер GS), (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу IL-12α, (у) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер (например, второй линкер GS), (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фрагмент, увеличивающий время полужизни, (например, человеческий сывороточный альбумин), (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер (например, третий линкер GS), и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую люмикан. Как описано в настоящем документе, согласно некоторым аспектам такой полинуклеотид дополнительно содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп, (2) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность, (3) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу ІІ-12β, (4) третью нуклеотидную последовательность, кодирующую первый линкер (например, линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12α, (6) пятую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй линкер (например, линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный фрагмент (например, альбумин), (8) седьмую нуклеотидную последовательность, кодирующую третий линкер (например, линкер GS), (9) восьмую нуклеотидную последовательность, кодирующую дополнительный фрагмент (например,

люмикан), и (12) поли(A) хвост. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп, (2) 5'-UTR, (3) промотор, (4) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность, (5) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12β, (6) третью нуклеотидную последовательность, кодирующую первый линкер (например, линкер GS), (7) четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую субъединицу IL-12α, (8) пятую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй линкер (например, линкер GS), (9) шестую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный фрагмент (например, альбумин), (10) седьмую нуклеотидную последовательность, кодирующую третий линкер (например, линкер GS), (11) восьмую нуклеотидную последовательность, кодирующую дополнительный фрагмент (например, люмикан), (12) 3'-UTR, и (13) поли(A) хвост. Дополнительное описание таких иллюстративных конструкций представлено ниже.

[0247] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая лидерную последовательность) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 48, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая субъединицу IL-12β) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 73, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая первый линкер) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 98, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты (*m.е.*, кодирующая субъединицу IL-12α) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 123, (v) пятая молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая второй линкер) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 144, (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая фрагмент, увеличивающий время полужизни,) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, как представлено в SEQ ID NO: 165, (vii) седьмая молекула нуклеиновой кислоты (m.e., кодирующая третий линкер) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 168, и (viii) восьмая молекула нуклеиновой кислоты (т.е., кодирующая люмикан) содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 171. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 48 (*m.e.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 73 (*m.e.*, субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 98 (т.е., первый линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 123 (*m.e.*, субъединица IL-12a), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено

в SEQ ID NO: 144 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 165 (*т.е.*, человеческий сывороточный альбумин), (8) седьмую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 168 (*т.е.*, третий линкер GS), (9) восьмую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 171 (*т.е.*, люмикан), и (10) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «С1 конструкция.»

[0248] Согласно некоторым аспектам (і) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 49, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 74, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 99, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEO ID NO: 124, (у) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 145, (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 166, (vii) седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 169, и (viii) восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 172. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 24. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 49 (*m.е.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 74 (m.e., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 99 (m.e., первый линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 124 (*m.e.*, субъединица IL-12 α), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 145 (*т.е.*, второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 166 (m.e., человеческий сывороточный альбумин), (8) седьмую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 169 (m.e., третий линкер GS), (9) восьмую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 172 (*т.е.*, люмикан), и (10) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «С2 конструкция.»

[0249] Согласно некоторым аспектам (i) первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 50, (ii) вторая молекула нуклеиновой кислоты

содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 75, (iii) третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 100, (iv) четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 125, (у) пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 146, (vi) шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 167, (vii) седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 170, и (viii) восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 173. Соответственно, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), как описано в настоящем документе, содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит один или несколько дополнительных признаков, как описано в настоящем документе. Например, согласно некоторым аспектам полинуклеотид согласно настоящему изобретению содержит (в направлении от 5' к 3'): (1) 5'-кэп (или аналог кэпа), (2) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 50 (*m.е.*, лидерная последовательность), (3) вторую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 75 (m.e., субъединица IL-12β), (4) третью нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 100 (*m.е.*, первый линкер GS), (5) четвертую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 125 (*m.e.*, субъединица IL-12a), (6) пятую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 146 (m.e., второй линкер GS), (7) шестую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 167 (m.e., человеческий сывороточный альбумин), (8) седьмую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 170 (т.е., третий линкер GS), (9) восьмую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 173 (m.e., люмикан), и (10) поли(A) хвост. Пример такого полинуклеотида описан в настоящем документе как «С3 конструкция.»

Липидная наночастица и система доставки

[0250] Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к доставке биологически активных молекул (например, белка IL-12) в клетки. Согласно определенным аспектам доставка может происходить in vivo (например, путем введения полинуклеотида, как описано в настоящем документе, субъекту) или ex vivo (например, путем культивирования полинуклеотида, как описано в настоящем документе, клетками in vitro). Согласно некоторым аспектам доставку полинуклеотида (например, выделенного полинуклеотида), как описано в настоящем документе, можно проводить с использованием подходящей системы доставки, известной в данной области техники. Согласно определенным аспектам системой доставки является вектор. Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к вектору,

содержащему полинуклеотид согласно настоящему изобретению. Подходящие векторы, которые можно применять, известны в данной области техники. *См.*, например, Sung et al., Biomater Res 23(8) (2019).

[0251] Согласно некоторым аспектам полинуклеотид, как описано в настоящем документе, (например, выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-12) доставляется с применением липидных наночастиц. Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к IL-12-экспрессирующему полинуклеотиду (например, PHK), инкапсулированному липидными наночастицами, его композиции и применению его композиции для лечения субъекта, страдающего раком или с подозрением на его наличие.

[0252] В контексте настоящего изобретения «липидная наночастица» (LNP) относится к везикуле, такой как сферическая везикула, имеющей непрерывный липидный бислой. Липидные наночастицы можно применять в способах, с помощью которых фармацевтические средства доставляются в целевые места. Неограничивающие примеры LNP включают липосомы, болаамфифилы, твердые липидные наночастицы (SLN), наноструктурированные липидные носители (NLC) и монослойные мембранные структуры (например, археосомы и мицеллы).

[0253] Согласно некоторым аспектам липидная наночастица содержит один или несколько типов липидов. Согласно настоящему изобретению липид относится к группе органических соединений, которые включают без ограничения сложные эфиры жирных кислот и согласно некоторым аспектам характеризуются тем, что они нерастворимы в воде, но растворимы во многих органических растворителях. Их обычно делят 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 липиды», такие как стероиды. Неограничивающие примеры липидов включают триглицериды (например, тристеарин), диглицериды (например, глицерола бегенат), моноглицериды (например, глицерола моностеарат), жирные кислоты (например, стеариновая кислота), стероиды (например, холестерин) и воски (например, цетилпальмитат). Согласно некоторым аспектам один или несколько типов липидов в LNP содержат катионный липид. Согласно некоторым аспектам один или несколько типов липидов в LNP содержат липидоид, например, ТТ3. Соответственно, согласно некоторым аспектам любой из полинуклеотидов, как описано В настоящем документе, (например, содержащий последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 1-25, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост) может быть инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 1, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 2, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO:

3, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 4, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 5, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 6, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 7, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 8, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 9, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 10, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 11, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 12, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 13, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 14, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 15, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 16, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 17, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 18, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост,

где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТЗ). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 19, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 20, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТЗ). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 21, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 22, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТЗ). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEO ID NO: 23, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 24, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(A) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3). Согласно некоторым аспектам полинуклеотид содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 25, 5'-кэп (или аналог кэпа) и поли(А) хвост, где полинуклеотид инкапсулирован в липидоидную наночастицу (например, ТТ3).

[0254] Такие липиды, полезные согласно настоящему изобретению, включают без ограничения N1,N3,N5-трис(3-(дидодециламино)пропил)бензол-1,3,5-трикарбоксамид (ТТ3), N-(2,3-диолеоилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTAP), липофектамин, 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопрпан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLenDMA), диоктадецилдиметиламмоний (DODMA), дистеарилдиметиламмоний (DSDMA), N,N-диолеил-N,N-диметиламмония хлорид (DODAC), N-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA), N-N-дистеарил-N,N-диметиламмония бромид (DDAB), 3-(N—(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил)холестерин (DC-Chol) и N-(1,2-димиристилокспроп-3-ил)-N,N-диметил-N-гидроксиэтиламмония бромид (DMRIE).

[0255] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения липиды, например, липидоид, представляют собой ТТЗ. ТТЗ согласно настоящему изобретению способен образовывать липидные наночастицы для доставки различных биологически активных средств в клетки. Кроме того, настоящее изобретение также демонстрирует, что незагруженные ТТЗ-LNP могут индуцировать иммуногенную гибель клеток (ICD) в раковых клетках *in vivo* и *in vitro*. Иммуногенная гибель клеток, как описано в настоящем документе, относится к форме гибели клеток, которая может индуцировать эффективный иммунный ответ посредством активации дендритных клеток (DC) и последующей активации специфического Т-клеточного ответа. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения клетки, которые подвергаются иммуногенной гибели клеток, представляют собой опухолевые клетки. Иммуногенная гибель опухолевых клеток может

вызвать эффективный противоопухолевый иммунный ответ. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения липидная наночастица содержит ТТ3-LNP, инкапсулирующую нуклеотидную последовательность, кодирующую IL-12 (модРНК), кодирующую только репортерный ген (ТТ3-LNP-модРНК). Нуклеотидная последовательность, кодирующая IL-12, может работать синергетически с ТТ3-LNP, индуцируя более высокий уровень ICD в опухолевых клетках по сравнению с только ТТ3-LNP. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения липидная наночастица содержит ТТ3-LNP, инкапсулирующую модРНК, кодирующую молекулу IL-12. IL-12, который представляет собой иммунорегуляторный цитокин, вызывает мощный иммунный ответ против локальной опухоли. Комбинация экспрессии ТТ3-LNP, модРНК и IL-12 не только эффективна в синергическом ингибировании опухолевых клеток на месте, но также вызывает системный противоопухолевый иммунный ответ, убивающий дистальные опухолевые клетки и предотвращающий рецидив опухоли.

[0256] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения катионный липид представляет собой DOTAP. DOTAP согласно настоящему изобретению также способен образовывать липидные наночастицы. DOTAP можно применять для высокоэффективной трансфекции ДНК, включая дрожжевые искусственные хромосомы (YAC), в эукариотические клетки для временной или стабильной экспрессии генов, а также он является подходящим для эффективного переноса других отрицательно заряженных молекул, таких как РНК, олигонуклеотиды, нуклеотиды, комплексы рибонуклеопротеинов (RNP) и белки, в исследовательские образцы клеток млекопитающих.

[0257] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения катионный липид представляет собой липофектамин. Липофектамин согласно настоящему изобретению представляет собой распространенный реагент для трансфекции, производимый и продаваемый Invitrogen, используемый в молекулярной и клеточной биологии. Его применяют для повышения эффективности трансфекции РНК (включая мРНК и киРНК) или плазмидной ДНК в клеточные культуры in vitro путем липофекции. Липофектамин содержит липидные субъединицы, которые могут образовывать липосомы или липидные наночастицы в водной среде, захватывая полезную загрузку трансфекции, например, модРНК. РНК-содержащие липосомы (положительно заряженные на своей поверхности) могут сливаться с отрицательно заряженной плазматической мембраной живых клеток благодаря нейтральному колипиду, опосредующему слияние липосомы с клеточной мембраной, позволяя молекулам загрузки нуклеиновой кислоты проникать в цитоплазму для репликации или экспрессии.

[0258] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения LNP состоят в основном из катионных липидов наряду с другими липидными ингредиентами. Они обычно включают другие липидные молекулы, принадлежащие без ограничения к классу фосфатидилхолина (РС) (например, 1,s-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), стеролы (например, холестерин) и полиэтиленгликоль (РЕG)-липидные конъюгаты (например, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[фолат(полиэтиленгликоль)-2000

(DSPE-PEG2000) и C14-PEG2000. В таблице 2 показаны составы иллюстративных LNP, ТТ3-LNP и DOTAP-LNP.

Таблица 2.

Молярное	DOTAP	DSPC	Холестерин	DSPE-PEG2000
соотношение	40	10	48	2
DOTAP-LNP				
Молярное	TT3	DOPE	Холестерин	C14-PEG2000
	20	30	40	0,75
соотношение	20	30	40	0,73
TT3-LNP				

[0259] Согласно некоторым аспектам LNP содержит C14-PEG2000. Согласно определенным аспектам C14-PEG2000 содержит 1,2-димиристоил-гас-глицеро-3метоксиполиэтиленгликоль-2000 (DMG-PEG2000), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DMPE-PEG2000) или оба. Как описано в настоящем документе, (см., например, Пример 3), согласно некоторым аспектам C14-PEG2000 (или другие липидные ингредиенты, раскрытые в настоящем документе) могут встраиваться в LNP перед инкапсулированием полинуклеотида. Согласно некоторым аспектам С14-РЕG2000 (или другие липидные ингредиенты, раскрытые в настоящем документе) могут добавляться к LNP после инкапсулирования полинуклеотида. Например, согласно определенным аспектам полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид), содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-12 (например, субъединицу IL-12α и/или IL-12β), инкапсулируется в LNP, а затем C14-PEG2000 (или другие липидные ингредиенты, раскрытые в настоящем документе) присоединяется к LNP с использованием, например, мицелл.

[0260] Размер частиц липидных наночастиц может влиять на скорость высвобождения лекарственного средства, биораспределение, мукоадгезию, поглощение клеткой воды и буферный обмен внутри наночастиц, а также на диффузию белка. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения диаметр LNP находится в диапазоне от около 30 до около 500 нм. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения диаметр LNP находится в диапазоне от около 30 до около 30 до около 500 нм, от около 50 до около 400 нм, от около 70 до около 300 нм, от около 100 до около 200 нм, от около 100 до около 175 нм или от около 100 до около 160 нм. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения диаметр LNP может составлять около 30 нм, около 40 нм, около 50 нм, около 60 нм, около 70 нм, около 80 нм, около 90 нм, около 100 нм, около 101 нм, около 102 нм, около 103 нм, около 104 нм, около 105 нм, около 106 нм, около 107 нм, около 108 нм, около 109 нм, около 110 нм, около 111 нм, около 112 нм, около 113 нм, около 114 нм, около 116 нм, около 116 нм, около 117 нм, около 118 нм, около 119 нм, около 119 нм, около 130 нм, около 140 нм, около 150 нм, около 150 нм, около 118 нм, около 118 нм, около 119 нм, около 120 нм, около 130 нм, около 140 нм, около 150 нм

или около 160 нм. Согласно определенным аспектам липидная наночастица имеет диаметр около 140 нм.

[0261] Дзета-потенциал представляет собой меру эффективного электрического заряда на поверхности липидной наночастицы. Величина дзета-потенциала обеспечивает сведения о стабильности частицы. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения дзета-потенциал LNP находится в диапазоне от около 3 до около 6 мВ. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения дзета-потенциал LNP может составлять около 3 мВ, около 3,1 мВ, около 3,2 мВ, около 3,3 мВ, около 3,4 мВ, около 3,5 мВ, около 3,6 мВ, около 3,7 мВ, около 3,8 мВ, около 3,9 мВ, около 4 мВ, около 4,1 мВ, около 4,2 мВ, около 4,3 мВ, около 4,4 мВ, около 4,5 мВ, около 4,6 мВ, около 4,7 мВ, около 4,8 мВ, около 4,9 мВ, около 5 мВ, около 5,1 мВ, около 5,2 мВ, около 5,3 мВ, около 5,4 мВ, около 5,5 мВ, около 5,6 мВ, около 5,7 мВ, около 5,8 мВ, около 5,9 мВ или около 6 мВ.

[0262] Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится инкапсулированному липидными наночастицами (LNP) полинуклеотиду (например, мРНК). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения массовое соотношение липида LNP и полинуклеотида (например, мРНК) находится в диапазоне от около 1:2 до около 15:1. Согласно некоторым аспектам массовое соотношение липида и полинуклеотида (например, мРНК) может составлять около 1:2, около 1:1,9, около 1:1,8, около 1:1,7, около 1:1,6, около 1:1,5, около 1:1,4, около 1:1,3, около 1:1,2, около 1:1,1, около 1:1, около 1,1:1, около 1,2:1, около 1,3:1, около 1,4:1, около 1,5:1, около 1,6:1, около 1,7:1, около 1,8:1, около 1,9:1, около 2:1, около 2,5:1, около 3:1, около 3,5:1, около 4:1, около 4:5:1, около 5:1, около 5:1, около 6:1, около 6:5:1, около 7:1, около 7:5:1, около 8:1, около 8,5:1, около 9:1, около 9,5:1, около 10:1, около 10,5:1, около 11:1, около 11,5:1, около 12:1, около 12,5:1, около 13:1, около 13,5:1, около 14:1, около 14,5:1 или около 15:1. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения массовое соотношение липида и полинуклеотида (например, мРНК) составляет около 10:1.

Фармацевтические композиции

[0263] Согласно некоторым изобретение аспектам настоящее относится фармацевтической композиции, содержащей полинуклеотид, вектор и/или липидную наночастицу, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель (вспомогательное вещество). Согласно настоящему изобретению «приемлемый» означает, что носитель должен быть совместим с активным ингредиентом композиции и не оказывать вредного воздействия на субъекта, подлежащего лечению. Согласно некоторым аспектам носитель способен стабилизировать активный ингредиент. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (носители) включают буферы, которые хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkoins, Ed. K. E. Hoover.

[0264] Фармацевтические композиции, применяемые для in vivo введения, должны быть стерильными. Это легко достигается, например, фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны. Липидные наночастицы могут быть помещены в контейнер со стерильным входным отверстием, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

[0265] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть составлена для внутриопухолевого, интратекального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, ингаляционного, внутрикожного, внутрилимфатического, внутриглазного, интраперитонеального, интраплеврального, интраспинального, внутрисосудистого, назального, чрезкожного, сублингвального, подслизистого, трансдермального или трансмукозального введения. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть составлена для внутриопухолевой инъекции. Внутриопухолевая инъекция согласно настоящему изобретению относится к прямым инъекциям в опухоль. Высокая концентрация композиции может быть достигнута in situ при использовании небольших количеств лекарственных средств. Локальная доставка иммунотерапии позволяет использовать несколько комбинированных терапий, предотвращая при этом значительное системное воздействие и нецелевую токсичность.

[0266] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть составлена для внутримышечной инъекции, внутривенной инъекции или подкожной инъекции.

[0267] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемые носители, буферные агенты, вспомогательные вещества, соли или стабилизаторы в форме лиофилизированных составов или водных растворов. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover. Приемлемые носители и вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и содержат буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту И метионин, консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол), низкомолекулярные (менее около 10 остатков) полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны, хелатирующие агенты, такие как EDTA, сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как $TWEEN^{TM}$, $PLURONICS^{TM}$ или полиэтиленгликоль (PEG).

[0268] Согласно некоторым аспектам фармацевтическая композиция, как описано в настоящем документе, содержит липидные наночастицы, которые могут быть получены способами, известными в данной области техники, такими как описанные в Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985), Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980), и патентах США № 4485045 и 4544545, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США № 5013556, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно некоторым аспектам липосомы могут быть получены способом обращенно-фазового испарения с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и РЕG-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (РЕG-РЕ). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор с получением липосом желаемого диаметра.

[0269] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фармацевтическая композиция составлена в формате замедленного высвобождения. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие липидные наночастицы, причем матрицы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают без ограничения сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPROM DEPO T^{TM} (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида), изобутират ацетата сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

[0270] Согласно некоторым аспектам подходящие поверхностно-активные агенты включают без ограничения неионные агенты, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, TWEENTM 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, SPANTM 20, 30, 60, 80 или 85). Согласно некоторым аспектам композиции с поверхностно-активным веществом содержат от 0,05 до 5% поверхностно-активного вещества. Согласно некоторым аспектам композиция содержит 0,1 и 2,5%. Следует понимать, что при необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например, маннит или другие фармацевтически приемлемые носители.

[0271] Согласно некоторым аспектам фармацевтическая композиция имеет стандартные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии или суппозитории, для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляционного введения или инсуффляции.

[0272] Для получения твердых композиций, таких как таблетки, основной активный ингредиент может быть смешан с фармацевтическим носителем, *например*, с обычными ингредиентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальция фосфат или камеди, и другими фармацевтическими разбавителями, например, водой, с образованием твердой предварительно

составленной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения согласно настоящему изобретению или его нетоксичной фармацевтически приемлемой соли. Когда предварительно составленные композиции указаны как гомогенные, подразумевается, что активный ингредиент равномерно распределен по всей композиции, так что композицию можно легко разделить на одинаково эффективные стандартные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Эту твердую композицию предварительного состава затем разделяют на стандартные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие от около 0,1 до около 500 мг активного ингредиента согласно настоящему изобретению. Таблетки или пилюли новой композиции могут быть покрыты или иным образом составлены для получения лекарственной формы, обладающей преимуществом пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля могут содержать внутреннюю дозу и внешнюю дозу, причем последняя имеет форму оболочки поверх первой. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который служит для предотвращения распада в желудке и позволяет внутреннему компоненту пройти неповрежденным в двенадцатиперстную кишку или высвобождаться с задержкой. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий можно использовать различные материалы, такие материалы включают ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

[0273] Подходящие эмульсии могут быть получены с использованием коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как INTRALIPIDTM, LIPOSYNTM, INFONUTROLTM, LIPOFUNDINTM и LIPIPHYSANTM. Активный ингредиент может быть либо растворен в предварительно смешанной эмульсионной композиции, либо альтернативно он может быть растворен в масле (*например*, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле) и эмульсии, образованной при смешивании с фосфолипидом (*например*, яичными фосфолипидами, соевыми фосфолипидами или соевым лецитином) и водой. Следует понимать, что могут быть добавлены другие ингредиенты, например, глицерин или глюкоза, для регулирования тоничности эмульсии. Подходящие эмульсии обычно содержат до около 20% масла, например, от около 5 до около 20%. Жировая эмульсия может содержать капельки жира подходящего размера и может иметь значение рН в диапазоне от около 5,5 до около 8,0.

[0274] Фармацевтические композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях, а также порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как указано выше. Согласно некоторым аспектам композицию вводят пероральным или назальным респираторным путем для местного или системного действия.

[0275] Композиции в фармацевтически приемлемых растворителях можно распылять с помощью газов. Распыляемые растворы можно вдыхать непосредственно из распылителя или распылитель можно прикрепить к лицевой маске, тенту или дыхательному аппарату

периодического действия с положительным давлением. Растворы, суспензии или порошковые композиции можно вводить с помощью устройств, которые доставляют состав соответствующим образом.

Терапевтические применения

[0276] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения полинуклеотиды, векторы, липидные наночастицы и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем документе (также в объем упоминаемые в настоящем документе как «композиции») применяют для лечения заболевания или нарушения. Согласно определенным аспектам заболевание или нарушение представляет собой рак. Неограничивающие примеры раковых заболеваний, которые можно лечить, представлены в другой части настоящего документа.

[0277] Согласно некоторым аспектам эффективное количество любой из композиций, как описано в настоящем документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, подходящим путем, таким как внутриопухолевое введение, внутривенное введение (например, в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение периода времени), внутримышечным, интраперитонеальным, внутримозговым, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, интратекальным, пероральным, ингаляционным или местным путями. Коммерчески доступные распылители для жидких составов, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители, полезны для введения. Жидкие составы можно распылять, а лиофилизированный порошок можно распылять после восстановления. Согласно некоторым аспектам фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, вводят в виде аэрозоля с использованием фторуглеродного состава и дозирующего ингалятора или вдыхают в виде лиофилизированного и измельченного порошка. Согласно некоторым аспектам фармацевтическая композиция, как описано в настоящем документе, составлена для внутриопухолевой инъекции. Согласно некоторым аспектам фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, вводят субъекту локальным путем, например, путем инъекции в локальный участок, такой как очаг опухоли или инфекционный очаг. Согласно некоторым аспектам субъектом является человек.

[0278] Как очевидно на основании настоящего раскрытия, согласно некоторым аспектам композиции, как описано в настоящем документе, вводят субъекту в количестве, эффективном для оказания терапевтического эффекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими активными агентами. Согласно некоторым аспектам композиции вводят субъекту, страдающему раком, и терапевтический эффект содержит снижение опухолевой массы, уменьшение количества раковых клеток, повышение иммунной активности или их комбинации. Достигает ли введенная композиция (например, липидная наночастица) терапевтический эффект, можно определить с использованием любых подходящих способов, известных в данной области техники (например, измерение объема опухоли и/или активности Т-клеток). Эффективные количества варьируют, как известно специалистами в данной области техники, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров

пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, пол и вес, продолжительности лечения, характера сопутствующей терапии (если применяется), конкретного.

[0279] Эмпирические признаки, такие как время полужизни, как правило, будут способствовать определению дозы. Частота введения может быть определена и урегулирована в ходе терапии и обычно, но не обязательно, основана на лечении, и/или подавлении, и/или улучшении состояния, и/или замедлении целевого заболевания/нарушения. В качестве альтернативы могут быть подходящими составы композиции с замедленным непрерывным высвобождением, как описано в настоящем документе (например, липидные наночастицы). В данной области техники известны различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения.

[0280] Согласно некоторым аспектам присутствия освещения лечение представляет собой однократную инъекцию состава согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым аспектам однократная инъекция вводится внутриопухолево субъекту, нуждающемуся в этом.

[0281] Согласно некоторым аспектам присутствия доза композиции, как описано в настоящем документе, может быть определена эмпирически у индивидуумов, которые получили одно или несколько введений композиции (например, липидной наночастицы, как описано в настоящем документе,). Согласно некоторым аспектам индивидуумам вводят возрастающие дозы композиции, как описано в настоящем документе. Для оценки эффективности композиции согласно настоящему изобретению можно следить за индикатором заболевания/нарушения. При повторных введениях в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, согласно некоторым аспектам лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов или пока не будут достигнуты достаточные терапевтические уровни для облегчения целевого заболевания, или нарушения, или его симптома.

[0282] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения частота введения дозы составляет около один раз каждую неделю, около один раз каждые 2 недели, около один раз каждые 3 недели, около один раз каждые 4 недели, около один раз каждые 5 недель, около один раз каждые 6 недель, около один раз каждые 7 недель, около один раз каждые 8 недель, около один раз каждые 9 недель или около один раз каждые 10 недель, или около один раз в месяц, примерно около каждые 2 месяца или около каждые 3 месяца или более. Режим дозирования (например, доза и/или частота введения дозы) применяемой композиции, как описано в настоящем документе, (например, липидной наночастицы) может меняться с течением времени.

[0283] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения способ предусматривает введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или нескольких доз композиции, как описано в настоящем документе.

[0284] Подходящая доза композиции (*например*, липидной наночастицы, как описано в настоящем документе,) будет зависеть от конкретной композиции (*например*, липидная наночастица), типа и тяжести заболевания/нарушения (*например*, рак), вводят ли композицию (*например*, липидная наночастица) в профилактических или терапевтических целях,

предшествующей терапии, анамнеза субъекта и ответа на композицию (например, липидная наночастица), и от решения лечащего врача. Согласно некоторым аспектам, клиницист может вводить композицию согласно настоящему изобретению до тех пор, пока не будет достигнута доза, обеспечивающая желаемый результат. Согласно некоторым аспектам желаемым результатом является снижение опухолевой нагрузки, уменьшение количества раковых клеток или усиление иммунной активности. Введение одной или нескольких композиций, как описано в настоящем документе, может быть непрерывным или периодическим, в зависимости, например, от физиологического состояния реципиента, от того, является ли цель введения терапевтической или профилактической, а также от других факторов, известных специалистам-практикам. Введение композиции, как описано в настоящем документе, может быть по существу непрерывным в течение предварительно выбранного периода времени или может осуществляться серией разнесенных доз, например, до, во время или после развития целевого заболевания или нарушения.

[0285] В контексте настоящего изобретения облегчение целевого заболевания/нарушения включает задержку развития или прогрессирования заболевания или снижение тяжести заболевания. Облегчение заболевания необязательно требует лечебных результатов. В контексте настоящего изобретения термин «задержка» развития целевого заболевания или нарушения означает отсрочку, препятствие, замедление, задержку, стабилизацию и/или отсрочку прогрессирования заболевания. Эта задержка может быть различной продолжительности, в зависимости от истории заболевания и/или субъекта, подлежащего лечению. Способ, который отсрочивает или уменьшает развитие заболевания или отсрочивает начало заболевания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития одного или нескольких симптомов заболевания в заданный период времени и/или уменьшает выраженность симптомов в заданный период времени, по сравнению с тем, когда способ не применяют. Такие сравнения обычно основаны на клинических исследованиях с использованием количества субъектов, достаточного для получения статистически значимого результата.

[0286] Согласно некоторым аспектам композицию, как описано в настоящем документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, достаточном для снижения опухолевой нагрузки или роста раковых клеток in vivo на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или более. Согласно некоторым аспектам композицию, как описано в настоящем документе, вводят в количестве, достаточном для повышения иммунной активности на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 90% или более.

[0287] Согласно некоторым аспектам введение композиции (*например*, полинуклеотид, вектор, липидная наночастица или фармацевтическая композиция, как описано в настоящем

документе,) субъекту повышает иммунную активность, такую как Т-клеточная активность, у субъекта. Согласно определенным аспектам иммунная активность повышается или увеличивает в по меньшей мере около 0,5 раз, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 50 раз или более, по сравнению с иммунной активностью контрольного субъекта (например, субъекта до введения композиции или соответствующий субъект, который не ответил на введение композиции).

[0288] Согласно некоторым аспектам субъектом является человек, страдающий раком, имеющий подозрение на его наличие или подверженный риску рака. Согласно некоторым аспектам рак выбран из группы, состоящей из меланомы, плоскоклеточного рака, мелкоклеточного рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, рака брюшной полости, печеночноклеточного рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, глиобластомы, рака шейки матки, рака яичников, рака печени, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака ободочной кишки, колоректального рака, эндометриального рака или рака матки, карциномы слюнной железы, рака почек, рака предстательной железы, рака вульвы, рака щитовидной железы, гепатокарциномы, рака желудка и различных типов рака головы и шеи, включая плоскоклеточный рак головы и шеи. Согласно некоторым аспектам раком может быть меланома, рак легкого, колоректальный рак, почечноклеточный рак, уротелиальная карцинома или лимфома Ходжкина.

[0289] Субъект, страдающий целевым заболеванием или нарушением, может быть идентифицирован с помощью обычного медицинского осмотра, например, лабораторных анализов, функциональных тестов органов, компьютерной томографии или ультразвукового исследования. У субъекта, имеющего подозрение на наличие целевого заболевания или нарушения, может проявляться один или несколько симптомов заболевания или нарушения. Субъект, имеющий риск заболевания или нарушения, может быть субъектом, имеющим один или несколько факторов риска, связанных с этим заболеванием или нарушением. Субъект, имеющий риск заболевания или нарушения, также может быть идентифицирован с помощью обычной медицинской практики.

[0290] Согласно некоторым аспектам композицию, как описано в настоящем документе, совместно вводят с по меньшей мере одним дополнительным подходящим терапевтическим средством. Согласно некоторым аспектам по меньшей мере одно дополнительное подходящее терапевтическое средство содержит противораковое средство, противовирусное средство, антибактериальное средство или другие средства, которые служат для усиления и/или дополнения иммуностимулирующего действия композиции (например, липидная наночастица), как описано в настоящем документе. Другие примеры дополнительных терапевтических средств, которые можно применять в комбинации с композициям, как описано в настоящем документе, включают: химиотерапевтическое лекарственное средство, нацеленную противораковую терапию,

онколитическое лекарственное средство, цитотоксическое средство, иммунную терапию, цитокин, хирургическое вмешательство, лучевую терапию, активатор костимулирующей молекулы, ингибитор иммунных контрольных точек, вакцину, клеточную иммунотерапию или любую их комбинацию. Согласно некоторым аспектам композицию, как описано в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят субъекту последовательно, т.е. каждое терапевтическое средство вводят в разное время. Согласно некоторым аспектам композицию, как описано в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство вводят субъекту по существу одновременно.

[0291] Специалисту в данной области понятно, что любую комбинацию композиции, как описано в настоящем документе, и другого противоракового средства (например, химиотерапевтического средства) можно применять в любой последовательности для лечения рака. Комбинации, как описано в настоящем документе, могут быть выбраны на основе ряда факторов, которые включают без ограничения эффективность или уменьшение опухолевого образования или роста опухоли, уменьшение раковых клеток, повышение иммунной активности и/ или облегчение по меньшей мере одного симптома, связанного с раком, или эффективность смягчения побочных эффектов другого средства в комбинации. Например, комбинированная терапия, как описано в настоящем документе, может уменьшить любой из побочных эффектов, связанных с каждым отдельным членом комбинации, например, побочный эффект, связанный с противораковым средством.

[0292] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является химиотерапия, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, иммунотерапия или их комбинации. Согласно некоторым аспектам химиотерапевтическим средством является карбоплатин, цисплатин, доцетаксел, гемцитабин, наб-паклитексал, пеметрексед, винорелбин или их комбинации. Согласно некоторым аспектам лучевой терапией является ионизирующее излучение, гамма-излучение, нейтронно-лучевая радиотерапия, электронно-лучевая радиотерапия, протонная терапия, брахитерапия, системные радиоактивные изотопы, радиосенсибилизаторы или их комбинации. Согласно некоторым аспектам хирургическое вмешательство представляет собой лечебную операцию (например, операцию по удалению опухоли), профилактическую операцию, лапароскопическую операцию, лазерную операцию или их комбинации. Согласно некоторым аспектам иммунотерапия представляет собой адоптивный перенос клеток, терапевтические противораковые вакцины или их комбинации.

[0293] Согласно некоторым аспектам Согласно некоторым аспектам химиотерапевтическим средством являются агенты на основе платины, такие как карбоплатин, оксалиплатин, цисплатин, недаплатин, сатраплатин, лобаплатин, триплатин, тетранитрат, пикоплатин, пролиндак, ароплатин и другие производные, ингибиторы топоизомеразы I, такие как камптотецин, топотекан, иринотекан/SN38, рубитекан, белотекан и другие производные, ингибиторы топоизомеразы II, такие как этопозид (VP-16), даунорубицин, доксорубицин (например, доксорубицин, доксорубицин HCl, аналоги доксорубицина или доксорубицин и его соли

или аналоги в липосомах), митоксантрон, акларубицин, эпирубицин, идарубицин, амрубицин, амсакрин, пирарубицин, валрубицин, зорубицин, тенипозид и другие производные, антиметаболиты, такие как семейство фолиевых (метотрексат, пеметрексед, ралтитрексед, аминоптерин и родственные соединения), антагонисты пурина (тиогуанин, флударабин, кладрибин, 6-меркаптопурин, пентостатин, клофарабин и родственные соединения) и антагонисты пиримидина флоксуридин, азацитидин, тегафур, (цитарабин, кармофур, капацитабин, гемцитабин, гидроксимочевина, 5-фторурацил (5FU) и родственные соединения), алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (например, циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, мехлорэтамин, ифосфамид, трофосфамид, преднимустин, бендамустин, урамустин, эстрамустин и родственные соединения), нитромочевины (например, кармустин, ломустин, семустин, фотемустин, нимустин, ранимустин, стрептозоцин и родственные соединения), триазены (например, дакарбазин, алтретамин, темозоломид и родственные соединения), алкилсульфонаты (например, бусульфан, манносульфан, треосульфан и родственные соединения), прокарбазин, митобронитол и азиридины (например, карбоквон, триазиквон, ThioTEPA, триэтиленмаламин и родственные соединения), антибиотики, такие как гидроксимочевина, антрациклины (например, доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин и другие производные), антрацендионы (например, митоксантрон и его родственные соединения), семейство стрептомицетов (например, блеомицин, митомицин С, актиномицин, пликамицин), ультрафиолетовое излучение и их комбинации.

[0294] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является антитело. Антитела (предпочтительно моноклональные антитела) достигают своего терапевтического эффекта против раковых клеток посредством различных механизмов. Они могут оказывать прямое влияние на апоптоз или запрограммированную гибель клеток. Они могут блокировать компоненты путей передачи сигнала, такие как, например, рецепторы фактора роста, эффективно останавливая пролиферацию опухолевых клеток. В клетках, которые экспрессируют моноклональные антитела, они могут приводить к образованию антиидиотипических антител. Непрямые эффекты включают рекрутирование клеток, обладающих цитотоксичностью, таких как моноциты и макрофаги. Этот тип антитело-опосредованной гибели клеток называется антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC). Антитела также связывают комплемент, что приводит к прямой клеточной токсичности, известной как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Комбинация хирургических методов с иммунотерапевтическими лекарственными средствами или способами является успешным подходом, как, например, продемонстрировано в Gadri et al. 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. J Immunother. 32(4): 333-40. В следующем перечне представлены некоторые неограничивающие примеры противораковых антител и потенциальных мишеней антител (в скобках), которые можно применять в комбинации с настоящим изобретением: абаговомаб (СА-125), абциксимаб (СD41), адекатумумаб (ЕрСАМ), афутузумаб (CD20), алацизумаб пегол (VEGFR2), альтумомаб пентетат (CEA), аматуксимаб (MORAb-009), анатумаб мафенатокс (TAG-72), аполизумаб (HLA-DR), арцитумомаб (CEA),

бавитуксимаб (фосфатидилсерин), бектумомаб (CD22), белимумаб (BAFF), бевацизумаб (VEGF-A), биватузумаб мертанзин (CD44 v6), блинатумомаб (CD19), брентуксимаб ведотин (CD30 TNFRSF8), кантуксимаб мертансин (муцин CanAg), кантузумаб равтансин (MUC1), капромаб пендетид (клетки карциномы предстательной железы), карлумаб (CNT0888), катумаксомаб (EpCAM, CD3), цетуксимаб (EGFR), цитатузумаб богатокс (EpCAM), циксутумумаб (рецептор IGF-1), клаудиксимаб (клаудин), кливатузумаб тетраксетан (MUC1), конатумумаб (TRAIL-R2), дацетузумаб (СD40), далотузумаб (рецептор инсулиноподобного фактора роста I), деносумаб (RANKL), детумомаб (В-клетки лимфомы), дрозитумаб (DR5), экромексимаб (ганглиозид GD3), эдреколомаб (EpCAM), элотузумаб (SLAMF7), энаватузумаб (PDL192), энситуксимаб (NPC-1C), эпратузумаб (CD22), эртумаксомаб (HER2/neu, CD3), этарацизумаб (интегрин ανβ3), фарлетузумаб (рецептор фолиевой кислоты 1), FBTA05 (CD20), фиклатузумаб (SCH 900105), фигитумумаб (рецептор IGF-1), фланвотумаб (гликопротеин 75), фрезолимумаб (TGF-β), галиксимаб (CD80), ганитумаб (IGF-I), гемтузумаб озогамицин (CD33), гевокизумаб (IL-1β), гирентуксимаб (карбоангидраза 9 (CA-IX)), глембатумумаб ведотин (GPNMB), ибритумумаб тиуксетан (CD20), икрукумаб (VEGFR-1), иговома (CA-125), индатуксимаб равтансин (SDC1), интетумумаб (CD51), инотузумаб озогамицин (CD22), ипилимумаб (CD152), иратумумаб (CD30), лабетузумаб (CEA), лексатумумаб (TRAIL-R2), либивирумаб (поверхностный антиген гепатита B), линтузумаб (CD33), лорвотузумаб мертансин (CD56), лукатумумаб (CD40), люмиликсимаб (CD23), мапатумумаб (TRAIL-R1), матузумаб (EGFR), меполизумаб (IL-5), милатузумаб (CD74), митумомаб (ганглиозид GD3), могамулизумаб (CCR4), моксетумомаб пасудотокс (CD22), наколомаб тафенатокс (C242 антиген), наптумомаб эстафенатокс (5T4), нарнатумаб (RON), нецитумумаб (EGFR), нимотузумаб (EGFR), ниволумаб (IgG4), офатумумаб (CD20), оларатумаб (PDGF-R α), онартузумаб (киназа рецептора фактора роста гепатоцитов человека), опортузумаб монатокс (EpCAM), орегомаб (CA-125), окселумаб (OX-40), панитумумаб (EGFR), патритумаб (HER3), пемтумома (MUC1), пертузума (HER2/neu), пинтумомаб (антиген аденокарциномы), притумумаб (виментин), ракотумомаб (Nгликолилнейраминовая кислота), радретумаб (домен фибронектина-В), рафивирумаб (гликопротеин вируса бешенства), рамуцирумаб (VEGFR2), рилотумумаб (HGF), ритуксимаб (CD20), робатумумаб (рецептор IGF-1), самализумаб (CD200), сибротузумаб (FAP), силтуксимаб (IL-6), табалумаб (BAFF), такатузумаб тетраксетан (альфа-фетопротеин), таплитумомаб паптокс (CD19), тенатумомаб (тенасцин C), тепротумумаб (CD221), тицилимумаб (CTLA-4), тигатузумаб (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), тозитумомаб (CD20), трастузумаб (HER2/neu), TRBS07 (GD2), тремелимумаб (CTLA-4), тукотузумаб целмолейкин (EpCAM), ублитуксимаб (MS4A1), урелумаб (4-1ВВ), волоцисимаб (интегрин α5β1), вотумумаб (опухолевой антиген СТАА16.88), залутумумаб (EGFR), занолимумаб (CD4).

[0295] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является цитокин, хемокин, костимулирующая молекула, слитый белок или их комбинации. Примеры хемокинов включают без ограничения ССR7 и его лиганды ССL19 и ССL21, кроме того, ССL2, ССL3, ССL5 и ССL16. Другими примерами являются СХСR4, СХСR7 и СХСL12. Кроме

того, полезны костимулирующие или регуляторные молекулы, такие как, *например*, лиганды В7 (В7.1 и В7.2). Также полезны другие цитокины, такие как, *например*, особенно интерлейкины (*например*, IL-1 - IL17), интерфероны (*например*, IFNalpha1 - IFNalpha8, IFNalpha10, IFNalpha13, IFNalpha14, IFNalpha16, IFNalpha17, IFNalpha21, IFNbeta1, IFNW, IFNE1 и IFNK), гемопоэтические факторы, TGF (*например*, TGF-α, TGF-β и другие члены семейства TGF), наконец, члены семейства рецепторов фактора некроза опухоли и их лиганды, а также другие стимулирующие молекулы, включая без ограничения 41ВВ, 41ВВ-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.beta.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ, TNFRII, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4-1ВВ, ОХ40, GITR, GITRL, TACI, ВАFF-R, ВСМА, RELT и CD95 (Fas/APO-1), гликокортикоид-индуцированный TNFR-связанный белок, TNF рецепторродственный апоптоз-опосредующие белок (TRAMP) и рецептор смерти-6 (DR6). В частности, CD40/CD40L и ОХ40/ОХ40L являются важными мишенями для комбинированной иммунотерапии из-за их прямого влияния на выживаемость и пролиферацию Т-клеток. Обзор см. в Lechner et al. 2011: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340.

[0296] Согласно некоторым аспектам другим противораковым средством является бактериальная терапия. Исследователи использовали анаэробные бактерии, такие как Clostridium novyi, для поглощения внутренней части обедненных кислородом опухолей. Затем они должны погибнуть, когда вступят в контакт с насыщенными кислородом сторонами опухоли, это означает, что они будут безвредны для остальной части организма. Другая стратегия состоит в применении анаэробных бактерий, трансформированных ферментом, который может превращать нетоксичное пролекарство в токсичное лекарственное средство. При пролиферации бактерий в некротических и гипоксических участках опухоли фермент экспрессируется исключительно в опухоли. Таким образом, системно применяемое пролекарство метаболизируется в токсичное лекарственное средство только в опухоли. Было показано, что это эффективно в отношении непатогенных анаэробов Clostridium sporogene.

[0297] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является ингибитор киназы. Рост и выживание раковых клеток тесно связаны с нарушением регуляции активности киназы. Для восстановления нормальной активности киназы и, таким образом, снижения роста опухоли применяют широкий спектр ингибиторов. Группа целевых киназ содержит рецепторные тирозинкиназы, *например*, BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR-α, PDGFR-β, c-Kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, цитоплазматические тирозинкиназы, *например*, c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, серин/треонинкиназы, *например*, ATM, Aurora A & B, CDK, mTOR, PKCi, PLK, b-Raf, S6K, STK11/LKB1 и липидные киназы, *например*, PI3K, SK1. Ингибиторы киназы в форме малых молекул, *например*, PHA-739358, нилотиниб, дазатиниб и PD166326, NSC 743411, лапатиниб (GW-572016), канертиниб (CI-1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сутент (SU11248), сорафениб (BAY 43-9006)

и лефлуномид (SU101). Для получения дополнительной информации см., *например*, Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9, 28-39.

[0298] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является толл-подобный рецептор. Члены семейства толл-подобных рецепторов (TLR) являются важным связующим звеном врожденным и адаптивным иммунитетом, и действие многих адъювантов зависит от активации TLR. Большое количество установленных вакцин против рака включает лиганды для TLR для усиления ответа на вакцину. Помимо TLR2, TLR3, TLR4, особенно TLR7 и TLR8, были исследованы для лечения рака в подходах пассивной иммунотерапии. Близкородственные TLR7 и TLR8 вносят вклад в противоопухолевый ответ, воздействуя на иммунные клетки, опухолевые клетки и микроокружение опухоли, и могут активироваться структурными аналогами нуклеозидов. Все TLR применяли в качестве самостоятельных иммунотерапевтических средств или адъювантов противораковой вакцины, и их можно синергетически комбинировать с составами и способами согласно настоящему изобретению. Для получения дополнительной информации см. van Duin et al. 2005: Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology, 27(1):49-55.

[0299] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является ингибитор ангиогенеза. Ингибиторы ангиогенеза предотвращают экстенсивный рост кровеносных сосудов (ангиогенез), который необходим опухолям для выживания. Ангиогенез, стимулируемый опухолевыми клетками для удовлетворения их растущих потребностей в питательных веществах и кислороде, например, может быть блокирован путем нацеливания на различные молекулы. Неограничивающими примерами молекул, опосредующих ангиогенез, или ингибиторов ангиогенеза, которые можно комбинировать с настоящим изобретением, являются растворимый VEGF (изоформы VEGF VEGF121 и VEGF165, рецепторы VEGFR1, VEGFR2 и корецепторы нейропилин-1 и нейропилин-2) 1 и NRP-1, ангиопоэтин 2, TSP-1 и TSP-2, ангиостатин и родственные молекулы, эндостатин, вазостатин, кальретикулин, тромбоцитарный фактор-4, ТІМР и CDAI, Meth-1 и Meth-2, IFN-α, -β и -γ, CXCL10, IL-4, -12 и -18, протромбин (kringle-домен-2), фрагмент антитромбина III, пролактин, VEGI, SPARC, остеопонтин, маспин, канстатин, родственный пролиферину белок, рестин и такие лекарственные средства, как например, бевацизумаб, итраконазол, карбоксиамидотриазол, TNP-470, CM101, IFN-а, тромбоцитарный фактор-4, сурамин, SU5416, тромбоспондин, антагонисты VEGFR, ангиостатические стероиды + гепарин, фактор ингибирования ангиогенеза хряща, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, 2метоксиэстрадиол, текогалан, тетратиомолибдат, талидомид, тромбоспондин, ингибиторы пролактина Vβ3, линомид, таскинимод. См. Schoenfeld and Dranoff 2011: Анти-angiogenesis immunotherapy. Hum Vaccin. (9):976-81.

[0300] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является вакцина на основе вируса. Существует ряд противораковых вакцин на основе вирусов, доступных или разрабатываемых, которые можно использовать в комбинированном терапевтическом подходе вместе с составами согласно настоящему изобретению. Одним из

преимуществ использования таких вирусных векторов является присущая им способность инициировать иммунные ответы, при этом воспалительные реакции, возникающие в результате вирусной инфекции, создают сигнал опасности, необходимый для активации иммунитета. Идеальный вирусный вектор должен быть безопасным и не должен вызывать иммунный ответ против вектора, чтобы можно было усилить противоопухолевые специфические ответы. Рекомбинантные вирусы, такие как вирусы коровьей оспы, вирусы простого герпеса, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и вирусы avipox, применяли на животных моделях опухолей, и на основе их обнадеживающих результатов приступили к клиническим испытаниям на людях. Особенно важными вакцинами на основе вируса являются вирусоподобные частицы (VLP), небольшие частицы, содержащие определенные белки внешней оболочки вируса. Вирусоподобные частицы не содержат никакого генетического материала вируса и не могут вызывать инфекцию, но они могут быть сконструированы так, чтобы представлять опухолевые антигены на своей оболочке. VLP могут происходить из различных вирусов, таких как, например, вирус гепатита В или другие семейства вирусов, включая Parvoviridae (например, аденоассоциированный вирус), Retroviridae (например, ВИЧ) и Flaviviridae (например, вирус гепатита С). См. Sorensen and Thompsen 2007: «Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going?» APMIS 115(11):1177-93, virus-like particles against cancer are reviewed in Buonaguro et al. 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83, и Guillén et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2 (2), 128-133.

[0301] Согласно некоторым аспектам другим противораковым терапевтическим средством является таргетная терапия на основе пептидов. Пептиды могут связываться с рецепторами клеточной поверхности или пораженным внеклеточным матриксом, окружающим опухоль. Радионуклиды, присоединенные к этим пептидам (например, RGD), в конечном итоге убивают раковую клетку, если нуклид распадается вблизи клетки. Особенно большой интерес представляют олиго- или мультимеры этих мотивов связывания, поскольку это может привести к повышенной специфичности и авидности опухоли. Неограничивающие примеры см. в Yamada 2011: Peptidebased cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. Nihon Rinsho 69(9): 1657-61.

[0302] Согласно некоторым аспектам терапевтическое применение полинуклеотида (например, выделенного полинуклеотида), как описано в настоящем документе, содержит продукцию кодируемого белка IL-12. Соответственно, согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способу получения белка IL-12. Согласно определенным аспектам способ предусматривает контакт клетки с любой из композиций, как описано в настоящем документе, (например, полинуклеотидов, векторов, и/или липидных наночастиц) в условиях, подходящих для продукции кодируемого белка IL-12. Согласно некоторым аспектам способ дополнительно предусматривает очистку продуцированного белка IL-12. Согласно некоторым аспектам контакт

происходит *in vivo* (*например*, путем введения полинуклеотида, вектора и/или липидной наночастицы субъекту). Согласно некоторым аспектам контакт происходит *ex vivo* (*например*, путем культивирования клеток с полинуклеотидом, вектором и/или липидными наночастицами *in vitro*). Клетки (*например*, клетки-хозяева), содержащие полинуклеотид, вектор и/или липидную наночастицу, охватываются настоящим изобретением. Неограничивающие примеры клеток, которые можно применять, включают клетки гибридомы, способные к неограниченной пролиферации, клетку миеломы NS/0, клетку 293, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку НеL, клетку, полученную из амниотической жидкости человека (клетка CapT), клетку COS или их комбинации.

Наборы для применения для лечения

[0303] Настоящее изобретение также относится к наборам для применения для иммунотерапии против заболевания или нарушения, такого как рак (например, меланома, рак легких, колоректальный рак или почечноклеточный рак), и/или для лечения или снижения риска заболевания или нарушения (например, рака). Согласно некоторым аспектам набор включает один или несколько контейнеров, содержащих композицию, как описано в настоящем документе.

[0304] Согласно некоторым аспектам набор содержит инструкции по применению в соответствии с любым из способов, как описано в настоящем документе. Например, включенные инструкции могут включать описание введения фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, для лечения, отсрочки начала или облегчения целевого заболевания. Согласно некоторым аспектам инструкции содержат описание введения композиции, как описано в настоящем документе, субъекту с риском развития целевого заболевания/нарушения (например, рака).

[0305] Согласно некоторым аспектам инструкции содержат информацию о дозе, схеме дозирования и пути введения. Согласно некоторым аспектам контейнеры представляют собой стандартные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или субъединичные дозы. Согласно некоторым аспектам инструкции представляют собой письменные инструкции на этикетке или листе-вкладыше (например, на бумажном листе, входящем в комплект). Согласно некоторым аспектам инструкции представляют собой машиночитаемые инструкции (например, инструкции, хранящиеся на магнитном или оптическом диске).

[0306] Согласно некоторым аспектам этикетка или лист-вкладыш указывают, что композицию согласно настоящему изобретению применяют для лечения, отсрочки начала и/или облегчения заболевания или нарушения, таких как описанные в настоящем документе. Инструкции могут быть предоставлены для практического осуществления любого из способов, как описано в настоящем документе.

[0307] Согласно некоторым аспектам наборы, как описано в настоящем документе, находятся в подходящей упаковке. Согласно некоторым аспектам подходящая упаковка содержит флаконы, бутылки, банки, гибкие упаковки (*например*, майларовая пленка или пластиковые сумки)

или их комбинации. Согласно некоторым аспектам упаковка содержит упаковки для применения в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузий, такое как мининасос. Согласно некоторым аспектам набор содержит стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Согласно некоторым аспектам контейнер также может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Согласно некоторым аспектам по меньшей мере один активный агент представляет собой композицию, как описано в настоящем документе.

[0308] Согласно некоторым аспектам наборы дополнительно содержат дополнительные компоненты, такие как буферы и поясняющую информацию. Согласно некоторым аспектам набор содержит контейнер и этикетку или лист-вкладыш (листы-вкладыши) на контейнере или связанный (связанные) с ним. Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к изделиям, содержащим содержимое наборов, как описано в настоящем документе.

Общие методики

[0309] При практической реализации настоящего изобретения применяют, если не указано обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные иное, микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press, Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984), Methods in Molecular Biology, Humana Press, Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press, Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1987), Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press, Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Giffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons, Method of Enzymology (Academic Press, Inc.), Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), Gene Transfer Bertops for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987), Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al., eds., 1987): PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds., 1994), Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991), Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999), Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997), Antibodies (P. Finch, 1997), Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989), Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000), Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999), The Antibodies (M. Zanette and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995). Без дальнейшего уточнения полагают, что специалист в данной области техники может, основываясь на вышеприведенном описании, использовать настоящее раскрытие в его самой полной степени. Все публикации, процитированные в настоящем документе (включая

перечисленные выше и в других местах настоящего документа), включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Примеры

Пример 1. Конструирование нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-12S

[0310] Для конструирования полинуклеотидов согласно настоящему изобретению (*т.е.*, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок IL-12), применяли следующие материалы и способы:

Получение матрицы

[0311] Для репликона РНК получали вектор репликона VEE, содержащий полезную нагрузку. Используемые векторные остовы репликона VEE включали одну или несколько из следующих модификаций: (i) «АЗС»: представляет собой изменение в 5'-UTR остова VEE TC-83, которое усиливает экспрессию (см., например, Kulasegaran-Shylini, R., et al., Virology 287: 211-221 (2009)), (ii) «+E1»: указывает, что 3'-конец кодирующей области VEE «E1» был включен, (iii) «-E1»: указывает, что 3'-конец кодирующей области VEE «E1» не был включен, (iv) «Альтернативный»: представляет последовательность остова репликона VEE, описанную, например, в AddGene catalog number 58977, и Yoshioka, N., et al., Cell Stem Cell. 13(2):246-54 (2013), (v) «Разработанный»: указывает, что был включен набор мутаций, которые были идентифицированы как усиливающие экспрессию репликона VEE (см., например, Li, Y., et al., Scientific Reports 9:6932 (2019)).

[0312] Способы получения таких векторов известны в данной области техники. Векторную плазмиду дополнительно линеаризовали с использованием I-SceI следующим образом. Кратко, 1 мкг векторной плазмиды репликона обрабатывали I-SceI в буфере CutSmart в течение 1 часа при 37°C. Затем фермент инактивировали нагреванием при 65°C в течение 20 минут. Концентрация и объем различных компонентов представлены в Таблице 3 (ниже).

[0313] Дополнительные векторы, использованные в примерах, получали следующим образом. Вектор Альтернативный Разработанный -E1 SGP scar линеаризовали с использованием MIuI, следуя той же процедуре и условиям, которые использовали для I-SceI обработки вектора VEE. A3G+E1 (репРНК с чистым концом) расщепляли с использованием SapI, следуя той же процедуре и условиям, которые использовали для обработки I-SceI вектора VEE.

Таблица 3. Линеаризация векторных плазмид

Компонент	Объем (мкл)	Концентрация
ДНК-матрица		1 мкг
Буфер Cutsmart	5	1x
I-SceI	1	5 единиц
Вода	44	

[0314] Для матрицы модифицированной РНК (модРНК) вектор ДНК создавали с использованием плазмиды репликона с прямым праймером, содержащим промотор Т7 (ТАА ТАС GAC TCA CTA TA ATG GAC TAC GAC ATA GT, SEQ ID NO: 181), и SGP, и обратным праймером в 3'-UTR (GAA ATA TTA AAA ACA AAA TCC GAT TCG GAA AAG AA, SEQ ID NO: 185). Т_т для прямого и обратного праймеров составляла 68°C и 64°C, соответственно. В Таблицах 4 и 5 (ниже) приведена дополнительная информация в отношении реакции ПЦР.

Таблица 4. Параметры ПЦР

Компонент	25 мкл реакции	Конечная концентрация
10 мкМ прямой праймер	1,25 мкл	0,5 мкМ
10 мкМ обратный праймер	1,25 мкл	0,5 мкМ
Матричная ДНК	вариабельно	10 нг
2X Q5 Hot Start Master смесь	12,5 мкл	
вода без нуклеазной активности	до 25 мкл	

Таблица 5. Условия циклов ПЦР

Стадия	Температура	Время
Начальная денатурация	98°C	30 секунд
	98°C	10 секунд
30 циклов	65°C	15 секунд
	72°C	4 минут
Окончательное удлинение	72°C	4 минут
Поддержание	4–10°C	

[0315] Плазмидную ДНК (матрицу) в реакции ПЦР расщепляли DpnI. Более конкретно, 1 мкл DpnI на мкг исходной плазмиды добавляли к образцу для ПЦР и инкубировали в течение 1 часа при 37°C.

[0316] ПЦР (матрица модРНК) и ДНК репликона, обработанного I-SceI (матрица репРНК) проверяли на готовых гелях для подтверждения чистоты (ПЦР) и целостности (матрица репликона) реплицированной конструкции. В частности, 20 нг ДНК загружали в гель с 1,2% ДНК и проводили при 275 В в течение 7-10 минут. После подтверждения ДНК элюировали 20 мкл воды.

In Vitro транскрипция

[0317] Для транскрипции вышеуказанной ДНК в РНК использовали набор HiScribe High yield T7 (New England Biolabs) с модификациями, как описано в настоящем документе. Для синтеза модифицированной РНК (модРНК) компонент UTP набора заменяли на N1-метилпсевдоуридин-5'-трифосфат. Для того, чтобы начать процесс транскрипции *in vitro*, компоненты набора оттаивали на

льду, смешивали и подвергали импульсному центрифугированию в микроцентрифуге. Образец помещали на лед до дальнейшего использования.

[0318] Способ котранскрипционного кэпирования: для получения с использованием аналога кэпа плазмид репликона и матриц модРНК компоненты, приведенные в Таблице 6 (ниже), смешивали, центрифугировали в микроцентрифуге, а затем инкубировали при 37°С в течение трех часов в Thermomixer при 400 оборотах в минуту. Для контроля качества отбирали аликвоту объемом 1 мкл.

Таблица 6. Компоненты котранскрипционного кэпирования

Компонент	Объем	Конечная концентрация
Вода без нуклеазной активности	Х мкл	
10X реакционный буфер (NEB)	2 мкл	1X
ATP (100 MM)	2 мкл	10 мМ конечная
GTP (100 MM)	2 мкл	10 мМ конечная
UTP или N1-метилпсевдоUTP (100 мМ)	2 мкл	10 мМ конечная
CTP (100 MM)	2 мкл	10 мМ конечная
Аналог кэпа	1 мкл	
Матрица ДНК	Х мкл	1 мкг
Т7 РНК-полимераза смесь	2 мкл	
SUPERase Inh.	1 мкл	
Общий объем реакции	20 мкл	

[0319] Способ посттранскрипционного ферментативного кэпирования. В дополнение к способу котранскрипционного кэпирования, который проводили после IVT, для векторов, содержащих концевой «G» в промоторе T7, применяли способ посттранскрипционного ферментативного кэпирования. Этот способ предусматривал ферментативное получение мРНК «Кэп 1» после транскрипции in vitro. Для получения с использованием ферментативных плазмид репликона реакционную смесь собирали при комнатной температуре в порядке, показанном в Таблице 7.

Таблица 7. Компоненты посттранскрипционного ферментативного кэпирования

Компонент	Объем	Конечная концентрация
Вода без нуклеазной активности	Х мкл	
10X реакционный буфер (NEB)	2 мкл	1X
ATP (100 MM)	2 мкл	10 мМ конечная
GTP (100 MM)	2 мкл	10 мМ конечная
UTP или N1-метилпсевдоUTP (100 мМ)	2 мкл	10 мМ конечная

CTP (100 MM)	2 мкл	10 мМ конечная
Матрица ДНК	Х мкл	1 мкг
Т7 РНК-полимераза смесь	2 мкл	
SUPERase Inh.	1 мкл	
Общий объем реакции	20 мкл	

[0320] Обработка ДНКазой: после кэпирования способом котранскрипционного кэпирования или способом посттранскрипционного ферментативного кэпирования применяли фермент Turbo DNase. Не было необходимости добавлять 10-кратный буфер, так как фермент был активен в реакциях IVT. Реакционную смесь разбавляли до 50 мкл водой без нуклеазной активности. Затем к 20 мкл реакции IVT добавляли 5 мкл фермента (2 ЕД/мкл). Затем смесь инкубировали в течение 30 минут при 37 °C. После этого РНК очищали с использованием набора для очистки РНК Мonarch. Аликвоту объемом 1 мкл отбирали для контроля качества.

[0321] Кэпирование и 2'-О-метилирование: для получения метилированного гуанин-кэпа со структурой 2'-О-метилирования (кэп 1) на 5'-концах мРНК IVT, полученной с использованием описанного выше способа посттранскрипционного кэпирования, использовали следующий способ. Во-первых, некэпированную РНК и воду без нуклеазной активности смешивали до конечного объема 13 мкл. Затем смесь нагревали при 65 °C в течение 5 минут. Затем смесь помещали на лед еще на 5 минут. Затем к смеси добавляли компоненты, представленные в Таблице 8 (ниже), и инкубировали в течение 60 минут при 37 °C. Затем РНК очищали с использованием небольшого набора для очистки РНК Мопаrch.

Таблица 8. Компоненты кэпирования и 2'-О-метилирования

Компонент	Объем
Денатурированная некэпированная РНК (сверху)	13,0 мкл
10X буфер для кэпирования	2,0 мкл
GTP (10 MM)	1,0 мкл
SAM (4 мМ, разбавьте сток-раствор 32 мМ до 4 мМ)	1,0 мкл
Кэпирующий фермент коровьей оспы (10 ЕД/мкл)	1,0 мкл
мРНК кэп 2'-О-метилтрансфераза (50 ЕД/мкл)	1,0 мкл
SUPERase Inh	1,0 мкл
Bcero	20 мкл

[0322] Синтез поли(А) хвоста: для добавления поли(А)-хвостов к модифицированным РНК в реакционную пробирку добавляли компоненты, представленные в Таблице 9 (ниже). Затем реакцию инкубировали в течение 30 минут при 37 °C. Затем реакцию останавливали путем непосредственной очистки РНК с помощью небольшого набора для очистки Мопагсh. В качестве контроля качества 200 нг РНК помещали в гель с 1,2% РНК для подтверждения размера РНК. Для

этого РНК денатурировали 50% буфером для образцов формальдегида в течение 5 минут при 65 °C, а затем немедленно помещали на лед на по меньшей мере одну минуту. Затем денатурированную РНК наносили на гель и визуализировали с помощью трансиллюминатора.

[0323] *Очистка РНК*: транскрипт РНК, содержащий поли-А, очищали от примесей реакции IVT.

[0324] В таблице 9 (ниже) приведены различные конструкции РНК, экспрессирующие IL-12, полученные и проанализированные в следующих примерах. Все конструкции №1-№9 имеют scar на 3'-конце после полиА-хвоста (*m.е.* терминация 3'-конца ферментом рестрикции после SGP).

Таблица 9

Название конструкции	Описание конструкции
репРНК (Аналог кэпа) («Конструкция №1»)	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа
репРНК (Ферментативный) («Конструкция №2»)	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) способ ферментативного посттрансляционного кэпирования
репРНК (Аналог кэпа) АЗG +Е1 («Конструкция №3»)	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа + (iii) VEE вектор репликона, содержащий A3G и +E1 модификации
репРНК (Ферментативный) A3G+E1 («Конструкция №4»)	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) способ ферментативного посттрансляционного кэпирования + (iii) VEE вектор репликона, содержащий A3G и +E1 модификации
репРНК (Аналог кэпа) Альтернативный Разработанный +E1 («Конструкция №5»)	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа + (iii) VEE вектор репликона, содержащий Альтернативный, Разработанный и +E1 модификации
репРНК (Ферментативный) Альтернативный Разработанный +E1 («Конструкция №6»)	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) способ ферментативного посттрансляционного кэпирования + (iii) VEE вектор репликона, содержащий Альтернативный, Разработанный и +E1 модификации
репРНК (Аналог кэпа) Альтернативный +Е1	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа +

(«Конструкция №7»)	(iii) VEE вектор репликона, содержащий
	Альтернативный и +Е1 модификации
репРНК	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii)
(Аналог кэпа)	котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа +
A3G +E1 Разработанный	(iii) VEE вектор репликона, содержащий A3G, +E1 и
(«Конструкция №8»)	Разработанный модификации
репРНК	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii)
(Аналог кэпа)	котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа +
A3G -E1	(iii) VEE вектор репликона, содержащий A3G и -E1
(«Конструкция №9)	модификации
репРНК	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii) способ
(Ферментативный)	ферментативного посттрансляционного кэпирования
Альтернативный Разработанный	+ (iii) VEE вектор репликона, содержащий
-E1	Альтернативный, Разработанный и -Е1 модификации
SGP scar	+ (iv) 3'-концевая терминация scar фермента
(«Конструкция №10»)	рестрикции после SGP
Мод РНК	Несамореплицирующаяся модифицированная мРНК +
(Аналог кэпа)	
(«Конструкция №11»)	котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа
репРНК	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii)
(Аналог кэпа)	котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа +
A3G +E1	(iii) VEE вектор репликона, содержащий A3G и +E1
SGP scar	модификации + (iv) 3'- концевая терминация scar
(«Конструкция №12»)	фермента рестрикции после SGP
репРНК	(i) Самореплицирующаяся мРНК + (ii)
(Аналог кэпа)	котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа +
A3G + E1	(iii) VEE вектор репликона, содержащий A3G и +E1
чистый 3'-конец	модификации + (iv) 3'-концевая терминация чистой
(«Конструкция №13»)	полиА последовательностью

Пример 2. Анализ состава мРНК

Сравнение способов кэпирования по противоопухолевой эффективности

[0325] Для того, чтобы начать анализ различных конструкций РНК, полученных в приведенном выше Примере 1, мышиную модель меланомы применяли для сравнения противоопухолевой эффективности (i) репРНК, котранскрипционно кэпированная аналогом кэпа при 5' (т.е., конструкция № 1 в таблице 9) и (ii) репРНК, посттранскрипционно кэпированной ферментативным добавлением 5'-кэпа (*т.е.*, конструкция №2 в таблице 9). Кратко, меланому индуцировали путем инокуляции животным клеток В6-F10 (посредством подкожного введения).

Клеточные линии В16-F10 получали из Американской коллекции типовых культур (АТСС) и выращивали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 ЕД/мл пенициллина-стрептомицина и 2 мМ L-глутамина во влажном инкубаторе (37°С и 5% СО2). При слиянии ~80% клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), собирали из колб для культур тканей путем инкубации клеток в 0,25% трипсин-EDTA до отсоединения, дважды промывали в PBS и ресуспендировали в PBS при концентрации 2 миллиона клеток на мл. 1 миллион клеток имплантировали подкожно в левый задний бок самкам мышей С57ВL/6Ј в возрасте 6-8 недель, полученным из Jackson Laboratory. За мышами, несущими опухоли, наблюдали до тех пор, пока средний объем опухолей не достигал 350 мм³, затем мышей рандомизировали и затем вводили любую из вышеописанных конструкций путем внутриопухолевой инъекции с использованием 27-граммового шприца. Контрольных животных обрабатывали PBS. Размеры опухоли регистрировали три раза в неделю с помощью цифрового штангенциркуля, а объемы оценивали по следующей формуле: (1×w^2)×0,5, где 1=длина (самое длинное измерение), а w=наибольший диаметр опухоли, ось перпендикулярна длине.

[0326] Как показано на фиг. 1А и фиг. 1В, у животных, обработанных конструкцией №1 (т.е. репРНК, полученной с помощью котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа), объем опухоли значительно уменьшился по сравнению с животными из других групп лечения. Как и в контрольной группе, у животных, получавших конструкцию №2 (т.е. репРНК, полученная методом ферментативного посттрансляционного кэпирования), не удалось контролировать рост опухоли. Эти данные свидетельствовали о том, что способ котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа был благоприятным намного более по сравнению c методом ферментативного IL-12 посттрансляционного кэпирования при конструировании экспрессирующих самореплицирующихся конструкций, как описано в настоящем документе.

<u>Сравнение остовов репликона VEE по противоопухолевой эффективности</u>

[0327] Затем, для того, чтобы оценить, оказывали ли различные остовы репликона VEE, описанные в примере 1, какое-либо влияние на терапевтическую эффективность конструкций мРНК, снова использовали описанную выше мышиную модель меланомы. После достижения оптимального размера опухоли животным вводили одну внутриопухолевую инъекцию одного из следующих: (i) PBS, (ii) репРНК, полученная с использованием вектор A3G +E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №3» в Таблице 9), (iii) модифицированная мРНК (несамореплицирующаяся), полученная использованием котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №5» в Таблице 9), (iv) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №6» в Таблице 9), и (v) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный и ферментативного посттрансляционного кэпирования («Конструкция №7» в Таблице 9). Затем оценивали экспрессию белка IL-12 в опухолях на день 3 после введения. Также оценивали выживаемость обработанных животных.

[0328] Количественное определение белка IL-12 в тканях (например, в опухолях) проводили следующим образом. Ткани вырезали (например, через 72 часа после введения), взвешивали, мгновенно замораживали и затем лизировали в буфере для радиоиммунопреципитации. Концентрацию белка IL-12 в тканевых лизатах определяли с использованием коммерчески доступного сэндвич-иммуноферментного анализа (ELISA) против субъединицы р70 мышиного IL-12 в соответствии с протоколом производителя (BioLegend).

[0329] Как показано на фиг. 2, экспрессия IL-12 в месте доставки опухоли была выше у животных, получавших конструкцию №3 (m.e., репРНК, полученная с использованием вектора A3G+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа) , по сравнению с животными, получавшими любую конструкцию №5, либо конструкцию №6. В соответствии с данными экспрессии, животные, обработанные конструкцией №3 (m.e., репРНК, полученная с использованием вектора A3G+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа), также демонстрировали наибольшую выживаемость (cm. фиг. 3).

<u>Сравнение эффективности трансфекции и секреции IL-12</u>

[0330] Для дальнейшего анализа различных конструкций РНК, описанных в Примере 1, как эффективность трансфекции, так и секрецию IL-12 оценивали in vitro. Кратко, клетки B16.F10 (100000 клеток на лунку) разделяли на 24-луночные планшеты за один день до трансфекции. Затем клетки трансфицировали с помощью липофектамин messengerMAX в соответствии с инструкциями производителя, кратко, 100 нг общей РНК трансфицировали 1,5 мкл реагента липофектамин на лунку и инкубировали до желаемых временных точек (т.е., 24 и 48 часов после трансфекции). протестировали следующие специфические конструкции РНК: (і) репРНК, полученная с использованием вектора A3G+E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («конструкция 3» в Таблице 9), (ii) репРНК, полученная с использованием вектора АЗG+Е1 и ферментативного посттрансляционного кэпирования («Конструкция №4» в Таблице 9), (iii) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный +Е1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №5» в Таблице 9), (iv) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный +Е1 и ферментативного посттрансляционного кэпирования («Конструкция №6» в Таблице 9), (v) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный +E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №7» в Таблице 9), (vi) репРНК, полученная с использованием вектора Разработанный A3G +E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №8» в Таблице 9), (vii) репРНК, полученная с использованием вектора A3G -E1 и котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа («Конструкция №9» в Таблице 9), и (viii) репРНК, полученная с использованием вектора Альтернативный Разработанный –E1 SGP scar конец («Конструкция №10» в Таблице 9).

[0331] Для оценки эффективности трансфекции конструкций РНК использовали анализ FACS для измерения экспрессии IL-12 в клетках. Кратко, инкубацию с блокировкой транспорта

Гольджи устанавливали путем трипсинизации клеток с использованием 100 мкл трипсина. Затем добавляли полную среду с брефельдином А и затем клетки переносили в 96-луночный планшет для анализа с глубокими лунками. Затем планшет покрывали пленой и клетки инкубировали в полной среде с брефельдином А в течение 4 часов в инкубаторе для культивирования клеток. Окрашивание для определения мертвых клеток выполняли путем центрифугирования клеток в течение 5 мин, 400 х g. Клетки промывали в PBS и затем переносили в 96-луночные планшеты с V-образным дном, которые затем центрифугировали при 400 х g. Затем клетки ресуспендировали в красителе Zombie Live/Dead Green, разведенном в PBS, и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте. Клетки затем промывали буфером FACS, который содержал 1X PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺), 2 мМ EDTA, 2% BSA и 0,1% азида натрия. Затем клетки фиксировали путем ресуспендирования клеток в фиксирующем буфере и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте.

[0332] Клетки пермеабилизировали и цитоплазматические белки окрашивали следующим образом. Клетки промывали пермеабилизирующим/промывочным буфером и центрифугировали при 800 х g. Клетки ресуспендировали в цитоплазматическом коктейле антител и инкубировали при комнатной температуре в темноте. Клетки промывали пермеабилизирующим/промывочным буфером и центрифугировали при 800 х g, после чего промывали буфером FACS и центрифугировали при 800 х g. Затем образцы готовили для проточной цитометрии путем ресуспендирования клеток в буфере FACS. Анализ FACS клеток проводили с использованием красного и синего лазера на цитометре Attune Flow. После удаления клеточного дебриса и дублетов отдельные клетки анализировали на 2 каналах цитометра и гейтировали для количественного определения процента клеток, положительных по IL-12. Затем результаты наносили на график в программе Prism.

[0333] Для измерения секреции IL-12 использовали анализ ELISA. Кратко, супернатант для клеточных культур собирали для последующего анализа на основе ELISA для различных представляющих интерес белков. Для каждой временной точки образца супернатанта супернатант клеточной культуры из соответствующей лунки аспирировали в 96-луночный планшет с глубокими лунками, который можно хранить при -80°C для будущего использования. После сбора всех желаемых временных точек 96-луночный планшет, содержащий образцы супернатантов, центрифугировали при 500 g в течение 5 минут для осаждения любых оставшихся клеток. После центрифугирования ~350-400 мкл супернатанта аспирировали из планшета в свежий планшет с глубокими лунками, не нарушая осадок клеток. Затем супернатант разбавляли и тестировали в ELISA против мышиного IL-12 или человеческого IL-12 с использованием наборов Invitrogen ELISA в соответствии с инструкциями производителя, т.е., Invitrogen Mouse IL-12 р70 непокрытый набор ELISA, Invitrogen Human IL-12 р70 непокрытый набор ELISA. После сбора данных анализа ELISA строили стандартную кривую в Prism с использованием метода 4PL, и данные по концентрации интерполировали для всех образцов.

[0334] Как показано на фиг. 4А и 4В, конструкции вектора АЗG и +Е1 в целом лучше по сравнению с конструкциями Альтернативный, Разработанный, -Е1 или комбинациями. Более того, в соответствии с более ранними данными, конструкции аналога кэпа в целом работали лучше по сравнению с конструкциями с ферментативным кэпированием. Кроме того, репРНК АЗG+Е1 (Конструкция №3) показала лучшие результаты, чем другие протестированные конструкции репРНК в отношении экспрессии IL-12 и общей секреции белка через 24 и 48 часов (см. фиг. 4А и 4В, соответственно).

Сравнение терминации «чистый» и «scar» 3'-конец

[0335] Затем сравнивали эффективность трансфекции самореплицирующейся мРНК с 3'-концом, имеющим «чистую» последовательность полиА, с 3'-концом, терминированным scar фермента рестрикции. Кратко, для трансфекции клеток, как описано выше, использовали следующие конструкции: (i) репРНК, полученная с использованием котранскрипционное кэпирование аналогом кэпа и вектора АЗС + Е1 с 3'-концевой терминацией scar фермента рестрикции («Конструкция №12» в Таблице 10, круг и квадрат), (ii) репРНК, полученная с использованием котранскрипционного кэпирования аналогом кэпа вектором АЗС + Е1 с 3'-концевой терминацией чистой последовательностью полиА («Конструкция №13» в Таблице 10, треугольник и обратный треугольник). Затем оценивали экспрессию IL-12 в клетках с использованием анализа FACS, как описано выше.

[0336] Как показано на фиг. 5, 3'-концевая терминация чистой последовательностью полиА улучшает экспрессию *in vitro*.

Пример 3. Состав липидных наночастиц (LNP)

[0337] В настоящем примере получали и анализировали реплицирующуюся мРНК, инкапсулированную в LNP, содержащие катионные, фосфо- и PEG-липиды и холестерин, и составы LNP, содержащие катионные и фосфолипиды и холестерин (с PEG-липидными мицеллами, добавляемыми в раствор скорее в качестве независимого компонента, а не части LNP). Оцениваемые мРНК включали следующие реплицирующиеся мРНК mCherry: 1. TT3-DMG (остов A3G +E1) и 2. мицеллы TT3-роst PEG (остов A3G +E1).

[0338] Для получения обычных составов ТТЗ LNP использовали следующую процедуру. Каждый липидный материал взвешивали и растворяли в этаноле. Этанольную фазу получали путем смешивания всех липидных материалов в соответствии с массовым соотношением композиции, приведенным в Таблице 10 ниже. Водную фазу получали путем разбавления очищенной репРНК ЈК001 mCherry в 20 мМ цитратным буфером (рН 4,0), 300 мМ NaCl и воде, так что конечный состав соли составлял 10 мМ цитратного буфера (рН 4,0, 150 мМ NaCl). Обычные ТТЗ LNP получали путем смешивания этанольной фазы и водной фазы LNP посредством Т-образного смешивания при соотношении скоростей потока 3:1 (водная фаза: этанольная фаза).

Таблица 10

Компонент композиции ТТЗ LNP	Массовое соотношение
мРНК	1,0
TT3	10,0
DOPE	8,0
Холестерин	5,6
DMG-PEG-2K	0,7

[0339] Для получения составов LNP ТТЗ пост-РЕG мицеллы применяли следующую процедуру. Каждый липидный материал взвешивали и растворяли в этаноле. Этанольную фазу получали путем смешивания всех липидных материалов (*m.е.*, ТТЗ, DOPE и холестерина), кроме DMG-PEG-2K, в соответствии с массовым соотношением композиции, описанным ниже *см., например*, Таблицу 11а). Водную фазу получали путем разбавления очищенной репРНК ЈК001 mCherry (*m.е.*, мРНК) 20 мМ цитратным буфером (рН 4,0), 300 мМ NaCl и водой, так что конечный состав соли составлял 10 мМ цитратного буфера (рН 4,0, 150 мМ NaCl). Мицеллярную фазу РЕG получали путем добавления соответствующего объема DMG-PEG-2K в буфер ТВS и тщательного перемешивания на вортексе. Наконец, LNP ТТЗ пост-РЕG мицеллы получали путем первого смешивания этанольной фазы и водной фазы LNP через Т-образное смешивание при соотношении скоростей потока 3: 1 (водная фаза: этанольная фаза) с последующим немедленным разбавлением в потоке мицеллярной фазой РЕG посредством Т-образного смешивания при соотношении скоростей 1:1 (фаза LNP: фаза РЕG). Окончательный липидный состав LNP ТТЗ пост-РЕG мицеллы описан в Таблице 11b.

Таблица 11а

Компонент композиции LNP TT3	Массовое соотношение
мРНК	1,0
TT3	10,0
DOPE	8,0
Холестерин	5,6
PEG-DMG-2k мицелла	Массовое соотношение
DMG-PEG-2K	4,2 (относительно мРНК выше, которая не
	является частью мицеллы)

Таблица 11b

Компонент композиции TT3 LNP	Массовое соотношение
мРНК	1,0

TT3	10,0
DOPE	8,0
Холестерин	5,6
DMG-PEG-2K	4,2

[0340] Приведенные выше составы LNP TT3 подвергали замене буфера и замораживали/оттаивали следующим образом. Полученные LNP TT3 переносили в диализные кассеты и подвергали диализу в буфере TBS в течение 2 часов. Во все приготовленные TT3 LNP добавляли 40% сахарозы (мас./об.) в сток-растворе TBS с получением конечного раствора TT3 LNP в 10% сахарозе. Конечные концентрации PHK LNP измеряли путем диссоциации LNP с 2% TE + Triton и далее определяли с помощью анализа Qubit. LNPTT3 делили на аликвоты по 50 мкл/пробирка и помещали на замораживание при -80 °C. Перед обработкой клеток LNP оттаивали LNP TT3 при комнатной температуре.

Пример 4. *In vivo* анализ мышиного варианта IL-12

[0341] В настоящем примере проводили анализы для оценки различных вариантов мышиного IL-12 на мышиной сингенной модели рака B16.F10. Кратко, животных лечили внутриопухолевым введением конструкций PHK, кодирующих один из следующих мышиных белков IL-12: (i) только mIL-12, (ii) mIL-12, конъюгированный с альбумином, и (iii) mIL-12, конъюгированный с альбумин и люмиканом. Конструкции PHK вводили животным в дозе либо 0,25 мкг, либо 2,5 мкг. Затем измеряли концентрацию IL-12 и/или IFN-ү с помощью анализов на основе ELISA на день 1, 4, и/или 7 после введения в одну или несколько из следующих тканей: опухоль, сыворотку, селезенку, дренирующие лимфатические узлы и недренирующие лимфатические узлы.

[0342] Как показано на фиг. 6A и 6C, на день 1 после введения концентрация белка IL-12 в опухолях была сопоставима у разных животных с умеренным снижением у животных, получавших конструкцию PHK, кодирующую mIL-12, конъюгированный с альбумином и люмиканом. Аналогичные результаты наблюдали в сыворотке (фиг. 6B), селезенке (фиг. 7A), дренирующих лимфатических узлах (фиг. 7C). На день 4 после введения животные, получавшие 2,5 мкг конструкции PHK, кодирующей только mIL-12, имели самый высокий уровень экспрессии IL-12 в опухоли (см. фиг. 6C). В других проанализированных тканях уровни экспрессии IL-12 были более сопоставимы, при этом несколько более высокие уровни наблюдали у животных, получавших конструкцию PHK, кодирующую mIL-12, конъюгированный с альбумином (см. фиг. 6D, 8A, 8B, 8C и 9A). Уровень экспрессии IFN-ү был также самым высоким у животных, получавших конструкцию PHK, кодирующую mIL-12, конъюгированный с альбумином (фиг. 9B).

Пример 5. Кодон-оптимизация человеческого IL-12

[0343] В настоящем примере кодон человеческого IL-12 оптимизировали следующим образом. Алгоритмически генерировали 20301 различных последовательностей, кодирующих слитый человеческий белок лидер легкой последовательности – hIL12p40 – GGS(GGGS)₃ линкер – hIL12p35 – GSGGGS линкер – человеческий сывороточный альбумин. Кодоновую оптимальность вычисляли как среднюю частоту, с которой каждый кодон в данной кодирующей последовательности используется для кодирования данной аминокислоты в стандартном транскриптоме человека. Идентифицировали 1137 репрезентативных последовательностей, и их минимальную свободную энергию укладки (МFE) вычисляли с помощью ViennaRNA-2.4.14. Репрезентативные последовательности с низкой, средней и высокой кодоновой оптимальностью и МFE (L1, L2, L3, M1, M2, M3, H1, H2, H3) модифицировали, чтобы они содержали идентичный линкер легкой цепи и позволяли эффективный коммерческий синтез и сборку и экспериментальное тестирование. С помощью этого алгоритма также генерировали последовательность (СО), содержащую наиболее часто используемый кодон для каждой аминокислоты. Посредством родственного алгоритма генерировали отдельную последовательность (СР), содержащую оптимально частый набор пар кодонов.

[0344] На фиг. 10 представлены данные, относящиеся к оптимальности (средняя оценка кодонов «avg_codon_score») относительно минимальной свободной энергии укладки в ккал/моль (МFE) для 1137 различных последовательностей, кодирующих гибридный белок человека лидер легкой цепи – hIL12p40 – GGS(GGGS)3 линкер – hIL12p35 – GSGGGS линкер – человеческий сывороточный альбумин. Оптимальная последовательность кодонов («CO»), содержащая наиболее часто используемый триплет в каждом положении, показана в виде треугольника. Последовательности с >90% и >90% идентичностью с CO показаны темно-серыми и светло-серыми точками, соответственно. Репрезентативные последовательности с низкой, средней и высокой кодоновой оптимальностью и MFE (L1, L2, L3, M1, M2, M3, H1, H2, H3) показаны с помощью круга. Репрезентативные последовательности с очень высокой оптимальностью кодонов и MFE показаны в виде ромбов и не тестировались экспериментально. Первоначальный скрининг показал, что высокого структурированные и часто используемые кодоны обеспечивают высокую экспрессию репРНК.

[0345] Уровни экспрессии IL-12 вариантных самореплицирующихся мРНК, кодирующих hIL-12 (A1-A4), hIL12-альбумин (B1-B4) и hIL12-альбумин-люмикан (C1-C3), измеряли в анализе экспрессии in vitro в клеточная линия TNBC человека. Испытывали IL-12, IL-12-alb и IL-12-alb-lum варианты каждой из этих конструкций. Клетки TNBC BT20 человека трансфицировали с помощью TT3-LNP и инкубировали в течение 20 часов перед измерением уровня экспрессии с помощью анализов на основе ELISA.

[0346] На фиг. 11 представлены данные, относящиеся к уровню экспрессии IL-12 вариантных самореплицирующихся мРНК, кодирующих hIL-12 (A1-A4), hIL12-альбумин (B1-B4) и hIL12-альбумин-люмикан (C1-C3) через 20 часов после трансфекции посредством ТТ3-LNP в клетки ВТ-20. Отдельные тройные измерения показаны в виде треугольных, квадратных,

восьмиугольных или круглых точек, а горизонтальные полосы показывают среднее значение тройных измерений. Конструкции с лучшей экспрессией использовали в последующих экспериментах на мышах TNBC PDX. Кратко, эксперименты с ксенотрансплантатами, полученными от пациентов (PDX), проводили следующим образом: PDX первоначально получали из свежих хирургически резецированных опухолей у пациентов с TNBC (ER, PR, HER2-отрицательный рак молочной железы). Образцы опухолей механически разделяли на мелкие фрагменты, смешивали с раствором матригеля и хирургически имплантировали в виде твердых фрагментов под кожу мышей NOD.Cg-Prkdc-scid Il2rg-tm1Wjl/SzJ (NSG) с использованием трокара. Ткани PDX серийно пассировали іп vivo перед началом эксперимента. Для описанных экспериментов фрагменты опухоли PDX подкожно вводили мышам NSG и рандомизировали при достижении опухолями среднего размера 200-350 мм3. Сразу после рандомизации мышей обрабатывали указанными средствами, а через 24 часа собирали сыворотку, селезенку и опухоли. Концентрации человеческого IL-12 в сыворотке, лизатах селезенки и опухолевых лизатах определяли с помощью анализов на основе ELISA.

[0347] Как показано на фиг. 12А-12С, в различных проанализированных тканях (опухоль, сыворотка и селезенка) животные, которым вводили конструкцию мРНК, кодирующую только человеческий IL-12 (т.е., не конъюгированный с альбумином и/или люмиканом), демонстрировали самые высокие уровни IL-12. Такие результаты демонстрируют эффективность описанной выше стратегии оптимизации кодонов.

Пример 6. Анализ эффекта дозы на мышиной модели рака молочной железы

[0348] В дополнение к примеру 4, представленному выше, противоопухолевые эффекты конструкций IL-12 согласно настоящему изобретению оценивали на животной модели рака молочной железы. Кратко, трижды негативный рак молочной железы (TNBC) индуцировали путем инокуляции животным клеток 4T1 (через введение в жировую ткань молочной железы). Как только опухоли достигли оптимального размера (~ 150 мм³), в первичные опухоли животных вводили одно из следующих: (i) среда-контроль, (ii) 5 мкг самореплицирующейся мРНК, кодирующей IL-12 (репРНК-IL12), (iii) 0,5 мкг самореплицирующейся мРНК, кодирующей IL-12 (репРНК-IL12). Животные получали в общем 4 дозы по еженедельному графику. Затем оценивали объем опухоли в различные моменты времени после лечения.

[0349] Как показано на фиг. 13, наблюдали зависимое от дозы ингибирование роста первичной опухоли в течение всего периода исследования у животных, получавших репРНК-IL12, что приводило к уменьшению размера первичной опухоли на около 50% на момент завершения исследования. Эти результаты подтверждают, что самореплицирующиеся конструкции мРНК согласно настоящему изобретению (например, кодирующие IL-12), эффективны при лечении различных видов рака, включая агрессивный и резистентный к иммунотерапии рак молочной железы.

Пример 7. Анализ противоопухолевых эффектов конструкций IL-12, содержащих модифицированный нуклеозидтрифосфат

[0350] Затем, для того, чтобы оценить, оказывает ли включение различных пропорций модифицированных нуклеозидтрифосфатов (modNTP) в самореплицирующуюся мРНК, как описано в настоящем документе, какое-либо влияние на терапевтическую эффективность конструкций мРНК, описанную выше мышиную модель TNBC (см. Пример 6) применяли. После достижения оптимального размера опухоли животным еженедельно проводили внутриопухолевое введение одного из следующих: (i) PBS (среда-контроль), (ii) 5 мкг репРНК, полученная с 0% modNTP, (iii) 5 5 мкг репРНК, полученная 25% modNTP, (iv) 5 5 мкг репРНК, полученная 37,5% modNTP, и (v) 5 5 мкг репРНК, полученная 50% modNTP. Затем оценивали объем опухоли в различные моменты времени после лечения.

[0351] Как показано на фиг. 14, животные, которых лечили различными конструкциями модифицированной репРНК IL-12, вели себя так же (независимо от количества), как и животные, которые получали лечение немодифицированной конструкцией репРНК. Эти данные свидетельствуют о том, что добавление modNTP оказало ограниченное влияние на эффективность конструкций репРНК в отношении контроля роста опухоли.

Пример 8. Анализ абскопального эффекта на мышиной модели меланомы

[0352] Для оценки способности репРНК, кодирующей ІІ-12 (например, как описано в настоящем документе), индуцировать системные противоопухолевые иммунные ответы, которые ингибируют опухолевых поражений, рост дистальных нелеченых модифицированный вариант мышиной модели меланомы, описанной в Примере 4. Кратко, для того, чтобы вызвать образование двух отдельных первичных опухолей меланомы, 1×10^{6} клеток B16-F10 подкожно имплантировали в левый задний бок животного, тогда как в то же время 2×10^{-5} клеток B16-F10 имплантировали в правый задний бок. После достижения оптимального размера опухоли животные получали однократную внутриопухолевую инъекцию только в левостороннюю опухоль следующего: (i) PBS (среда-контроль), и (ii) 2,5 мкг репРНК, кодирующей IL-12. Рост опухоли оценивали путем измерения объемов опухоли как обработанных (левый бок), так и необработанных (правый бок) опухолей в различные моменты времени после лечения.

[0353] Как показано на фиг. 15А и 15В, репРНК, кодирующая IL-12, доставляемая внутриопухолево, была способна контролировать рост как обработанной опухоли, так и необработанных дистальных опухолей. Эти данные свидетельствуют о том, что локальная доставка репРНК, кодирующей IL-12, может быть эффективной терапией при метастатическом раке.

Пример 9. Анализ экспрессии полезной нагрузки после повторного введения дозы

[0354] Для оценки возможности повторного введения дозы конструкций мРНК, как описано в настоящем документе, снова использовали мышиную модель TNBC, описанную в

Примере 6. Кратко, конструкции мРНК, кодирующие репортерный ген люциферазы светлячка, доставляли путем внутриопухолевой инъекции по 5 мкг один раз в неделю в виде двух доз. В некоторых группах животным два раза в неделю совместно вводили внутрибрюшинные инъекции 10 мг/кг мышиных анит-IFNAR1 антител (клон MAR1-5A3) для ингибирования активности IFN-α. Через 24 часа после каждой дозы конструкций мРНК животные получали 150 мг/кг D-люциферина (субстрат, который преобразуется люциферазой светлячка в люминесцентный сигнал) путем интраперитонеальной инъекции, и опухоли визуализировались в реальном времени с использованием системы визуализации in vivo. Относительную биолюминесценцию количественно определяли через 10 минут после введения субстрата.

[0355] Как показано на фиг. 16, после второй дозы наблюдали некоторое снижение экспрессии полезной нагрузки по сравнению с первой дозой. Экспрессия полезной нагрузки после второй дозы восстанавливалась, когда активность рецептора IFN-а подавлялась блокадой антител. Эти данные свидетельствуют о том, что конструкции мРНК, как описано в настоящем документе, можно вводить многократно, а снижение экспрессии полезной нагрузки, наблюдаемое при повторном приеме, по меньшей мере частично зависит от типа индукции интерферона и может быть преодолено путем блокады рецептора IFN антителом.

Пример 10. Анализ активности ех vivo на клетках РВМС человека

[0356] Для дальнейшей демонстрации активности конструкций IL-12 согласно настоящему изобретению клеточную линию TNBC человека BT20 трансфицировали репРНК, кодирующей IL-12. Около через 24 часа собирали супернатант («кондиционированная среда») и оценивали уровень IL-12 с помощью ELISA для человеческого IL-12 (Invitrogen). Мононуклеарные клетки периферической крови человека (РВМС) выделяли из продуктов лейкафереза здоровых доноровлюдей в соответствии с утвержденным IRB протоколом и рекомендациями производителя (технологии StemCell). Т-клетки в РВМС активировали IL-2 (10 нг/мл) и коктейлем анти-CD3/CD28/CD2 антитело (технологии StemCell) в течение 2 дней. После активации среду промывали и клетки обрабатывали кондиционированной средой (содержащей известные концентрации hIL12 (1 или 10 нг/мл)) в течение 24 часов. В качестве положительного контроля РВМС обрабатывали указанными концентрациями рекомбинантного hIL12 (rhIL12) (технологии StemCell) в различных дозах (0,01, 0,1, 1,10 или 100 нг/мл) в течение того же времени. Известно, что IL-12 активирует Т- и NK-клетки в РВМС, что приводит к выработке интерферона-гамма (IFN-g), который можно исследовать в супернатанте. Супернатант собирали из РВМС и подвергали анализу IFN-у ELISA (Invitrogen) на его уровни.

[0357] Как показано на фиг. 17, конструкции репРНК, как описано в настоящем документе, способны индуцировать высокую продукцию IL-12, который, в свою очередь, способен индуцировать активацию Т- и NK-клеток и последующую продукцию IFN-у. Вышеуказанные результаты дополнительно подтверждают активность конструкций IL-12, как описано в настоящем документе.

[0358] Следует понимать, что раздел «Подробное раскрытие настоящего изобретения», а не разделы «Краткое раскрытие настоящего изобретения» и «Реферат», предназначен для использования для толкования формулы изобретения. В разделах «Краткое раскрытие настоящего изобретения» и «Реферат» могут быть изложены один или несколько, но не все иллюстративные аспекты настоящего изобретения, предусмотренные автором (авторами) настоящего изобретения, и, таким образом, они никоим образом не предназначены для ограничения настоящего раскрытия и прилагаемой формулы изобретения.

[0359] Настоящее раскрытие было описано выше с помощью функциональных стандартных блоков, иллюстрирующих реализацию определенных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных блоков определены в настоящем документе произвольно для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены при условии, что заданные функции и их отношения выполняются надлежащим образом.

[0360] Приведенное выше описание конкретных аспектов настолько полно раскрывает общий характер раскрытия, что другие могут, применяя знания в рамках данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные аспекты без ненужных экспериментов, не отклоняясь от общей концепции настоящего изобретения. Таким образом, предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов на основе представленных в настоящем документе сведений и руководств. Следует понимать, что фразеология или терминология в настоящем документе предназначены для описания, а не для ограничения, так что терминология или фразеология настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете указаний и руководств.

[0361] Широта и объем настоящего изобретения не должны быть ограничены каким-либо из вышеописанных иллюстративных аспектов, а определяются только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75.
- 2. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51.
- 3. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 52.
- 4. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%,

по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 53.

- 5. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 54.
- 6. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 55.
- 7. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 56.
- 8. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 57.
- 9. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 58.
- 10. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 59.

- 11. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12 β , содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, 69 или 74.
- 12. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 66, 70 или 75.
- 13. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая $IL-12\beta$, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 62.
- 14. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12β, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 63.
- 15. Выделенный полинуклеотид по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12 β , содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 64
- 16. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12а»), где молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125.
- 17. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере

84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101.

- 18. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 102.
- 19. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 98% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 103.
- 20. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 104.
- 21. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 105.
- 22. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%,

по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 106.

- 23. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL- 12α , содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 107
- 24. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 108.
- 25. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 109.
- 26. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115, 119 или 124.
- 27. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL- 12α , содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 116, 120 или 125.
- 28. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 112.
- 29. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113.
- 30. Выделенный полинуклеотид по п. 16, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-12α, содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 114.
- 31. Выделенный полинуклеотид, содержащий первую молекулу нуклеиновой кислоты и вторую молекулу нуклеиновой кислоты,

где первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β») и содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 76%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 88%, по меньшей мере около 89%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75, и

где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12а») и содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 77%, по меньшей мере около 78%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 81%, по меньшей мере около 82%, по меньшей мере около 83%, по меньшей мере около 84%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 86%, по меньшей мере около 87%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или около 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125.

32. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 76%, по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 51, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит

нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 101.

- 33. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 52, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 78%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 90%, по
- 34. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 53, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 77%, по меньшей мере 78%, по меньшей мере 79%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 103.

- 35. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 54, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 104.
- 36. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 55, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 105.
- 37. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 87%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 56, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 106.
- 38. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 57, и/или вторая молекула нуклеиновой

кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 107.

- 39. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 58, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 108.
- 40. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 59, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в 109.
- 41. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 65, 69 или 74, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 115, 119 или 124.
- 42. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 66, 70 или 75, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%,

по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 116, 120 или 125.

- 43. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 62, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 112.
- 44. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 63, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 113.
- 45. Выделенный полинуклеотид по п. 31, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 64, и/или вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентична последовательности, как представлено в SEQ ID NO: 114.
- 46. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 31 45, который дополнительно содержит третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую линкер, который соединяет первую молекулу нуклеиновой кислоты и вторую молекулу нуклеиновой кислоты.
- 47. Выделенный полинуклеотид по п. 46, где линкер содержит аминокислотный линкер из по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 аминокислот.
 - 48. Выделенный полинуклеотид по п. 46 или 47, где линкер содержит линкер (GS).
- 49. Выделенный полинуклеотид по п. 48, где линкер (GS) имеет формулу (Gly3Ser)п или S(Gly3Ser)п, где п представляет собой положительное целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100.
- 50. Выделенный полинуклеотид по п. 49, где линкер (Gly3Ser)n представляет собой (Gly3Ser)3 или (Gly3Ser)4.

- 51. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 46 50, где третья молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая линкер, содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 168 170.
- 52. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 51, который дополнительно содержит дополнительную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фрагмент, увеличивающий время полужизни.
- 53. Выделенный полинуклеотид по п. 52, где фрагмент, увеличивающий время полужизни, содержит Fc, альбумин или его фрагмент, альбумин-связывающий фрагмент, PAS, HAP, трансферрин или его фрагмент, XTEN или любую их комбинацию.
- 54. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 53, который дополнительно содержит дополнительную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность.
- 55. Выделенный полинуклеотид по п. 54, где дополнительная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая лидерную последовательность, содержит последовательность, как представлено в любой из SEQ ID NO: 26 50.
- 56. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 26,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 51,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 76,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 101,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 126, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 147.
- 57. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу

- а. первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 27,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 52,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 77,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 102,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 127, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 148.
- 58. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 28,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 53,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 78,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 103,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 128, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 149.
- 59. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 29,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 54,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 79,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 104,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 129, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 150.
- 60. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 30,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 55,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 80,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 105,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 130, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 151.
- 61. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу

- а. первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 31,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 56,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 81,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 106,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 131, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 152.
- 62. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 32,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 57,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 82,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 107,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 132, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 153.
- 63. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 33,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 58,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 83,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 108,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 133, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 154.
- 64. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 34,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 59,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 84,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 109,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 134, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 155.
- 65. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 37,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 62,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 87,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 112,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 137, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 158.
- 66. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 38,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 63,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 88,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 113,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 138, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 159.
- 67. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 39,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 64,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 89,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 114,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 139, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 160.
- 68. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 44,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 69,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 94,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 119,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 140, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 161.
- 69. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 45,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 70,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 95,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 120,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 141, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 162.
- 70. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12 β »), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12 α »), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 46,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 71,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 96,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 121,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 142, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 163.
- 71. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 47,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 72,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 97,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 122,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 143, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 164.
- 72. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, и (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 36,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 61,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 86,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 111,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 136, и
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 157.
- 73. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой

кислоты, кодирующую второй линкер, (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер, и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок люмикан, где:

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 48,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 73,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 98,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 123,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 144,
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 165,
- g. седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 168, и
- h. восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 171.
- 74. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5° к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер, и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок люмикан, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 49.
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 74,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEO ID NO: 99,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 124,

- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 145,
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 166,
- g. седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 169, и
- h. восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 172.
- 75. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), (v) пятую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую второй линкер, (vi) шестую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческий сывороточный альбумин, (vii) седьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую третий линкер, и (viii) восьмую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок люмикан, где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 50,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 75,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 100,
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 125,
- е. пятая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 146,
- f. шестая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 167,
- g. седьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 170, и
- h. восьмая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 173.
- 76. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где:

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 40,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 65,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 90, и
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 115.
- 77. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 41,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 66,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 91, и
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 116.
- 78. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 («IL-12α»), где:
- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 42,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 67,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 92, и
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 117.
- 79. Выделенный полинуклеотид, содержащий (в направлении от 5' к 3') (i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую лидерную последовательность, (ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую бета-субъединицу белка IL-12 («IL-12β»), (iii) третью молекулу

нуклеиновой кислоты, кодирующую первый линкер, и (iv) четвертую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую альфа-субъединицу белка IL-12 (« $\text{IL-12}\alpha$ »), где:

- а. первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 43,
- b. вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 68,
- с. третья молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 93, и
- d. четвертая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 118.
- 80. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 79, который дополнительно содержит 5'-кэп.
- 81. Выделенный полинуклеотид по п. 80, где 5'-кэп выбран из группы, состоящей из $m_2^{7,2'-}$ $^{\circ}$ $^{$
- 82. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 81, который дополнительно содержит регуляторный элемент.
- 83. Выделенный полинуклеотид по п. 82, где регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из по меньшей мере одного элемента энхансера трансляции (ТЕЕ), последовательности инициации трансляции, по меньшей мере одного сайта связывания микроРНК или его исходной последовательности, области 3' хвоста связанных нуклеозидов, AU-богатого элемента (ARE), посттранскрипционного контрольного модулятора, 5' UTR, 3' UTR и их комбинаций.
- 84. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 83, который дополнительно содержит область 3' хвоста связанных нуклеозидов.
- 85. Выделенный полинуклеотид по п. 84, где область 3' хвоста связанных нуклеозидов содержит поли-А хвост, полиА-G квартет или последовательность «петля-на-стебле».
- 86. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 85, который содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеозид.
- 87. Выделенный полинуклеотид по п. 86, где по меньшей мере один модифицированный нуклеозид выбран из группы, состоящей из 6-аза-цитидина, 2-тио-цитидина, α-тио-цитидина, псевдо-изо-цитидина, 5-аминоаллил-уридина, 5-йод-уридина, N1-метил-псевдоуридина, 5,6-дигидроуридина, α-тио-уридина, 4-тио-уридина, 6-аза-уридина, 5-гидрокси-уридина, деокси-

тимидина, псевдо-уридина, инозина, α-тио-гуанозина, 8-оксо-гуанозина, О6-метил-гуанозина, 7-деаза-гуанозина, N1-метил-аденозина, 2-амино-6-хлор-пурина, N6-метил-2-амино-пурина, 6-хлор-пурина, N6-метил-аденозина, α-тио-аденозина, 8-азидо-аденозина, 7-деаза-аденозина, пирролоцитидина, 5-метил-цитидина, N4-ацетил-цитидина, 5-метил-уридина, 5-йод-цитидина и их комбинаций.

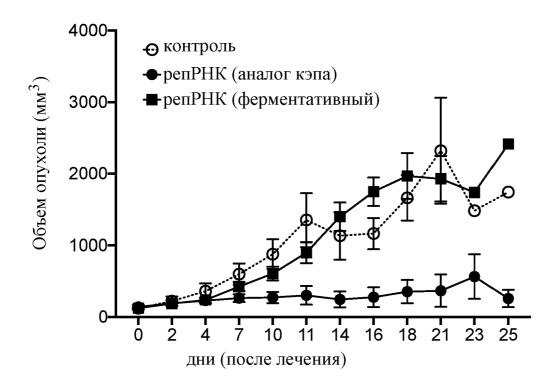
- 88. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 87, который способен к саморепликации.
- 89. Выделенный полинуклеотид по п. 88, который представляет собой самоамплифицирующийся РНК-репликон.
- 90. Выделенный полинуклеотид по п. 89, где самоамплифицирующийся РНК-репликон происходит из альфавируса.
- 91. Выделенный полинуклеотид по п. 90, где альфавирус содержит вирус венесуэльского лошадиного энцефалита, вирус леса Семлики, вирус Синдбис или их комбинации.
 - 92. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 91.
- 93. Липидная наночастица, содержащая (i) выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 92 и (ii) один или несколько типов липидов.
- 94. Липидная наночастица по п. 93, где один или несколько типов липида содержат катионный липид или липидоид.
- 95. Липидная наночастица по п. 93 или 94, где одним или несколькими типами липида является N1,N3,N5-трис(3-(дидодециламино)пропил)бензол-1,3,5-трикарбоксамид (ТТ3).
- 96. Липидная наночастица по любому из пп. 93 95, которая содержит 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DOPE), холестерин, C14-PEG2000 или любую их комбинацию.
- 97. Липидная наночастица по п. 96, где C14-PEG2000 содержит 1,2-димиристоил-гас-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (DMG-PEG2000), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DMPE-PEG2000) или оба.
 - 98. Липидная наночастица по п. 97, где C14-PEG2000 встроен в LNP.
- 99. Липидная наночастица по п. 97, где C14-PEG2000 добавляется после инкапсуляции выделенного полинуклеотида в липидную наночастицу.
- 100. Липидная наночастица по любому из пп. 93 99, где липидная наночастица имеет диаметр около 30-500 нм.
- 101. Липидная наночастица по любому из пп. 93 100, где липидная наночастица имеет диаметр около 50-400 нм.
- 102. Липидная наночастица по любому из пп. 93 101, где липидная наночастица имеет диаметр около 70-300 нм.
- 103. Липидная наночастица по любому из пп. 93 102, где липидная наночастица имеет диаметр около 100-200 нм.
- 104. Липидная наночастица по любому из пп. 93 103, где липидная наночастица имеет диаметр около 100-175 нм.

- 105. Липидная наночастица по любому из пп. 93 104, где липидная наночастица имеет диаметр около 100-160 нм.
- 106. Липидная наночастица по любому из пп. 93 105, где липид и выделенный полинуклеотид (например, модифицированная РНК) имеют массовое соотношение от около 1:2 до около 15:1.
- 107. Липидная наночастица по п. 106, где липид и выделенный полинуклеотид (например, модифицированная РНК) имеют массовое соотношение 1:2, 1:1,5, 1:1,2, 1:1,1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, 5:1, 5,5:1, 6:1, 6,5:1, 7:1, 7,5:1, 8:1, 8,5:1, 9:1, 9,5:1, 10:1, 10,5:1, 11:1, 11,5:1, 12:1, 12,5:1, 13:1, 13,5:1, 14:1, 14,5:1 или 15:1.
- 108. Липидная наночастица по п. 107, где липид и выделенный полинуклеотид (например, модифицированная РНК) имеют массовое соотношение около 10:1.
- 109. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 91, вектор по п. 92 или липидную наночастицу по любому из пп. 93 108 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 110. Фармацевтическая композиция по п. 109, которая составлена для внутриопухолевого, интратекального, внутримышечного, внутривенного, подкожного, ингаляционного, внутрикожного, внутрилимфатического, внутриглазного, интраперитонеального, внутрисосудистого, интраплеврального, интраспинального, чрезкожного, назального, сублингвального, подслизистого, трансдермального или трансмукозального введения.
- 111. Клетка, содержащая выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1 91, вектор по п. 92 или липидную наночастицу по любому из пп. 93 108.
- 112. Клетка по п. 111, которая представляет собой *in vitro* клетку, *ex vivo* клетку или *in vivo* клетку.
- 113. Способ получения полинуклеотида, предусматривающий ферментативный или химический синтез выделенного полинуклеотида по любому из пп. 1 91.
- 114. Способ получения белка IL-12, предусматривающий контакт клетки с выделенным полинуклеотидом по любому из пп. 1 91, вектором по п. 92 или липидной наночастицей по любому из пп. 93 108.
 - 115. Способ по п. 114, где контакт происходит *in vivo* или *ex vivo*.
- 116. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту выделенного полинуклеотида по любому из пп. 1 91, вектора по п. 92, липидной наночастицы по любому из пп. 93 108 или фармацевтической композиции по п. 109 или 110.
 - 117. Способ по п. 116, где заболевание или нарушение представляет собой рак.
- 118. Способ по п. 117, где рак включает меланому, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, печеночноклеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого

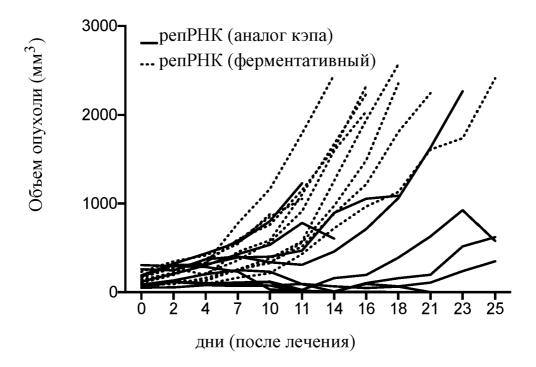
пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак ободочной кишки, колоректальный рак, эндометриальный рак или рак матки, карциному слюнной железы, рак почек, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарциному, рак желудка, рак головы и шеи или их комбинации.

- 119. Способ по любому из пп. 116 118, дополнительно предусматривающий введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства субъекту.
- 120. Способ по п. 119, где по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство содержит химиотерапевтическое лекарственное средство, нацеленную противораковую терапию, онколитическое лекарственное средство, цитотоксическое средство, иммунную терапию, цитокин, хирургическое вмешательство, лучевую терапию, активатор костимулирующей молекулы, ингибитор иммунных контрольных точек, вакцину, клеточную иммунотерапию или любую их комбинацию.
- 121. Способ по п. 120, где ингибитор иммунных контрольных точек содержит анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, анти-LAG-3 антитело, анти-CTLA-4 антитело, анти-GITR антитело, анти-TIM3 антитело или любую их комбинацию.

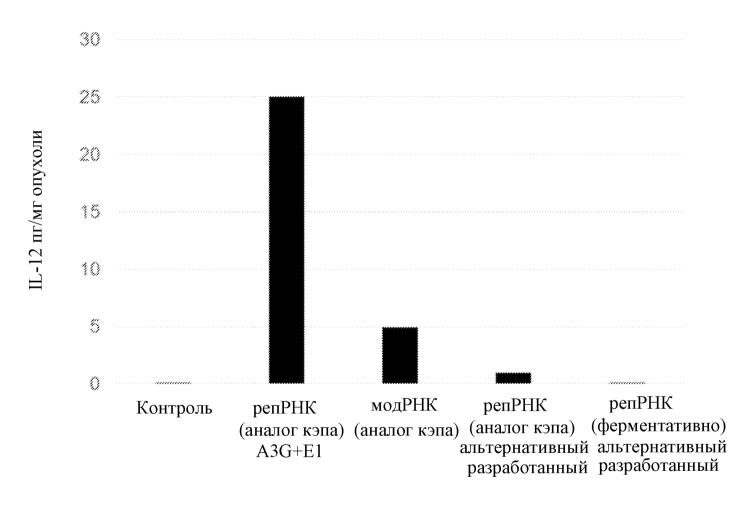
Фиг. 1А



Фиг. 1В

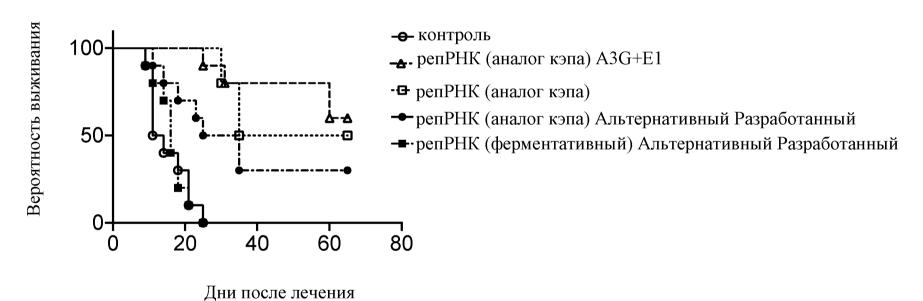






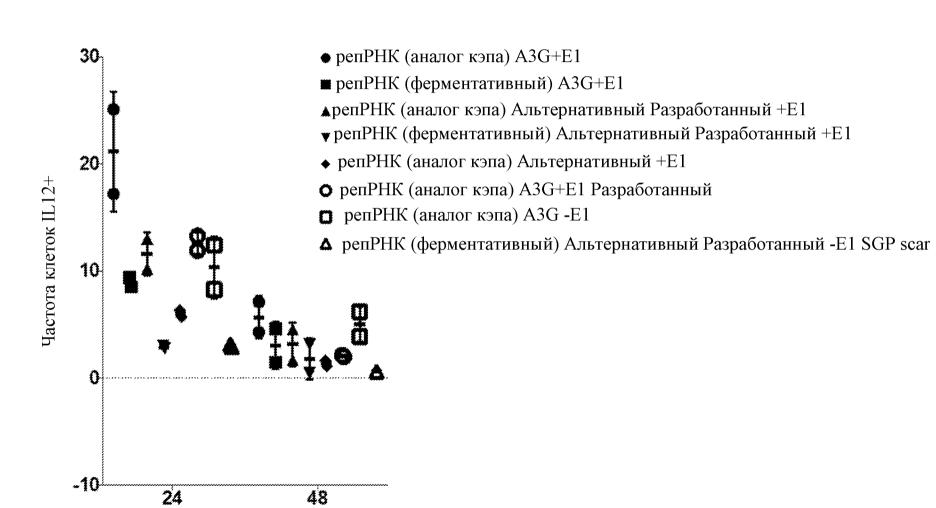
Фиг. 3

Каплан-Мейер В16-F10 подкожно, одна доза мРНК при $\sim 350 \text{ мм}^3$

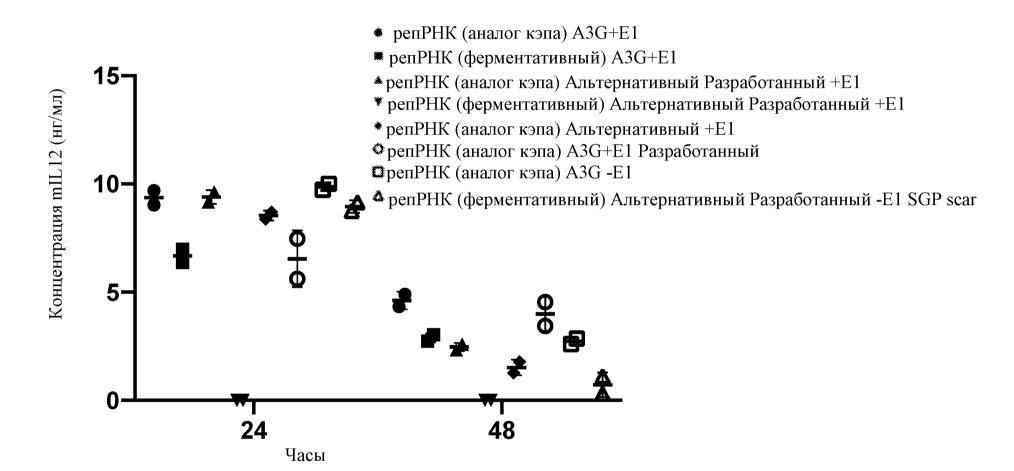


Фиг. 4А

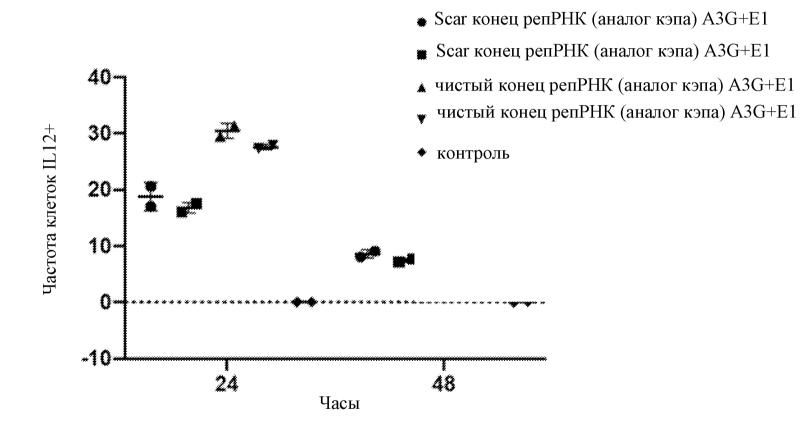
Часы



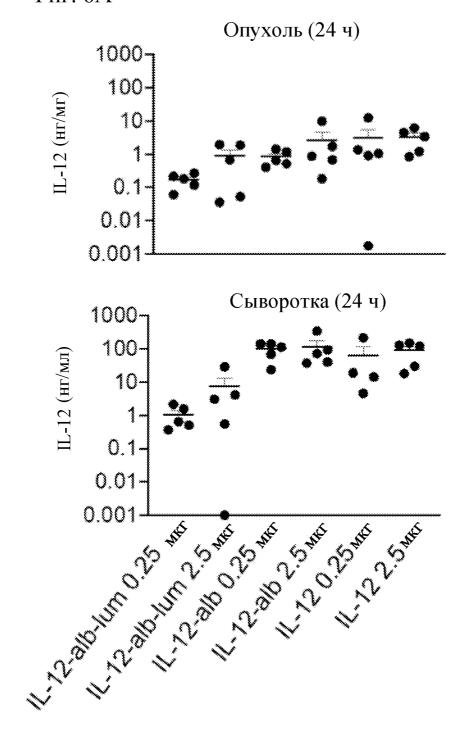
Фиг. 4В



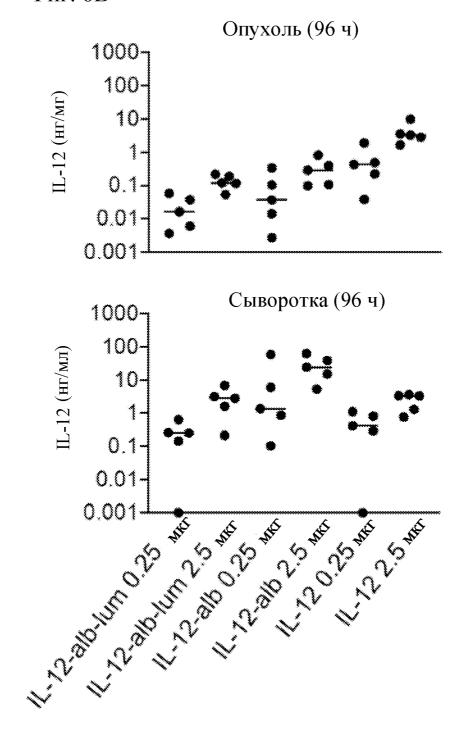
Фиг. 5



Фиг. 6А

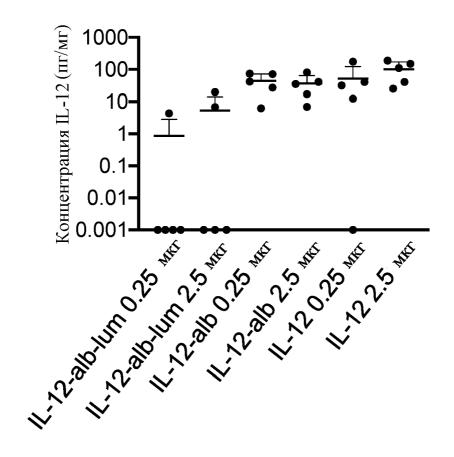


Фиг. 6В

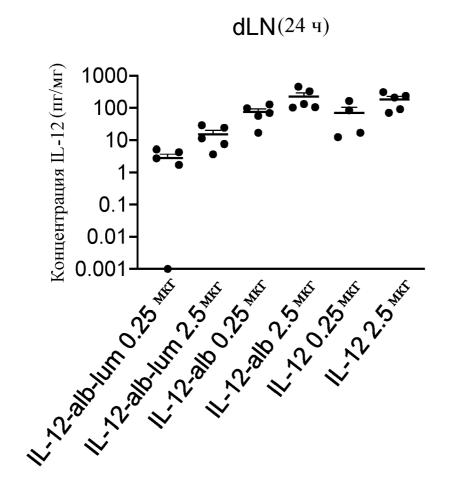


Фиг. 7А

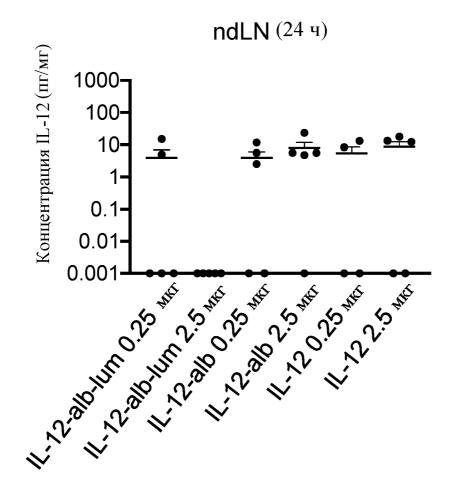
Селезенка (24 ч)



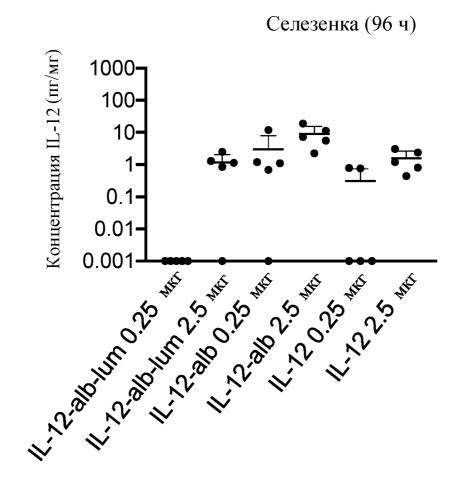
Фиг. 7В



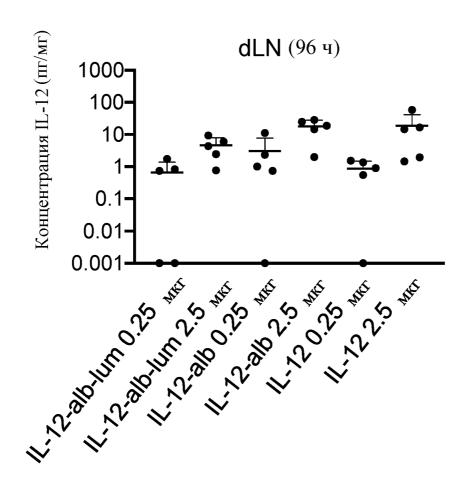
Фиг. 7С

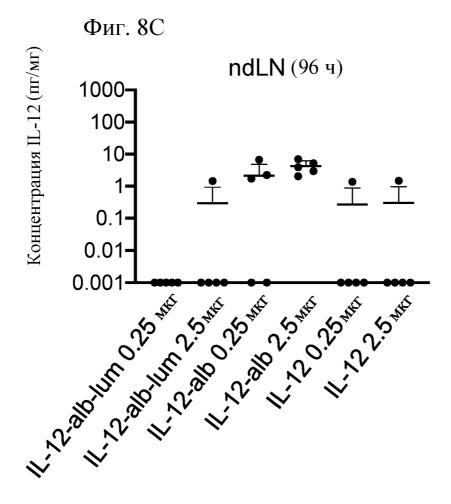


Фиг. 8А

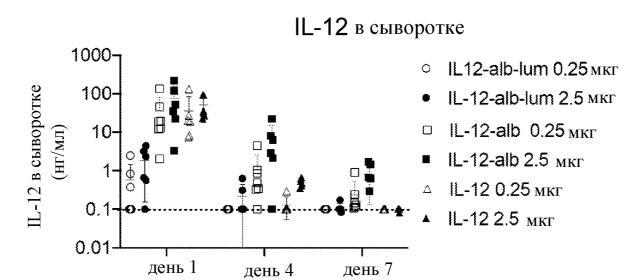


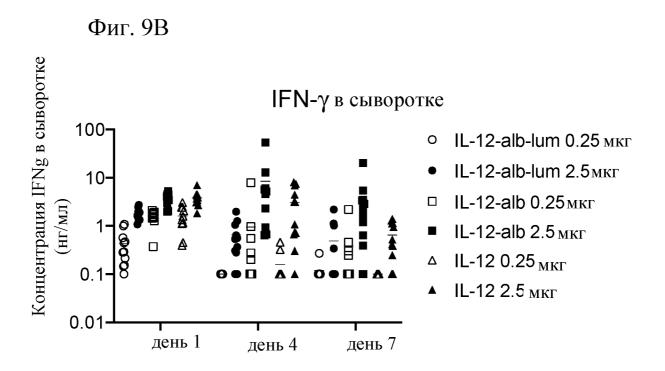




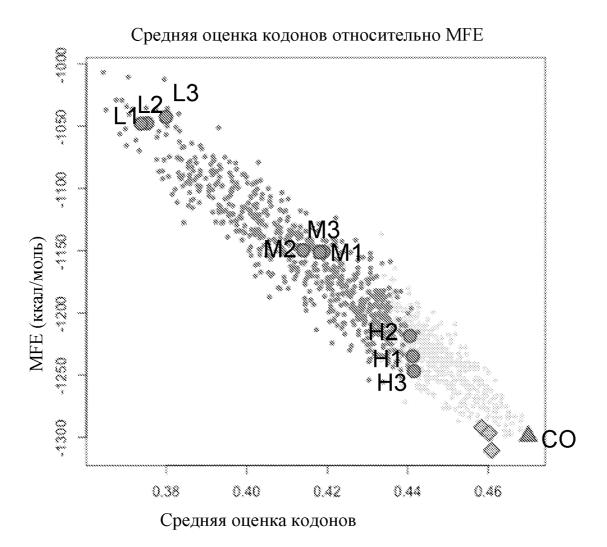


Фиг. 9А

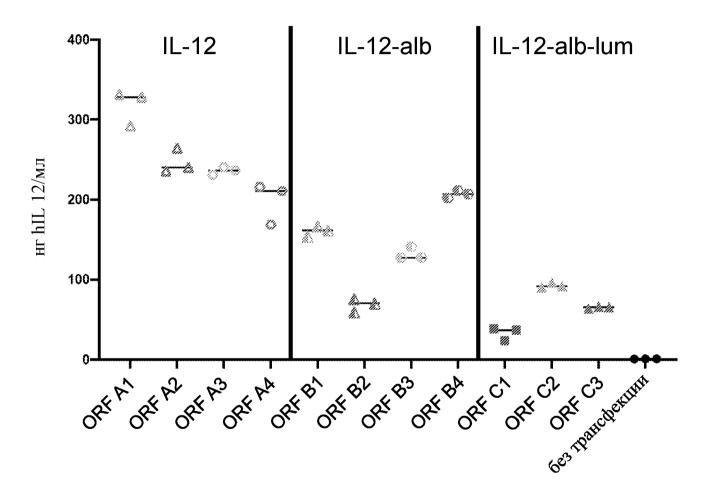




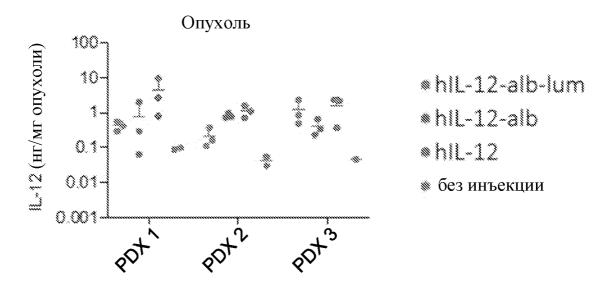
Фиг. 10



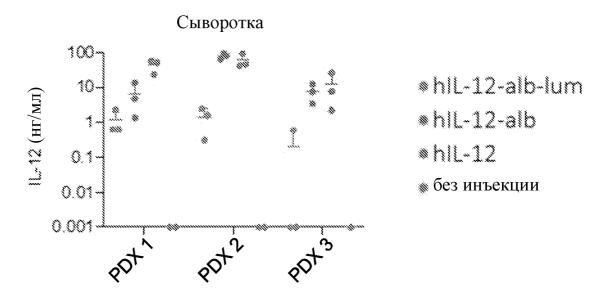
Фиг. 11



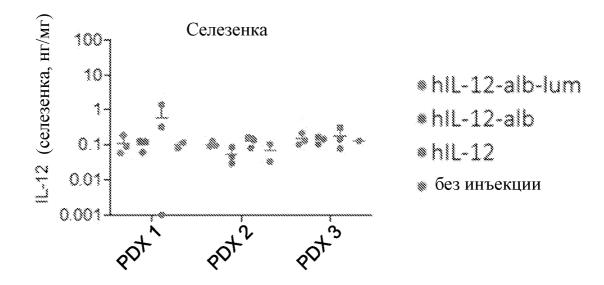
Фиг. 12А



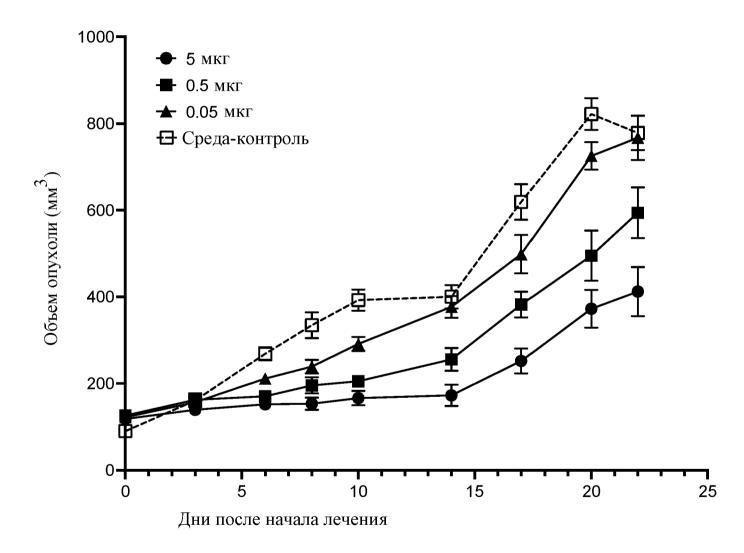
Фиг. 12В



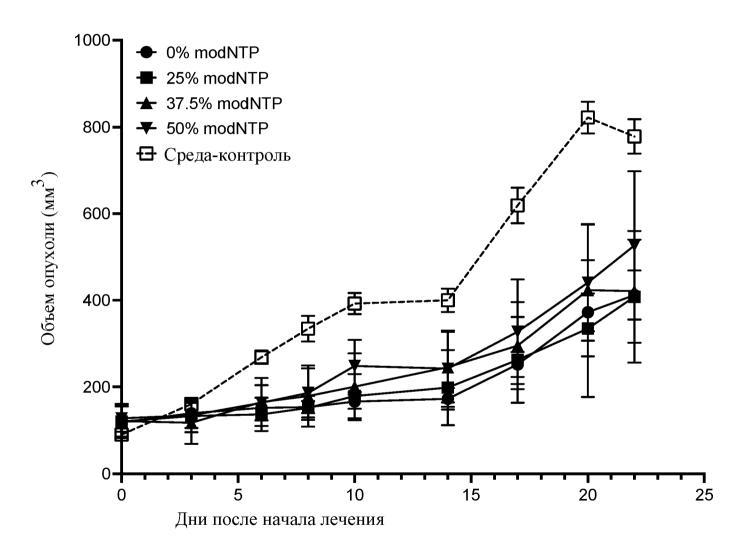
Фиг. 12С



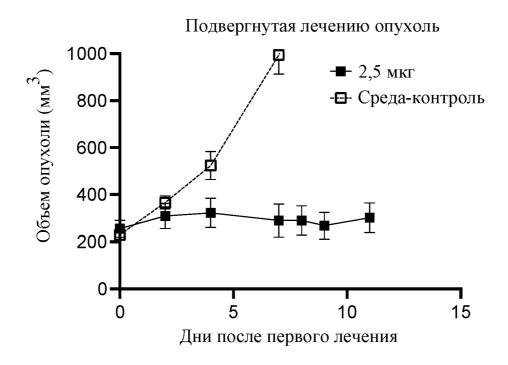
Фиг. 13



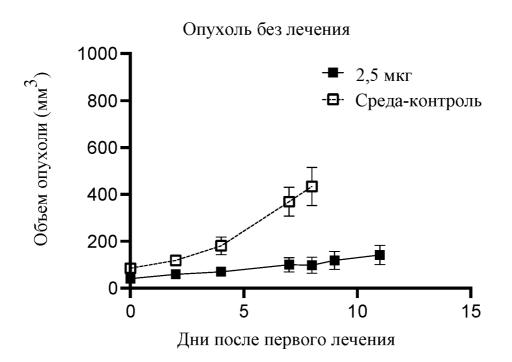
Фиг. 14

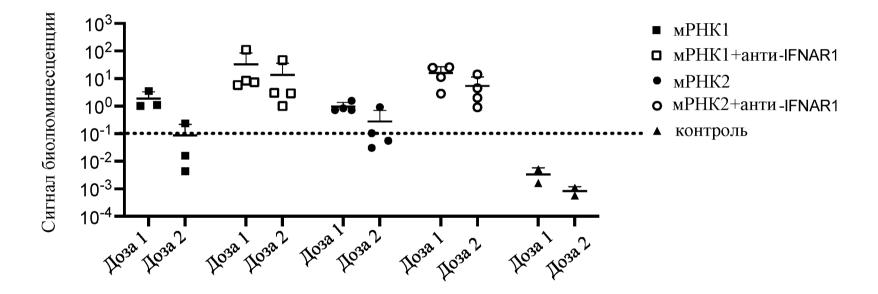


Фиг. 15А



Фиг. 15В





Фиг. 17

