

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043982**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.12

(21) Номер заявки
201990624

(22) Дата подачи заявки
2017.09.29

(51) Int. Cl. **A61K 38/10** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ TERT И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

(31) 62/402,695; 62/468,124

(32) 2016.09.30; 2017.03.07

(33) US

(43) 2019.09.30

(86) PCT/US2017/054519

(87) WO 2018/064588 2018.04.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНΙΑ; ДЗЕ УИСТАР
ИНСТИТЮТ ОФ ЭНЭТОМИ
ЭНД БАЙОЛОДЖИ; ИНОВИО
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Уэйнер Дэвид, Янь Цзянь (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20040106128
YAN et al. "Highly Optimized DNA Vaccine Targeting Human Telomerase Reverse Transcriptase Stimulates Potent Antitumor Immunity", *Cancer Immunology Research*, 17 July 2013 (17.07.2013), Vol. 1, Iss. 3, p. 179-189, entire document

US-A1-20140056932
KOTSAKIS et al. "Clinical outcome of patients with various advanced cancer types vaccinated with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase (TERT) peptide: results of an expanded phase II study", *Annals of Oncology*, 25 August 2011 (25.08.2011), Vol. 23, p. 442-449, entire document

US-A1-20080090778
LÜ et al. "hTERT-based therapy: A universal anticancer approach", *Oncology Reports*, 17 September 2012 (17.09.2012), Vol. 28, p. 1945-1952, entire document

US-B1-7851591
US-A1-20090074741

(57) В изобретении раскрыты композиции, содержащие оптимизированные консенсусные антигены TERT и способы лечения онкологических заболеваний, и, в частности, иммуногенные композиции для лечения и обеспечения противоопухолевой защиты.

B1

043982

043982

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данный патент заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/402695, поданной 30 сентября 2016 г., и предварительной заявке США № 62/468124, поданной 7 марта 2017 г., которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Область техники

В данном документе раскрыты композиции и способы лечения онкологических заболеваний и, в частности, иммуногенные композиции для лечения и обеспечения защиты от роста опухоли.

Уровень техники

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смерти во всем мире, а в Соединенных Штатах - второй по распространенности причиной смерти, на которую приходится почти 1 из каждых 4 смертей. Онкологическое заболевание возникает из одной клетки, которая превратилась из нормальной клетки в опухолевую клетку. Такое преобразование часто является многостадийным процессом, переходящим от предракового поражения к злокачественным опухолям. Несколько факторов способствуют этому прогрессу, включая старение, генетическое воздействие и воздействие внешних факторов, таких как физические канцерогены (например, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение), химические канцерогены (например, асбест, компоненты табачного дыма и т.д.) и биологические канцерогены (например, некоторые вирусы, бактерии и паразиты).

Профилактика, диагностика и лечение рака могут принимать различные формы. Профилактика может включать скрининг на предрасполагающие факторы (например, конкретные генетические варианты), изменение поведения (например, курение, диета и уровень физической активности) и вакцинацию против вирусов (например, вируса гепатита В, вируса папилломы человека). Лечение может включать химиотерапию, лучевую терапию и хирургическое удаление опухоли или раковой ткани. Несмотря на наличие многочисленных способов профилактики и лечения, такие способы часто имеют ограниченный успех в эффективной профилактике и/или лечении рака.

Соответственно, существует потребность в идентификации и разработке композиций и способов для профилактики и/или лечения рака для облегчения клинического ведения защиты от заболевания и его прогрессирования. Кроме того, необходимы более эффективные способы лечения для задержки прогрессирования заболевания и/или снижения смертности у субъектов, страдающих от рака.

Краткое описание сущности изобретения

В одном варианте реализации изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую консенсусный антиген TERT. В одном варианте реализации изобретения консенсусный антиген TERT содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, б) аминокислотную последовательность, которая на 95% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, и с) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной аминокислотной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция дополнительно содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70; б) аминокислотной последовательности, которая на 95% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 и с) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной аминокислотной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую один или более антигенов, выбранных из группы, состоящей из: MAGE A1, gp100, вирусного антигена и их комбинации. В одном варианте реализации изобретения вирусный антиген представляет собой антиген вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV) или вируса папилломы человека (HPV). В одном варианте реализации изобретения антиген HBV представляет собой коровый антиген HBV или поверхностный антиген HBV или их комбинацию. В од-

ном варианте реализации изобретения антиген HCV представляет собой антиген NS34A HCV, антиген NS5A HCV, антиген NS5B HCV, антиген NS4B HCV или их комбинацию. В одном варианте реализации изобретения антиген HPV представляет собой антиген E6 HPV типа 6, антиген E7 HPV типа 6, антиген E6 HPV типа 11, антиген E7 HPV типа 11, антиген E6 HPV типа 16, антиген E7 HPV типа 16, антиген E6 HPV типа 18, антиген E7 HPV типа 18 или их комбинацию.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция дополнительно содержит иммунный ингибитор контрольной точки.

В одном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, б) нуклеотидной последовательности, которая на 95% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, и с) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69; б) нуклеотидной последовательности, которая на 95% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, и с) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция содержит одну или более плазмиду.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция дополнительно содержит адъювант. В одном варианте реализации изобретения адъювант представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

В одном варианте реализации изобретение относится к способу лечения или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту иммуногенной композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую консенсусный антиген TERT. В одном варианте реализации изобретения способ введения включает стадию электропорации. В одном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает введение субъекту иммунного ингибитора контрольной точки.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенную композицию и иммунный ингибитор контрольной точки вводят субъекту в одной композиции. В одном варианте реализации изобретения иммуногенную композицию и иммунный ингибитор контрольной точки вводят субъекту отдельно.

В одном варианте реализации изобретения онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из меланомы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, рака печени, рака шейки матки, рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП), рака анального канала, рака крови, рака яичника и их комбинации.

В одном варианте реализации изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, б) нуклеотидной последовательности, которая на 95% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, и с) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: а) нуклео-

тидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69; б) нуклеотидной последовательности, которая на 95% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, и в) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

В одном варианте реализации изобретения относится к молекуле аминокислоты, содержащей одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, б) аминокислотную последовательность, которая на 95% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, и в) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной аминокислотной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения молекула аминокислоты дополнительно содержит одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из: а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70; б) аминокислотной последовательности, которая на 95% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70 и в) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, причем фрагмент содержит по меньшей мере 95% полноразмерной аминокислотной последовательности.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1, включающей фиг. 1А-1Е, изображена конструкция рТуг.

На фиг. 2, включающей фиг. 2А-2В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих стратегию иммунизации и индукцию клеточно-опосредованных иммунных ответов при вакцинации ДНК Туг, соответственно.

На фиг. 3 изображены результаты экспериментов, демонстрирующих сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) у контрольных и иммунизированных мышей.

На фиг. 4, включающей фиг. 4А-4В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих индукцию специфичных к тирозиназе антител у иммунизированных мышей.

На фиг. 5, включающей фиг. 5А-5В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих кривые выживаемости Каплана-Мейера и кривые объема опухоли, соответственно, после заражения опухолью контрольных и иммунизированных мышей.

На фиг. 6, включающей фиг. 6А-6В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих клеточные популяции MDSC у иммунизированных и неиммунизированных мышей.

На фиг. 7 изображены результаты экспериментов, демонстрирующих окрашивание MDSC у мышей, иммунизированных с помощью рVax1 и рТуг.

На фиг. 8, включающей фиг. 8А-8В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих секрецию MCP-1 с помощью MDSC.

На фиг. 9 изображены результаты экспериментов, демонстрирующих филогенетическую связь нуклеотидных последовательностей Туг среди указанных организмов.

На фиг. 10, включающей фиг. 10А-10С, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих (А) схематическое изображение плазмидной карты рPRAME (также известной в данном документе как рGX1411); (В) окрашивание клеток RD и 293Т на предмет ядер с помощью DAPI и на предмет концен-

сусного антигена PRAME; и (С) вестерн-блоттинг для консенсусного антигена PRAME в лизатах не-трансфицированных клеток ("контроль"), клеток, трансфицированных с помощью pVAX ("pVAX"), и клеток, трансфицированных с помощью pPRAME ("PRAME-pVAX").

На фиг. 11, включающей фиг. 11A-11B, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих графики, изображающие зависимость групп мышей от пятнообразующих единиц (SFU)/10⁶ спленоцитов в случае гамма-интерферона (IFN-γ).

На фиг. 12, включающей фиг. 12A-12C, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих (А) схематическое изображение плазмидной карты pNY-ESO-1 (также упоминаемой в данном документе как pGX1409); (В) окрашивание клеток на предмет ядер с помощью DAPI и на предмет консенсусного антигена NY-ESO-1; и (С) вестерн-блоттинг для консенсусного антигена NY-ESO-1 в лизатах RD и 293T из нетрансфицированных клеток ("контроль"), клеток, трансфицированных с помощью pVAX ("pVAX"), и клеток, трансфицированных с помощью pNY-ESO-1. ("PNY-ESO-1").

На фиг. 13 изображен график зависимости групп мышей от пятнообразующих единиц (SFU)/10⁶ спленоцитов в случае гамма-интерферона (IFN-γ).

На фиг. 14 изображен график зависимости групп мышей от пятнообразующих единиц (SFU)/10⁶ спленоцитов в случае гамма-интерферона (IFN-γ).

На фиг. 15 изображено схематическое представление различных видов рака с некоторыми ассоциированными с ними антигенами(ом) рака.

На фиг. 16 изображено схематическое представление конструкции TERT. Синтетический консенсус hTERT был разработан для TERT человека с 5 мутациями для устранения его функции. Нативный RhTERT кодирует TERT резуса с 2 мутациями. Обе конструкции были оптимизированы. В Таблице указана гомология белка между оптимизированным TERT и нативным TERT, идентифицированным у человека, резуса и мыши.

На фиг. 17, включающей фиг. 17A-17B, изображены характеристику мышинных TERT-специфических ответов IFN-γ против нативных пептидов резуса. (Фиг. 17A) Схема иммунизации. Мышей (n=8 на группу) иммунизировали в 0, 2 и 4 недели с помощью нативного RhTERT и синтетического консенсусного hTERT посредством ИМ/электропорации. (Фиг. 17B) Частота TERT-специфических IFN-γ пятнообразующих единиц (SFU) на миллион спленоцитов, выделенных от вакцинированных мышей, при определении с помощью анализа ELISpot IFN-γ с использованием пептидов резуса.

На фиг. 18, включающей фиг. 18A-18C, изображена характеристика TERT-специфичных ответов IFN-γ резуса. (Фиг. 18A) Схема иммунизации. Макак-резус (n=5 на группу) иммунизировали в 0, 4, 8 и 12 недели с помощью нативного RhTERT или с помощью синтетического консенсусного hTERT, а также с помощью rhIL-12 посредством ИМ/электропорации. (Фиг. 18B и 18C) Частота TERT-специфических IFN-γ пятнообразующих единиц (SFU) на миллион спленоцитов, выделенных от вакцинированных мышей, при определении с помощью анализа ELISpot IFN-γ с использованием нативных пептидов резуса и синтетического консенсусного пептида hTERT.

На фиг. 19 изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что синтетический консенсусный hTERT (pGX1434) индуцирует устойчивые ответы Т-клеток у мышей и замедляет рост опухоли ТС-1. (слева) Мыши прошли 3 иммунизации с интервалом в 2 недели с помощью 0, 20, 40 или 60 мкг pGX1434. Т-клеточные ответы у мышей оценивали через 5 недель, демонстрируя, что pGX1434 индуцировал устойчивый Т-клеточный ответ. (справа) Мышам имплантировали 25×10⁴ клеток ТС-1. Затем мыши проходили 4 иммунизации с интервалом в 1 неделю с помощью 25 мкг pGX1434. Объем опухоли измеряли в течение 32 дней, было определено, что мыши, обработанные с помощью pGX1434, имели уменьшенный объем опухоли по сравнению с необработанными мышами.

На фиг. 20 изображены результаты экспериментов, демонстрирующих иммуногенность SynCon hTERT (pGX1434) у мышей.

На фиг. 21, включающей фиг. 21A-21B, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что SynCon hTERT (pGX1434) и mut-hTERT (pGX1406) обеспечивают аналогичный контроль роста опухоли ТС-1.

На фиг. 22, включающей фиг. 22A-22B, изображены схема эксперимента, демонстрирующей иммуногенность hTERT у приматов, не являющихся человеком (NHP). На фиг. 22A изображен типовой график иммунизации. На фиг. 22B изображена таблица, демонстрирующая конструкции, которые вводили различным группам. pGX1434: hTERT; pGX1406: Mut-hTERT; pGX1447: Mut-rhTERT; pGX1404: WT-1; pGX1108: PSMA; pGX6006: rhIL-12.

На фиг. 23, включающей фиг. 23A-23B, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что SynCon hTERT нарушает аутоотолерантность в NHP. На фиг. 23A изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что ответы на нативный TERT резуса были обнаружены PD3 и PD4 у животных Группы 1. На фиг. 23B изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что ответы на нативный TERT резуса были обнаружены PD3 и PD4 у животных Группы 2.

На фиг. 24, включающей фиг. 24A-24C, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что конструкция SynCon позволяет нарушить аутоотолерантность. На фиг. 24A изображена таблица, де-

монстрирующая процент идентичности различных конструкций относительно нативным последовательностям. На фиг. 24В изображены результаты экспериментов, демонстрирующих TERT-специфический ответ IFN γ . На фиг. 24С изображены результаты экспериментов, демонстрирующих TERT-специфический IFN γ ответ резуса.

На фиг. 25, включающей фиг. 25А-25В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих иммуногенность NHP SynCon hTERT. На фиг. 25А изображены результаты экспериментов, демонстрирующих ответ TERT, индуцируемый с использованием комбинации SynCon hTERT, PSMA, WT-1 и IL-12. На фиг. 25В изображены результаты экспериментов, демонстрирующих ответ TERT, индуцируемый с использованием комбинации mut-hTERT, PSMA, WT-1 и IL-12.

На фиг. 26, включающей фиг. 26А-26С, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих иммуногенность NHP SynCon hTERT. На фиг. 26А изображены результаты экспериментов, демонстрирующих ответ TERT, индуцируемый с использованием комбинации TERT, PSMA, WT-1 и IL-12. На фиг. 26В изображены результаты экспериментов, демонстрирующих ответ PSMA, индуцируемый с использованием комбинации TERT, PSMA, WT-1 и IL-12. На фиг. 26С изображены результаты экспериментов, демонстрирующих ответ WT-1, индуцируемый с использованием комбинации TERT, PSMA, WT-1 и IL-12.

На фиг. 27, включающей фиг. 27А-27В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих охват мультивалентных вакцин SynCon. На фиг. 27А изображен используемый график иммунизации. На фиг. 27В изображен процент антиген-специфических Т-клеток, которые были идентифицированы после иммунизации.

На фиг. 28, включающей фиг. 28А-28В, изображены результаты экспериментов, демонстрирующих, что мультивалентная вакцина SynCon снижает опухолевую нагрузку и увеличивает выживаемость. На фиг. 28А изображен используемый график иммунизации. На фиг. 28В изображен средний объем опухоли и % выживания животных, иммунизированных с помощью комбинации WT1, PSMA и SynCon mTERT.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к иммуногенным композициям, содержащим синтетический консенсусный антиген TERT, отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с одним дополнительным раковым антигеном или ингибитором белка иммунной контрольной точки, и к способу применения композиций для лечения заболеваний или расстройств. В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция содержит TERT и, по меньшей мере, одну дополнительную консенсусную последовательность ракового антигена. Консенсусные последовательности ракового антигена, которые могут быть включены в иммуногенную композицию, включают, но не ограничиваются этим, тирозиназу (Tyr), преимущественно экспрессируемый при меланоме антиген (PRAME), тирозиназа-зависимый белок 1 (Tyrp1), антиген рака яичек (NY-ESO-1), антиген вируса гепатита В, простат-специфический антиген (PSA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), шеститрансмембранный эпителиальный антиген простаты (STEAP), антиген стволовых клеток простаты (PSCA), белок активации фибробластов (FAP), рецептор фолликулостимулирующего гормона (FSHR) и антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1). В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция согласно изобретению может обеспечивать комбинацию раковых антигенов для профилактики или лечения рака у субъекта, который в этом нуждается.

Одним из способов конструирования нуклеиновой кислоты и соответствующей кодируемой аминокислотной последовательности рекомбинантного ракового антигена является внесение мутаций, которые изменяют конкретные аминокислоты в общей аминокислотной последовательности нативного ракового антигена. Внесение мутаций не настолько сильно изменяет раковый антиген, что его нельзя универсально применять у субъекта-млекопитающего, например, у человека или собаки, но достаточно изменяет антиген, чтобы полученная аминокислотная последовательность нарушала толерантность или считалась чужеродным антигеном для того, чтобы индуцировать иммунный ответ. Другим способом может быть создание консенсусного рекомбинантного ракового антигена, который имеет идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере от 85 до 99%, идентичность последовательности по меньшей мере от 90 до 98%, идентичность последовательности по меньшей мере от 93 до 98%, или, по меньшей мере, 95% и до 98% идентичности последовательности относительно соответствующего нативного ракового антигена. В некоторых случаях рекомбинантный раковый антиген имеет идентичность аминокислотной последовательности, составляющую 95, 96, 97, 98 или 99% относительно соответствующему нативному раковому антигену. Нативный раковый антиген представляет собой антиген, обычно ассоциированный с определенным онкологическим заболеванием или раковой опухолью. В зависимости от ракового антигена консенсусная последовательность ракового антигена может встречаться у разных видов млекопитающих или в пределах подтипов вида, или среди вирусных штаммов или серотипов. Некоторые раковые антигены не сильно отличаются от аминокислотной последовательности дикого типа ракового антигена. Некоторые раковые антигены имеют последовательности нуклеиновых кислот/аминокислот, которые настолько различаются среди видов, что консенсусная последовательность не может быть определена. В этих случаях генерируется рекомбинантный раковый антиген, который на-

рушает толерантность и индуцирует иммунный ответ, который имеет идентичность аминокислотной последовательности по меньшей мере от 85 до 99%; по меньшей мере 90% и до 98% идентичности последовательности; по меньшей мере 93% и до 98% идентичности последовательности; или, по меньшей мере, 95% и до 98% идентичности последовательности относительно соответствующего нативного ракового антигена. В некоторых случаях рекомбинантный раковый антиген имеет идентичность аминокислотной последовательности, составляющую 95, 96, 97, 98 или 99% относительно соответствующему нативному раковому антигену. Вышеупомянутые подходы могут быть скомбинированы таким образом, что конечный рекомбинантный раковый антиген имеет процентное сходство с аминокислотной последовательностью нативного ракового антигена, как обсуждалось выше.

Рекомбинантный раковый антиген может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки.

Иммуногенную композицию можно дополнительно комбинировать с антителами к ингибиторам контрольных точек, таким как PD-1 и PDL-1, для усиления стимуляции как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Использование антител против PD-1 или против PDL-1 не позволяет PD-1 или PDL-1 подавлять ответы Т-клеток и/или В-клеток. В целом, разработка антигенов рака, распознаваемых иммунной системой, помогает преодолеть другие формы иммуносупрессии опухолевыми клетками, и эти иммуногенные композиции можно использовать в сочетании с подавляющей или ингибирующей терапиями (например, анти-PD-1 и анти-PDL-1 терапии) для дальнейшего увеличения Т-клеточного и/или В-клеточного ответов.

1. Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае конфликта, данный документ, включая определения, будет определяющим. Типовые способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут использоваться в практике или при тестировании данного изобретения. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются только иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие. Используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не должна рассматриваться как ограничивающая.

Термины "содержит(ат)", "включает(ют)", "имеющий", "имеет", "могут", "включает(ют) в себя" и их варианты, при использовании в контексте данного документа, предназначены для использования с переходными фразами с открытым концом, терминами или словами, которые не исключают возможности дополнительных действий или структур. Формы существительных в единственном числе включают формы существительных во множественном числе, если из контекста явно не следует иначе. В данном раскрытии также рассматриваются другие варианты реализации, "содержащие", "состоящие из" и "состоящие по существу из", представленные в данном документе варианты реализации изобретения или элементы, независимо от того, представлены они явно или нет.

Для перечисления числовых диапазонов в данном документе явно рассматривается каждое промежуточное число с той же степенью точности. Например, для диапазона 6-9 числа 7 и 8 включены в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 - числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0 явно включены.

Термин "адъювант", используемый в данном документе, означает любую молекулу, добавленную к иммуногенным композициям, описанным в данном документе, для усиления иммуногенности антигенов, кодируемых молекулами нуклеиновой кислоты, и кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, описанных ниже.

"Антитело" при использовании в контексте данного документа означает антитело классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их фрагменты или производные, включая Fab, F(ab')₂, Fd и одноцепочечные антитела, диатела, биспецифичные антитела, бифункциональные антитела и их производные. Антитело может

представлять собой антитело, выделенное из образца сыворотки млекопитающего, поликлональное антитело, аффинно-очищенное антитело или их смеси, которые проявляют достаточную специфичность связывания с желаемым эпитопом или полученную из них последовательность.

Термин "кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота", при использовании в контексте данного документа, означает нуклеиновые кислоты (молекулы РНК или ДНК), которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодированная последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способными управлять экспрессией в клетках индивидуума или млекопитающего, которым вводят нуклеиновую кислоту.

Термин "комплементарный" или "комплементарность", при использовании в контексте данного документа, означает, что нуклеиновая кислота может иметь спаривание оснований Уотсона-Крика (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстина между нуклеотидами или аналогами нуклеотидов молекул нуклеиновой кислоты.

"Консенсус" или "консенсусная последовательность", при использовании в контексте данного документа, означает полипептидную последовательность, основанную на анализе выравнивания множества последовательностей для одного и того же гена из разных организмов. Могут быть получены последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют консенсусную полипептидную последовательность. Иммуногенные композиции, содержащие белки, которые содержат консенсусные последовательности, и/или молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют такие белки, могут быть использованы для индукции широкого иммунного ответа против антигена.

"Электропорация", "электропермеабилитация" или "электрокинетическое усиление" ("ЭП"), используемые в данном документе взаимозаменяемо, означают использование трансмембранного импульса электрического поля для индукции микроскопических путей (пор) в биомембране; их присутствие позволяет таким биомолекулам, как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК, лекарственные препараты, ионы и вода, проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

При использовании в контексте данного документа термин "фрагмент" в отношении последовательностей нуклеиновой кислоты означает последовательность нуклеиновой кислоты или ее часть, которая кодирует полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который перекрестно реагирует с антигеном, раскрытым в данном документе. Фрагменты могут представлять собой фрагменты ДНК, выбранной по меньшей мере из одной из различных нуклеотидных последовательностей, которые кодируют фрагменты белка, представленные ниже. Фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% одной или более последовательностей нуклеиновых кислот, представленных ниже. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты могут содержать по меньшей мере 20 нуклеотидов или более, по меньшей мере 30 нуклеотидов или более, по меньшей мере 40 нуклеотидов или более, по меньшей мере 50 нуклеотидов или более, по меньшей мере 60 нуклеотидов или более, по меньшей мере 70 нуклеотидов или более, по меньшей мере 80 нуклеотидов или более, по меньшей мере 90 нуклеотидов или более, по меньшей мере 100 нуклеотидов или более, по меньшей мере 150 нуклеотидов или более, по меньшей мере 200 нуклеотидов или более, по меньшей мере 250 нуклеотидов или более, по меньшей мере 300 нуклеотидов или более, по меньшей мере 350 нуклеотидов или более, по меньшей мере 400 нуклеотидов или более, по меньшей мере 450 нуклеотидов или более, по меньшей мере 500 нуклеотидов или более, по меньшей мере 550 нуклеотидов или более, по меньшей мере 600 нуклеотидов или более, по меньшей мере 650 нуклеотидов или более, по меньшей мере 700 нуклеотидов или более, по меньшей мере 750 нуклеотидов или более, по меньшей мере 800 нуклеотидов или более, по меньшей мере 850 нуклеотидов или более, по меньшей мере 900 нуклеотидов или более, по меньшей мере 950 нуклеотидов или более, или по меньшей мере 1000 нуклеотидов или более по меньшей мере одной из последовательностей нуклеиновых кислот, представленных ниже.

"Фрагмент" или "иммуногенный фрагмент" в отношении полипептидных последовательностей означает полипептид, способный вызывать иммунный ответ у млекопитающего, который перекрестно реагирует с антигеном, раскрытым в данном документе. Фрагменты могут представлять собой полипептидные фрагменты, выбранными из по меньшей мере одной из различных аминокислотных последовательностей, представленных ниже. Фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% консенсусного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты консенсусных белков могут содержать по меньшей мере 20 аминокислот или более, по меньшей мере, 30 аминокислот или более, по меньшей мере, 40 аминокислот или более, по меньшей мере, 50 аминокислот или более, по меньшей мере, 60 аминокислот или более, по меньшей мере, 70 аминокислот или более, по меньшей мере, 80 аминокислот или более, по меньшей мере, 90 аминокислот или более, по меньшей мере, 100 аминокислот или более, по меньшей мере, 110 аминокислот или более, по меньшей мере, 120 аминокислот или более, по меньшей мере, 130 аминокислот или более, по меньшей мере, 140 аминокислот или более,

по меньшей мере, 150 аминокислот или более, по меньшей мере, 160 аминокислот или более, по меньшей мере, 170 аминокислот или более, по меньшей мере, 180 аминокислот или более последовательности белка, раскрытой в данном документе.

При использовании в контексте данного документа термин "генетическая конструкция" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок. Кодирующая последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включая промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивидуума, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. При использовании в контексте данного документа термин "экспрессируемая форма" относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, кодирующей белок, таким образом, что при наличии в клетке индивидуума кодирующая последовательность будет экспрессироваться.

При использовании в контексте данного документа термин "гомология" относится к степени комплементарности. Может быть частичная гомология или полная гомология (т.е. идентичность). Частично комплементарная последовательность, которая, по меньшей мере, частично ингибирует гибридизацию полностью комплементарной последовательности с нуклеиновой кислотой-мишенью, называется функциональным термином "по существу гомологичный". При использовании в отношении двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как кДНК или геномный клон, термин "по существу гомологичный", при использовании в контексте данного документа, относится к зонду, который может гибридизоваться с цепью двухцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты в условия низкой жесткости. При использовании в отношении последовательности одноцепочечной нуклеиновой кислоты термин "по существу гомологичный", при использовании в контексте данного документа, относится к зонду, который может гибридизоваться (то есть является комплементом) с одноцепочечной матричной последовательностью нуклеиновой кислоты в условиях низкой жесткости.

"Идентичный" или "идентичность", при использовании в контексте данного документа, в отношении двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, означает, что последовательности имеют определенный процент остатков, которые являются одинаковыми в указанной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в указанной области, определения количества позиций, в которых одинаковый остаток встречается в обеих последовательностях, получения количества совпадающих позиций, деления числа совпадающих позиций на общее количество позиций в указанной области и умножения результата на 100 для получения процентной идентичности последовательности. В тех случаях, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание приводит к одному или более выступающим концам, а указанная область сравнения содержит только одну последовательность, остатки одной последовательности вносятся в знаменатель, но не в числитель при расчетах. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентными. Идентичность может быть рассчитана вручную или с помощью компьютерного алгоритма для работы с последовательностями, такого как BLAST или BLAST 2.0.

"Иммунный ответ", при использовании в контексте данного документа, означает активацию иммунной системы хозяина, например, млекопитающего, в ответ на введение антигена. Иммунный ответ может быть в форме клеточного или гуморального ответа, или обоих.

"Нуклеиновая кислота" или "олигонуклеотид" или "полинуклеотид", при использовании в контексте данного документа, означают, что по меньшей мере два нуклеотида ковалентно связаны друг с другом. Описание одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает комплементарную цепь представленной одиночной цепи. Многие варианты нуклеиновой кислоты могут быть использованы для той же цели, что и данная нуклеиновая кислота. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает по существу идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные последовательности. Из одной цепи может быть получен зонд, который может гибридизоваться с последовательностью-мишенью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации.

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

Термин "функционально связанный" при использовании в контексте данного документа означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно связан. Промотор может быть расположен в 5' (до) или 3' (после) направлении от гена, находящегося под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть примерно таким же, как расстояние между этим промотором и геном, который он контролирует в гене, из которого получен промотор. Как известно в

данной области техники, изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери функции промотора.

Используемый в контексте данного документа термин "пептид", "белок" или "полипептид" может означать связанную последовательность аминокислот и может быть природным, синтетическим или модификацией или комбинацией природного и синтетического.

"Промотор" при использовании в контексте данного документа означает синтетическую или полученную в естественных условиях молекулу, которая способна придавать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или более специфических регуляторных транскрипционных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии последовательности. Промотор также может содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут находиться на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта начала транскрипции. Промотор может быть получен из источников, включая вирусы, бактерии, грибки, растения, насекомые и животные. Промотор может регулировать экспрессию генового компонента конститутивно или дифференциально в зависимости от клетки, ткани или органа, в которых происходит экспрессия, или в зависимости от стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Типовые примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, оператор-промотор lac, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

Термины "сигнальный пептид" и "лидерная последовательность" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, которая может быть присоединена на аминоконце белка, представленного в данном документе. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности обычно управляют локализацией белка. Используемые в данном документе сигнальные пептиды/лидерные последовательности могут облегчать секрецию белка из клетки, в которой он продуцируется. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности часто отщепляются от остатка белка, часто называемого зрелым белком, при секреции из клетки. Сигнальные пептиды/лидерные последовательности присоединены на амино-конце (то есть на N-конце) белка.

Термин "строгие условия гибридизации" при использовании в контексте данного документа означают условия, при которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизоваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), например, в многокомпонентной смеси нуклеиновых кислот. Строгие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Жесткие условия могут быть выбраны так, чтобы они были примерно на 5-10°C ниже, чем температура плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенном pH и ионной силе. T_m может представлять собой температуру (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются с последовательностью-мишенью в равновесии (так как последовательности мишени присутствуют в избытке, при T_m , 50% зондов находятся в равновесии). Жесткие условия могут быть такими, в которых концентрация соли составляет менее чем около 1,0 М иона натрия, например, концентрация около 0,01-1,0 М иона натрия (или других солей) при pH 7,0-8,3, и температура составляет, по меньшей мере, около 30°C для коротких зондов (например, около 10-50 нуклеотидов) и, по меньшей мере, около 60°C для длинных зондов (например, более, чем около 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты с добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал может по меньшей мере в 2-10 раз превышать фоновую гибридизацию. Типовые строгие условия гибридизации включают следующее: 50% формамида, 5× SSC и 1% SDS, инкубацию при температуре 42°C или 5× SSC, 1% SDS, инкубацию при 65°C, с промывкой в 0,2× SSC и 0,1% SDS при 65°C.

Термин "субъект" при использовании в контексте данного документа может означать млекопитающее, которое хочет или нуждается в иммунизации с помощью описанных в данном документе иммуногенных композиций. Млекопитающее может представлять собой человека, шимпанзе, собаку, кошку, лошадь, корову, мышь или крысу.

Термин "по существу комплементарный", при использовании в контексте данного документа, означает, что первая последовательность имеет, по меньшей мере, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности комплементу второй последовательности в области 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450, 540 или более нуклеотидов или аминокислот, или что две последовательности гибридизуются в строгих условиях гибридизации.

Термин "по существу идентичный", при использовании в контексте данного документа, означает, что первая и вторая последовательности имеют, по меньшей мере, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности в области 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 180, 270, 360, 450,

540 или более нуклеотидов или аминокислот или по отношению к нуклеиновым кислотам, если первая последовательность является по существу комплементарной комплементу второй последовательности.

Термин "лечение" или "лечить", при использовании в контексте данного документа, может означать защиту животного от заболевания посредством средств предотвращения, подавления, сдерживания или полного избавления от заболевания. Профилактика заболевания включает введение иммуногенной композиции согласно данному изобретению животному до начала заболевания. Подавление заболевания включает введение иммуногенной композиции согласно данному изобретению животному после индукции заболевания, но до его клинического проявления. Сдерживание заболевания включает введение иммуногенной композиции согласно данному изобретению животному после клинического проявления заболевания.

Термин "вариант", при использовании в контексте данного документа, в отношении нуклеиновой кислоты, означает (i) часть или фрагмент указанной нуклеотидной последовательности; (ii) комплемент указанной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) нуклеиновую кислоту, которая по существу идентична указанной нуклеиновой кислоте или ее комплементу; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в строгих условиях с указанной нуклеиновой кислотой, ее комплементом или последовательностями, по существу идентичными им.

Термин "вариант" в отношении пептида или полипептида, который отличается по аминокислотной последовательности вставкой, делецией или консервативным заменами аминокислот, но сохраняет, по меньшей мере, одну биологическую активность. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична указанному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативная замена аминокислоты, то есть замена аминокислоты другой аминокислотой со схожими свойствами (например, гидрофильностью, величиной и распределением заряженных областей), в данной области техники обычно рассматривается как незначительное изменение. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, в частности, с учетом гидропатического индекса аминокислот, как известно в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982). Гидропатический индекс аминокислоты основан на учете ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты с подобными гидропатическими индексами могут быть замещены и при этом сохранять функцию белка. В одном аспекте аминокислоты, имеющие гидропатические индексы ± 2 , являются замещенными.

Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замен, которые приводят к тому, что белки сохраняют биологическую функцию. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезной величиной, которая, как сообщается, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4554101, полностью включен в данный документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может привести к тому, что пептиды сохраняют биологическую активность, например иммуногенность, как известно в данной области техники. Замены могут быть выполнены с помощью аминокислот, имеющих значения гидрофильности в пределах ± 2 относительно друг друга. На индекс гидрофобности и значение гидрофильности аминокислот влияет конкретная боковая цепь этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением считается, что аминокислотные замены, которые совместимы с биологической функцией, зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, от боковых цепей этих аминокислот, что проявляется в гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и других свойствах.

Вариант может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая по существу идентична по всей длине полной последовательности гена или ее фрагмента.

Последовательность нуклеиновой кислоты может иметь 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94% 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по всей длине геновой последовательности или ее фрагмента. Вариант может представлять собой аминокислотную последовательность, которая по существу идентична по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотная последовательность может иметь 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности по всей длине аминокислотной последовательности или ее фрагмента.

Термин "вектор", при использовании в контексте данного документа, означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой вирусный вектор, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или дрожжевую искусственную хромосому. Вектор может представлять собой ДНК или РНК вектор. Вектор может представлять собой самореплицирующийся внехромосомный вектор, и в одном варианте реализации изобретения он представляет собой экспрессионную плазмиду. Вектор может содержать или иметь одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот.

2. Синтетический консенсусный TERT.

В изобретении предложена оптимизированная консенсусная последовательность антигена TERT. В одном варианте реализации изобретения антиген, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, способен вызывать иммунный ответ у млекопитающего. В одном варианте реализации

изобретения антиген, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может содержать эпитоп(ы), который делает его особенно эффективным в качестве иммуногена, против которого может быть индуцирован иммунный ответ.

Оптимизированная консенсусная последовательность может представлять собой консенсусную последовательность, полученную из двух или более нативных антигенов TERT. Оптимизированная консенсусная последовательность может содержать консенсусную последовательность и/или модификацию(и) для усиленной экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Козака для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности. Антиген TERT, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, но не ограничиваясь этим, сигнальный пептид иммуноглобулина E (IgE) или иммуноглобулина (IgG). В некоторых вариантах реализации изобретения антиген, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может содержать метку геммагглютинина (HA). Антиген TERT, кодируемый оптимизированной консенсусной последовательностью, может быть разработан для нарушения толерантности и синергизма с противораковой иммунной терапией.

В одном варианте реализации изобретения оптимизированный консенсусный TERT предназначен для нарушения толерантности к нативному TERT человека. В одном варианте реализации изобретения оптимизированная для человека консенсусная кодирующая последовательность TERT представляет собой такую, как указано в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В одном варианте реализации изобретения оптимизированный для человека кодируемый консенсусный TERT антиген имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56.

В одном варианте реализации изобретения оптимизированный консенсусный TERT предназначен для нарушения толерантности к нативному TERT мыши. В одном варианте реализации изобретения оптимизированная для мыши консенсусная кодирующая последовательность TERT представляет собой такую, как указано в SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 51. В одном варианте реализации изобретения оптимизированный для мыши кодируемый консенсусный TERT антиген имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 52.

В одном варианте реализации изобретения оптимизированный консенсусный TERT предназначен для нарушения толерантности к нативному TERT макаки резус. В одном варианте реализации изобретения оптимизированная для макаки резус консенсусная кодирующая последовательность TERT представляет собой такую, как указано в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В одном варианте реализации изобретения оптимизированный для мыши кодируемый консенсусный TERT антиген имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56.

В одном варианте реализации изобретения оптимизированный кодируемый консенсусный TERT антиген функционально связан с одним или более регуляторными элементами. В одном варианте реализации изобретения регуляторный элемент представляет собой лидерную последовательность. В одном варианте реализации изобретения оптимизированная консенсусная последовательность ДНК, функционально связанная с лидерную кодирующей последовательностью IgE, представлена в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 53. В одном варианте реализации изобретения оптимизированный консенсусный кодируемый антиген TERT, функционально связанный с лидерной последовательностью IgE, представлен в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 54.

В одном варианте реализации изобретения регуляторный элемент представляет собой стартовый кодон. Следовательно, в одном варианте реализации изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55 или их фрагменту или гомологу, функционально связанным с нуклеотидной последовательностью, содержащей стартовый кодон на 5' конце. В одном варианте реализации изобретение относится к аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 56, или их фрагменту или гомологу, функционально связанным с аминокислотой, кодируемой стартовым кодоном (например, метионином) на N-конце.

В одном варианте реализации изобретения регуляторный элемент представляет собой по меньшей мере один стоп-кодон. Следовательно, в одном варианте реализации изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55 или их фрагменту или гомологу, функционально связанным с нуклеотидной последовательностью, содержащей, по меньшей мере, один стоп-кодон на 3'-конце. В одном варианте реализации изобретения нуклеотидная последовательность функционально связана с двумя стоп-кодонами для повышения эффективности терминации трансляции.

В одном варианте реализации изобретения оптимизированная консенсусная последовательность, кодирующая антиген TERT, может кодировать пептид, имеющий аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56. В одном варианте реализации изобретения оптимизированная консенсусная последовательность может иметь нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность может представлять собой нуклеотидную последовательность, имеющую идентичность по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% относительно всей длины нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В других вариантах реализации изобретения последовательность может представлять собой нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56.

В некоторых вариантах реализации изобретения оптимизированный консенсусный антиген TERT может быть кодирован с помощью РНК, которая представляет собой транскрипт последовательности ДНК, имеющий идентичность по меньшей мере около 96, 97, 98, 99 или 100% относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах реализации изобретения оптимизированный консенсусный антиген TERT может быть кодирован с помощью РНК, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую идентичность, по меньшей мере, около 96, 97, 98, 99 или 100% относительно всей длины аминокислотных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56.

Оптимизированный консенсусный кодируемый антиген TERT может представлять собой пептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген может иметь аминокислотную последовательность, имеющую идентичность, по меньшей мере, около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам, представленным в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 95% гомологичны относительно SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенный фрагмент оптимизированного консенсусного антигена TERT кодирует по меньшей мере один иммунодоминантный или субиммунодоминантный эпитоп оптимизированного консенсусного полноразмерного антигена TERT.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55, содержащим по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% полной длины SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. Иммуногенные фрагменты могут быть по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичными фрагментам SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последователь-

ность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность.

3. Иммуногенная композиция.

В одном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать синтетический консенсусный антиген TERT, его фрагмент или его вариант. В одном варианте реализации изобретения антиген TERT представляет собой антиген TERT человека (hTERT). hTERT представляет собой обратную транскриптазу теломеразы человека, которая синтезирует метку TTAGGG на конце теломер для предотвращения гибели клеток из-за укорочения хромосом. Гиперпролиферативные клетки могут иметь аномально высокую экспрессию hTERT. Аномальная экспрессия hTERT также может возникать в гиперпролиферативных клетках, инфицированных HCV и HPV. Таким образом, иммунотерапия как для HPV, так и для HCV может быть усилена путем таргетирования клеток, которые экспрессируют hTERT на аномальных уровнях. Антигены HPV и HCV рассматриваются ниже более подробно. В одном аспекте раковый антиген hTERT может быть дополнительно определен в патентной заявке США № 14/139660, поданной 23 декабря 2013 года, которая включена в полном объеме посредством ссылки.

В одном варианте реализации изобретения антиген TERT представляет собой антиген TERT человека. Антигены TERT, не относящиеся к человеку, включают, но не ограничиваются этим, TERT мыши (mTERT) и TERT макаки-резус (rhTERT).

Экспрессия TERT в дендритных клетках, трансфицированных генами TERT, может индуцировать CD8⁺ цитотоксические Т-клетки и индуцировать CD4⁺ Т-клетки антиген-специфическим образом. Следовательно, использование экспрессии hTERT в антигенпрезентирующих клетках (APC) для задержки старения и поддержания их способности презентировать выбранный антиген может быть использовано в иммунотерапевтических способах, таких как способы, описанные в данном документе.

Антиген TERT может быть ассоциирован с или экспрессирован при любом числе онкологических заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, меланому, рак простаты, рак печени, рак шейки матки, рецидивирующий респираторный папилломатоз (RRP), рак анального канала, рак головы и шеи и онкологические заболевания крови. Соответственно, вакцина, если она содержит антиген TERT, описанный в данном документе, может быть использована для лечения субъектов, страдающих от любого количества онкологических заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, меланому, рак простаты, рак печени, рак шейки матки, рецидивирующий респираторный папилломатоз (RRP), рак анального канала, рак головы и шеи и онкологические заболевания крови.

Антиген TERT может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген TERT может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против TERT. Антиген TERT может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген TERT может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая

антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью антигена TERT или консенсусного антигена TERT посредством пептидной связи, соответственно. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может быть мутирована относительно антигена TERT дикого типа, таким образом, что одна или более аминокислот или остатков в аминокислотной последовательности антигена TERT или консенсусного антигена TERT соответственно заменены или замещены другой аминокислотой или остатком. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может быть мутирована относительно антигена TERT дикого типа, таким образом, что один или более остатков в аминокислотной последовательности антигена TERT или консенсусного антигена TERT, соответственно, заменены или замещены другим остатком, что приводит к тому, что иммунная система перестает быть толерантной к TERT у млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген TERT или консенсусный антиген TERT, антиген TERT или консенсусный антиген TERT, или их комбинацию. Нуклеиновая кислота, кодирующая антиген TERT или консенсусный антиген TERT, может быть мутирована относительно антигена TERT дикого типа, таким образом, что аргинин 589, аспартат 1005 или оба - аргинин 589 и аспартат 1005 в аминокислотной последовательности антигена TERT или консенсусного антигена TERT заменены или замещены остатком тирозина.

В одном аспекте антиген TERT может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 57, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 58 соответственно. SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 57 кодируют антиген TERT, соединенный с лидерной последовательностью IgE. В одном варианте реализации изобретения антиген TERT может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения антиген TERT может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген TERT может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 57. В других вариантах реализации изобретения антиген TERT может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 58. Антиген TERT может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 58.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные антигену TERT, иммуногенному фрагменту антигена TERT и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно последовательности, до 96% гомологии относительно последовательности, до 97% гомологии относительно последовательности, до 98% гомологии относительно последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты

реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерного антигена TERT, иммуногенных фрагментов антигена TERT и иммуногенных фрагментов белков, имеющих идентичность относительно антигена TERT. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 91% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 92% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 93% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 94% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 95% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 96% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 97% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT, до 98% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT и до 99% идентичности относительно полноразмерной последовательности TERT. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно антигенов TERT, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 57. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 57. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 57. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность антигена TERT представляет собой SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 58. Аминокислотная последовательность антигена TERT, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 58. Аминокислотная последовательность антигена TERT, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой HA.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 58. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии с белковыми последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 58. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии с белковыми последовательностями, представленными в SEQ ID

rhTERT, свободный или не связанный с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген TERT может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 55. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген TERT может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56. Консенсусный антиген TERT может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 56.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному антигену TERT, иммуногенному фрагменту консенсусного антигена TERT и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно последовательности, до 96% гомологии относительно последовательности, до 97% гомологии относительно последовательности, до 98% гомологии относительно последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерного консенсусного антигена TERT, иммуногенных фрагментов консенсусного антигена TERT и иммуногенных фрагментов белков, имеющих идентичность относительно консенсусного антигена TERT. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 90% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 91% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 92% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 93% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 94% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 95% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 96% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 97% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT, до 98% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT и до 99% идентичности относительно полноразмерной последовательности консенсусного TERT. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно консенсусных антигенов TERT, представленных в данном документе.

изобретения менее 48 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 54 аминокислоты, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 60 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 72 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 90 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 120 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 150 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 180 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 210 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 240 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 260 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 290 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 320 аминокислот кислоты, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 350 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 380 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 410 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 440 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 470 аминокислот, в вариантах реализации изобретения менее 500 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 530 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 560 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 590 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 620 аминокислот кислоты, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 650 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 680 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 710 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 740 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 770 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 800 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 830 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 860 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 890 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 920 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 950 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 980 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1010 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1040 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1070 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1200 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1230 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1260 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1290 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1320 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1350 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1380 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1410 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1440 аминокислот, в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1470 аминокислот и в некоторых вариантах реализации изобретения менее 1500 аминокислот.

Данное изобретение относится к противораковой иммуногенной композиции. Иммуногенная композиция может содержать один или более раковых антигенов. Иммуногенная композиция может предотвращать рост опухоли. Иммуногенная композиция может снижать рост опухоли. Иммуногенная композиция может предотвращать метастазирование опухолевых клеток. В зависимости от ракового антигена иммуногенная композиция может быть нацелена на лечение онкологических заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, рак печени, рак простаты, меланомы, онкологические заболевания крови, рак головы и шеи, глиобластому, рецидивирующий респираторный папилломатоз, рак анального канала, рак шейки матки, и рак мозга.

Первым шагом в разработке иммуногенной композиции является выявление ракового антигена, который не распознается иммунной системой и является аутоантигеном. Идентифицированный раковый антиген проходит изменение от аутоантигена к чужеродному антигену для распознавания иммунной системой. Перестройка нуклеиновой кислоты и аминокислотной последовательности рекомбинантного ракового антигена от аутоантигена к чужеродному антигену нарушает толерантность иммунной системы к антигену. Чтобы нарушить толерантность, к антигену рака может быть применено несколько способов модификации, как описано ниже.

Рекомбинантный раковый антиген иммуногенной композиции не распознается как аутоантиген, поэтому нарушает толерантность. Нарушение толерантности может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, ко-

торые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки.

В конкретном варианте реализации изобретения иммуногенная композиция может опосредовать клиренс или предотвращать рост опухолевых клеток путем индуцирования (1) гуморального иммунитета посредством В-клеточных ответов для генерации антител, которые блокируют выработку моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), тем самым замедляя развитие супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя рост опухоли; (2) увеличения уровней цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8⁺ (CTL), чтобы атаковать и убивать опухолевые клетки; (3) усиления ответов Т-хелперов; (4) и усиления воспалительных реакций с помощью IFN- γ и TFN- α или комбинации вышеуказанного. Иммуногенная композиция может увеличить безопуховую выживаемость на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 и 45%. Иммуногенная композиция может уменьшать массу опухоли на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 и 60% после иммунизации. Иммуногенная композиция может предотвращать и блокировать увеличение белка хемоаттрактанта моноцитов 1 (MCP-1), цитокина, секретируемого супрессорными клетками миелоидного происхождения. Иммуногенная композиция может увеличить выживаемость с опухолью на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 и 60%.

Иммуногенная композиция может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с клеточным иммунным ответом у субъекта, которому не вводили иммуногенную композицию. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию примерно в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с клеточным иммунным ответом у субъекта, которому не вводили иммуногенную композицию.

Иммуногенная композиция может увеличивать уровни гамма-интерферона (IFN- γ) у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили иммуногенную композицию. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция может повышать уровни IFN- γ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили иммуногенную композицию.

Иммуногенная композиция может представлять собой вакцину на основе нуклеиновой кислоты. В одном варианте реализации изобретения вакцина на основе нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК-вакцину. ДНК-вакцины описаны в патентах США № 5593972, 5739118, 5817637, 5830876, 5962428, 5981505, 5580859, 5703055 и 5676594, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. ДНК-вакцина может дополнительно содержать элементы или реагенты, которые препятствуют ее интеграции в хромосому.

Иммуногенная композиция может представлять собой РНК-вакцину. РНК-вакцина может быть введена в клетку. РНК-вакцина может дополнительно содержать элементы или реагенты, которые препятствуют ее интеграции в хромосому.

Иммуногенная композиция может представлять собой аттенуированную живую вакцину, вакцину с использованием рекомбинантных векторов для доставки антигена, субъединичные вакцины и гликопротеиновые вакцины, например, но не ограничиваясь этим, вакцины, описанные в патентах США №:

4510245; 4797368; 4722848; 4790987; 4920209; 5017487; 5077044; 5110587; 5112749; 5174993; 5223424; 5225336; 5240703; 5242829; 5294441; 5294548; 5310668; 5387744; 5389368; 5424065; 5451499; 5453364; 5462734; 5470734; 5474935; 5482713; 5591439; 5643579; 5650309; 5698202; 5955088; 6034298; 6042836; 6156319 и 6589529, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может иметь свойства, необходимые для эффективных вакцин, такие как безопасность, так что сама вакцина не вызывает заболевания или смерти; способность защищать от болезней; индукция нейтрализующего антитела; индукция защитных Т-клеточных ответов; и обеспечение простоты введения, небольшое количество побочных эффектов, биологическая стабильность и низкая стоимости в расчета на дозу. Иммуногенная композиция может соответствовать некоторым или всем из этих свойств путем содержания ракового антигена, как обсуждается ниже.

Как более подробно описано ниже, иммуногенная композиция может дополнительно содержать один или более ингибиторов одной или более молекул иммунной контрольной точки (то есть ингибитора иммунной контрольной точки). Молекулы иммунной контрольной точки описаны ниже более подробно. Ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой любую нуклеиновую кислоту или белок, которые предотвращают подавление любого компонента в иммунной системе, такого как презентация класса МНС, презентация и/или дифференциация Т-клеток, презентация и/или дифференциация В-клеток, любой цитокин, хемокин или передача сигналов для пролиферация и/или дифференциации иммунных клеток. Как также более подробно описано ниже, иммуногенную композицию можно дополнительно комбинировать с антителами к ингибиторам контрольных точек, такими как PD-1, PDL-1, CTLA4, TIM3 и LAG3 для усиления стимуляции как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Использование антител, направленных на иммунные белки контрольных точек, предотвращает подавление Т-клеточным и/или В-клеточным ответом иммунного белка контрольной точки.

Иммуногенная композиция также может содержать антиген или его фрагмент или вариант. Антигеном может быть все, что вызывает иммунный ответ у субъекта. Антиген может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, аминокислотную последовательность или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты также может содержать дополнительные последовательности, которые кодируют последовательности линкера или метки, которые связаны с антигеном с помощью пептидной связи. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, их вариант, их фрагмент или их комбинацию.

Антиген может содержаться в белке, нуклеиновой кислоте или их фрагменте или их варианте или их комбинации из любого числа организмов, например вируса, паразита, бактерии, гриба или млекопитающего. Антиген может быть ассоциирован с аутоиммунным заболеванием, аллергией или астмой. В других вариантах реализации изобретения антиген может быть ассоциирован с онкологическим заболеванием, герпесом, гриппом, гепатитом В, гепатитом С, вирусом папилломы человека (HPV) или вирусом иммунодефицита человека (HIV).

Некоторые антигены могут вызывать сильный иммунный ответ. Другие антигены могут вызывать слабый иммунный ответ. Антиген может вызывать более высокий иммунный ответ в сочетании с антигеном TERT.

Раковые антигены.

Иммуногенная композиция может содержать один или более раковых антигенов. Раковой антиген может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, аминокислотную последовательность или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты также может содержать дополнительные последовательности, которые кодируют последовательности линкера или метки, которые связаны с раковым антигеном с помощью пептидной связи. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Раковой антиген может представлять собой рекомбинантный раковый антиген.

В контексте данного изобретения "опухолевый антиген" или "антиген гиперпролиферативного расстройства" или "антиген, ассоциированный с гиперпролиферативным расстройством", относится к антигенам, которые являются общими для специфических гиперпролиферативных расстройств, таких как онкологическое заболевание. Обсуждаемые в данном документе антигены включены только в качестве примера. Этот список не должен рассматриваться как исключительный, и дополнительные примеры будут очевидны для специалистов в данной области техники.

Раковые антигены или опухолевые антигены представляют собой белки, которые вырабатываются опухолевыми клетками, которые вызывают иммунный ответ, в частности, опосредованные Т-клетками иммунные ответы. Выбор антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению будет зависеть от конкретного типа онкологического заболевания, подлежащего лечению. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области техники и включают, например, глиом-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA), β-хорионный гонадотропин человека, альфа-фетопротеин (AFP), лектин-реактивный AFP, тироглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, человеческую теломеразную обратную транскрип-

тазу, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, простат-специфический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, протеин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломеразу, антиген-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофильную эластазу, эфрин B2, CD22, инсулиновый фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В одном варианте реализации изобретения опухолевый антиген содержит один или более раковых антигенных эпитопов, ассоциированных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить антигенами-мишенями для иммунной атаки. Эти молекулы включают, но не ограничиваются этим, тканеспецифичные антигены, такие как MART-1, тирозиназу и GP 100 при меланоме и простатическую кислотную фосфатазу (PAP) и простат-специфический антиген (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени относятся к группе связанных с трансформацией молекул, таких как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одной группой антигенов-мишеней являются онкофетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме иммуноглобулин со специфическим для опухоли идиотипом представляет собой действительно специфический для опухоли антиген иммуноглобулина, который является уникальным для отдельной опухоли. Дифференцировочные антигены В-клеток, такие как CD19, CD20 и CD37, являются другими кандидатами для целевых антигенов при В-клеточной лимфоме. Некоторые из этих антигенов (CEA, HER-2, CD19, CD20, идиотип) использовались в качестве мишеней для пассивной иммунотерапии моноклональными антителами с ограниченным успехом.

Тип опухолевого антигена, упоминаемый в изобретении, также может представлять собой опухолеспецифический антиген (TSA) или ассоциированный с опухолью антиген (TAA). TSA является уникальным для опухолевых клеток и не встречается в других клетках организма. Ассоциированный с TAA антиген не является уникальным для опухолевой клетки и вместо этого также экспрессируется на нормальной клетке в условиях, которые не могут вызвать состояние иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена в опухоли может происходить в условиях, которые позволяют иммунной системе реагировать на антиген. TAA могут представлять собой антигены, которые экспрессируются на нормальных клетках во время развития плода, когда иммунная система является незрелой и неспособной реагировать, или они могут представлять собой антигены, которые обычно присутствуют при чрезвычайно низких уровнях в нормальных клетках, но которые экспрессируются при гораздо более высоких уровнях на опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры антигенов TSA или TAA включают следующее: Дифференцирующие антигены, такие как MART-1/Melan-A (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифичные многолинейные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессируемые эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессируемые онкогены и мутированные гены-супрессоры опухолей, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных транслокаций; такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барра EBVA и антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7. Другие крупные антигены на основе белков включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеин, бета-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\p1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90\Mac-2-связывающий белок\связанный с циклофилином С белок, TAAL6, TAG72, TLP, и TPS.

Антиген TERT и, необязательно, одно или более антител, нацеленных на один или более белков иммунной контрольной точки, могут быть связаны или объединены с опухолевым антигеном или его фрагментом или вариантом. Маркеры рака представляют собой известные белки, которые присутствуют или активируются в случае определенных раковых клеток. Используя методологию производства антигенов, которые презентуют такие маркеры для нарушения толерантности к себе, можно создать противораковую вакцину. Такие противораковые вакцины могут содержать антиген TERT и, необязательно, одно или более антител, нацеленных на один или более белков иммунной контрольной точки для усиления иммунного ответа, и, необязательно, один или более дополнительных опухолевых антигенов. Ниже приведены некоторые типовые опухолевые антигены:

(1) Тирозиназа (Тур).

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать антиген тирозиназу (Тур), ее фрагмент или ее вариант. Тирозиназа представляет собой медьсодержащий фермент, обладающий каталитической активностью в отношении тирозингидроксилазы и допа-оксидазы, который можно обнаружить в микроорганизмах и тканях растений и животных. В частности, тирозиназа катализирует выработку меланина и других пигментов путем окисления фенолов, таких как тирозин. Мутации в гене TYR приводят к окулокутанному альбинизму у млекопитающих, а непатологические полиморфизмы в гене TYR способствуют изменению пигментации кожи.

Кроме того, при раке или опухолях, таких как меланома, тирозиназа может стать нерегулируемой, что приводит к увеличению синтеза меланина. Соответственно, тирозиназа может быть раковым антиге-

ном, связанным с меланомой. У субъектов, страдающих меланомой, тирозиназа может быть мишенью при распознавании цитотоксическими Т-клетками. Однако в некоторых случаях иммунный ответ на рак или опухоль (включая меланому) может быть подавлен, что приводит к микроокружению, которое поддерживает образование и/или рост опухоли и, таким образом, прогрессирование заболевания.

Подавление иммунитета может быть облегчено супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), которые представляют собой смешанную популяцию незрелых макрофагов, гранулоцитов, дендритных клеток и миелоидных клеток. Миелоидные клетки могут быть гетерогенной популяцией миелоидных клеток-предшественников и незрелых миелоидных клеток (IMC). Маркеры MDSC могут включать экспрессию Gr-1 и CD11b (то есть, клеток Gr-1⁺ и CD11b⁺).

Циркуляция MDSC может увеличиваться из-за хронической инфекции, и увеличение популяций MDSC может быть связано с аутоиммунитетом и воспалением. В частности, увеличение MDSC (или присутствие в опухоли или раковой ткани) может способствовать росту опухоли и избеганию иммунного обнаружения и/или регуляции, и, таким образом, MDSC могут влиять на иммунные ответы на противоопухолевые вакцины.

MDSC могут регулироваться регулятором передачи сигналов G-белка 2 (Rgs2), а Rgs2 может быть высоко экспрессирован в MDSC, полученных из опухолей. Rgs2 также может широко экспрессироваться в различных клетках, например в миелоидных клетках. MDSC, полученные от мышей с опухолями, могут функционировать иначе, чем MDSC, полученные от мышей, не имеющих опухолей. Одним из таких отличий может быть активация продукции хемокина MCP-1, который секретируется MDSC. MCP-1 может стимулировать миграцию клеток путем передачи сигналов через CCR2, рецептор, связанный с G-белком (GPCR), обнаруженный в моноцитах, эндотелиальных клетках и Т-клетках. Соответственно, MCP-1 может вызывать миграцию эндотелиальных клеток, тем самым способствуя васкуляризации. Блокирование MCP-1 с помощью нейтрализующих антител может ингибировать ангиогенез и, следовательно, может приводить к уменьшению метастазов опухоли и увеличению выживаемости. Как таковой, MCP-1 можно считать ангиогенным фактором. Помимо секреции MCP-1, MDSC могут секретировать факторы роста, тем самым дополнительно способствуя росту опухоли.

Антиген Туг может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Как указано в данном документе, антиген Туг индуцирует антиген-специфические ответы Т-клеток и ответы в виде антител с высоким титром против раковых или опухолевых клеток (например, клеток меланомы). В частности, антиген Туг является важной мишенью для иммуноопосредованного клиренса путем индуцирования (1) гуморального иммунитета посредством В-клеточных ответов для генерации антител, которые блокируют выработку моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), тем самым замедляя развитие супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя рост опухоли; (2) увеличения уровней цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8⁺ (CTL), чтобы атаковать и убивать опухолевые клетки; (3) усиления ответов Т-хелперов; и (4) усиления воспалительных реакций с помощью IFN- γ и TNF- α или комбинации вышеуказанного. Как таковой, защитный иммунный ответ против образования опухоли и роста опухоли обеспечивается иммуногенными композициями, содержащими антиген Туг (например, консенсусный антиген Туг, который описан более подробно ниже), поскольку эти иммуногенные композиции предотвращают подавление иммунитета путем уменьшения популяции MDSC, обнаруживаемых в раковой или опухолевой ткани и блокируют васкуляризацию раковой или опухолевой ткани путем снижения выработки или секреции MCP-1. Соответственно, любой пользователь может создать иммуногенную композицию согласно данному изобретению для включения антигена Туг для обеспечения широкого иммунитета против образования опухолей, метастазирования опухолей и роста опухолей.

Антиген Туг может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против Туг. Антиген Туг может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген Туг может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген Туг, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Туг, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген Туг, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Туг, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Туг, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Туг, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена Туг посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Туг, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Туг, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген Туг может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Последовательность SEQ ID NO: 1 кодирует консенсусный белок Туг, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок Туг может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой НА. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок Туг может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой НА.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген Туг может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 1. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген Туг может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2. Консенсусный антиген Туг может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку Туг, иммуногенному фрагменту консенсусного белка Туг и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирую-

щей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков Туг, иммуногенных фрагментов консенсусного белка Туг и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка Туг. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Туг. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков Туг, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 1. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 1. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка Туг представляет собой SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность консенсусного белка Туг, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность консенсусного белка Туг, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 2. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 2.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые идентичны SEQ ID NO: 2. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 80% идентична полноразмерной консенсусной амино-

торые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 2. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(2) Тирозиназа-зависимый белок 1 (TYRP1).

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать тирозиназа-зависимый белок 1 (TYRP1), его фрагмент или его вариант. TYRP1, кодируемый геном TYRP1, представляет собой трансмембранный гликопротеин 75 кДа и экспрессируется как в нормальных, так и в злокачественных меланоцитах и клетках меланомы. Как и тирозиназа, TYRP1 содержит модифицированный M-Box, который может связываться с микрофальмия-ассоциированным фактором транскрипции (MITF), который играет центральную роль в меланоците в активации пигментации, пролиферации и дифференциации клеток. TYRP1 может помочь стабилизировать тирозиназу и может формировать гетеродимер, который может предотвратить преждевременную смерть меланоцитов, ослабляя опосредованную тирозиназой цитотоксичность.

Как описано выше для тирозиназы, тирозиназа-зависимый белок 1 (TYRP-1) также может участвовать в синтезе меланина и пигментных механизмах меланоцитов и может распознаваться иммунной системой у субъектов, страдающих меланомой.

Соответственно, TYRP-1 может быть антигеном, ассоциированным с меланомой.

Антиген TYRP-1 может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген TYRP-1 может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против TYRP-1. Антиген TYRP-1 может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген TYRP-1 может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, может

быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена TYRP-1 посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP-1, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген TYRP-1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Последовательность SEQ ID NO: 3 кодирует консенсусный белок TYRP-1, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок TYRP-1 может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой НА. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок TYRP-1 может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой НА.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген TYRP-1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 3. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген TYRP-1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4. Консенсусный антиген TYRP-1 может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку TYRP-1, иммуногенному фрагменту консенсусного белка TYRP-1 и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков TYRP-1, иммуногенных фрагментов консенсусного белка TYRP-1 и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка TYRP-1. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности TYRP-1, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1 и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP-1. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков TYRP-1, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 3. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 3. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка TYRP-1 представляет собой SEQ ID NO: 4. Аминокислотная последовательность консенсусного белка TYRP-1, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 4. Аминокислотная последовательность консенсусного белка TYRP-1, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 4. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 4.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые идентичны SEQ ID NO: 4. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют

имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 4. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(3) Тирозиназа-зависимый белок 2 (TYRP2).

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген тирозиназа-зависимый белок 2 (TYRP2; также известный как допахром таутомераза (DCT)), его фрагмент или его вариант. TYRP2/DCT, кодируемый геном TYRP2/DCT, представляет собой белок, состоящий из 519 аминокислот и экспрессируемый как в нормальных, так и в злокачественных меланоцитах и клетках меланомы. TYRP2/DCT является хорошо охарактеризованным меланоцит-специфическим ферментом, который в сочетании с тирозиназой и TYRP1 играет роль в превращении L-тирозина в меланин в меланоцитах. DCT специфически катализирует таутомеризацию предшественников меланина L-DOPA хрома в 5,6-дигидроиндол-2-карбоновую кислоту (DHICA), которая впоследствии окисляется TYRP1 (как обсуждалось выше) с образованием эумеланина. Исследования показали, что TYRP2/DCT может быть медиатором лекарственной устойчивости в клетках меланомы со специфичностью к ДНК-повреждающим агентам. Так как часто сообщалось о высокой экспрессии TYRP2/DCT в меланомах, этот специфический для меланоцитов фермент играет важную роль, способствуя внутреннему резистентному фенотипу меланом к различным противоопухолевым ДНК-повреждающим препаратам.

Как описано выше для тирозиназы, тирозиназа-зависимый белок 2 (TYRP-2) также может участвовать в синтезе меланина и распознаваться иммунной системой у субъектов, страдающих меланомой. Кроме того, TYRP-2 может опосредовать лекарственную устойчивость в клетках меланомы. Соответственно, TYRP-2 может представлять собой антиген, ассоциированный с меланомой.

Антиген TYRP-2 может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген TYRP2 может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против TYRP2. Антиген TYRP2 может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген TYRP2 может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена TYRP2 посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген TYRP2, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген TYRP2 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Последовательность SEQ ID NO: 5 кодирует консенсусный белок TYRP2, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок TYRP2 может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок TYRP2 может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген TYRP2 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 5. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген TYRP2 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6. Консенсусный антиген TYRP2 может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку TYRP2, иммуногенному фрагменту консенсусного белка TYRP2 и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В не-

которых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков TYRP2, иммуногенных фрагментов консенсусного белка TYRP2 и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка TYRP2. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности TYRP2, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2 и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности TYRP2. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков TYRP2, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 5. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 5. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка TYRP2 представляет собой SEQ ID NO: 6. Аминокислотная последовательность консенсусного белка TYRP2, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 6. Аминокислотная последовательность консенсусного белка TYRP2, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID

меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 6. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(4) Меланома-ассоциированный антиген 4 (MAGEA4).

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать Меланома-ассоциированный Антиген 4 (MAGEA4), его фрагмент или его вариант. MAGE-A4, кодируемый геном MAGE-A4, представляет собой белок, состоящий из 317 аминокислот и экспрессируемый в мужских половых клетках и опухолевых клетках различных гистологических типов, например, в случае карциномы желудочно-кишечного тракта, пищевода и легких. MAGE-A4 связывает онкопротеином, ганкирином. Это специфическое связывание MAGE-A4 опосредовано его C-концом. Исследования показали, что экзогенный MAGE-A4 может частично ингибировать независимый от адгезии рост клеток со сверхэкспрессией ганкирина *in vitro* и подавлять образование мигрирующих опухолей из этих клеток у бестимусных мышей. Это ингибирование зависит от связывания между MAGE-A4 и ганкирином, что указывает на то, что взаимодействия между ганкирином и MAGE-A4 ингибируют ганкирин-опосредованный канцерогенез. Вполне вероятно, что экспрессия MAGE в опухолевой ткани является не причиной, а результатом опухолевого генеза, и гены MAGE принимают участие в иммунном процессе, таргетируя ранние опухолевые клетки для уничтожения.

Белок меланома-ассоциированного антигена 4 (MAGEA4) может быть вовлечен в эмбриональное развитие и трансформацию и/или прогрессирование опухоли. MAGEA4 обычно экспрессируется в яичках и плаценте. MAGEA4, однако, может быть экспрессирован во многих различных типах опухолей, например, меланоме, плоскоклеточном раке головы и шеи, раке легких и раке молочной железы. Соответственно, MAGEA4 может быть антигеном, ассоциированным с различными опухолями.

Антиген MAGEA4 может индуцировать антиген-специфический T-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспресси-

рующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген MAGEA4 может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против MAGEA4. Антиген MAGEA4 может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген MAGEA4 может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина Е (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген T_H1, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена MAGEA4 посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген MAGEA4, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген MAGEA4 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Последовательность SEQ ID NO: 7 кодирует консенсусный белок MAGEA4, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок MAGEA4 может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок MAGEA4 может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген MAGEA4 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 7. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген MAGEA4 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. Консенсусный антиген MAGEA4 может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку MAGEA4, иммуногенному фрагменту консенсусного белка MAGEA4 и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты

реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков MAGEA4, иммуногенных фрагментов консенсусного белка MAGEA4 и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка MAGEA4. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4 и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности MAGEA4. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков MAGEA4, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 7. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 7. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка MAGEA4 представляет собой SEQ ID NO: 8. Аминокислотная последовательность консенсусного белка MAGEA4, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 8. Аминокислотная последовательность консенсусного белка MAGEA4, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой HA.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 8. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 8. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют

гут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 8. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(5) Соматотропин-релизинг-гормон (GHRH).

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген соматотропин-релизинг-гормон (GHRH; также известный как фактор, высвобождающий гормон роста (GRF или GHRF) или соматокринин), его фрагмент или его вариант. GHRH представляет собой пептидный гормон из 44 аминокислот, продуцируемый в дугообразном ядре гипоталамуса. GHRH секретируется гипоталамусом и стимулирует высвобождение гормона роста, регулятора роста, регулятора обмена веществ и структуры тела, из гипофиза. GHRH также стимулирует выработку гормона роста. Антагонисты GHRH могут ингибировать рост различных видов рака, например, остеосаркомы, глиобластомы, рака предстательной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, колоректального рака и рака молочной железы. Соответственно, GHRH может быть антигеном, ассоциированным с различными опухолями.

Антиген GHRH может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL,

цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген GHRH может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против GHRH. Антиген GHRH может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген GHRH может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген GHRH, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген GHRH, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген GHRH, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген GHRH, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген GHRH, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина Е (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген GHRH, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена GHRH посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген GHRH, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген GHRH, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген GHRH может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Последовательность SEQ ID NO: 9 кодирует консенсусный белок GHRH, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок GHRH может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой НА. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок GHRH может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой НА.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген GHRH может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительной всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 9. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген GHRH может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Консенсусный антиген GHRH может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку GHRH, иммуногенному фрагменту консенсусного белка GHRH и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот,

представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков GHRH, иммуногенных фрагментов консенсусного белка GHRH и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка GHRH. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности GHRH, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности GHRH. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков GHRH, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 9. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 9. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка GHRH представляет собой SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность консенсусного белка GHRH, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность консенсусного белка GHRH, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой HA.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 10. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 10. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 10. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, кото-

меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 10. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(6) MART-1/Мелан-А.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген MART-1 (также известный как Мелан-А), его фрагмент или его вариант. MART-1, кодируемый геном MLANA, представляет собой белок из 118 аминокислот, содержащий один трансмембранный домен, и экспрессируется в большинстве клеток меланомы. MART-1 образует комплекс со структурным белком и влияет на его экспрессию, стабильность, транспортировку и процессинг, который необходим для структуры и созревания меланосомы. Соответственно, MART-1 необходим для регуляции пигментации млекопитающих. Дефекты созревания меланосом связаны с предрасположенностью к раку. MART-1 может экспрессироваться при многочисленных раковых заболеваниях, включая, но не ограничиваясь этим, меланомы.

Мелан-А, также известный как антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1), является дифференцировочным антигеном меланоцитов и может быть обнаружен в нормальной коже, сетчатке и меланоцитах. Мелан-А может быть ассоциирован с эндоплазматической сетью и меланосомами. Мелан-А может распознаваться цитотоксическими Т-клетками как антиген на клетках меланомы, но также может быть ассоциирован с другими опухолями, имеющими меланоцитарное происхождение или дифференциацию (то есть клетки, имеющие меланосомы), например, светлоклеточной саркомой и меланотической нейрофибромой. Соответственно, Мелан-А может быть антигеном, ассоциированным с различными опухолями, происходящими от клеток, имеющих меланосомы.

Антиген Мелан-А может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализа-

ции изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген Мелан-А может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против Мелан-А. Антиген Мелан-А может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген Мелан-А может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина Е (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена Мелан-А посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген Мелан-А, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген Мелан-А может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. Последовательность SEQ ID NO: 11 кодирует консенсусный белок Мелан-А, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок Мелан-А может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой НА. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок Мелан-А может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой НА.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген Мелан-А может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 11. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген Мелан-А может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12. Консенсусный антиген Мелан-А может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку Мелан-А, иммуногенному фрагменту консенсусного белка Мелан-А и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой

кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков Мелан-А, иммуногенных фрагментов консенсусного белка Мелан-А и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка Мелан-А. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности Мелан-А, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности Мелан-А. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков Мелан-А, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 11. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 11. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка Мелан-А представляет собой SEQ ID NO: 12. Аминокислотная последовательность консенсусного белка Мелан-А, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 12. Аминокислотная последовательность консенсусного белка Мелан-А, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 12. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые име-

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 12. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 12. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, 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, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(7) NY-ESO-1.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген нью-йоркского рака пищевода-1 (NY-ESO-1; также называемый CTAG1), его фрагмент или его вариант. NY-ESO-1, кодируемый геном CTAG1B, представляет собой белок длиной 180 аминокислот с богатой глицином-N-концевой-областью и чрезвычайно гидрофобной C-концевой областью. NY-ESO-1 характеризуется ограниченной экспрессией в нормальных тканях, но часто встречается при онкологических заболеваниях. NY-ESO-1 может быть экспрессирован при многочисленных онкологических заболеваниях, включая, но не ограничиваясь этим, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак пищевода, желудка, гепатокарцинома, рак головы и шеи, меланома, мелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, синовиальная карцинома и рак простаты.

Антиген рака яичек (NY-ESO-1) может быть экспрессирован в яичках и яичниках. NY-ESO-1 может быть ассоциирован с различными видами рака и может вызывать гуморальные иммунные реакции. У субъектов, страдающих от рака или опухолей, может развиваться иммуногенность по отношению к NY-ESO-1. Соответственно, NY-ESO-1 может быть антигеном, ассоциированным с различными опухолями.

Антиген NY-ESO-1 может индуцировать антиген-специфический T-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать

один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген NY-ESO-1 может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-1, в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с клеточным иммунным ответом у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-1. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген NY-ESO-1 может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-1, в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с клеточным иммунным ответом у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-1.

Антиген NY-ESO-1 может увеличивать уровни гамма-интерферона (IFN- γ) у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-1, в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-1. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген NY-ESO-1 может увеличивать уровни IFN- γ у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-1, в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-1.

Антиген NY-ESO-1 может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против NY-ESO-1. Антиген NY-ESO-1 может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген NY-ESO-1 может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина Е (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена NY-ESO-1 посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген NY-ESO-1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 13, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. Последовательность SEQ ID NO: 13 кодирует консенсусный белок NY-ESO-1, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок NY-ESO-1 может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок NY-ESO-1 мо-

жет быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой НА.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген NY-ESO-1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 13. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген NY-ESO-1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14. Консенсусный антиген NY-ESO-1 может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку NY-ESO-1, иммуногенному фрагменту консенсусного белка NY-ESO-1 и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков NY-ESO-1, иммуногенных фрагментов консенсусного белка NY-ESO-1 и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка NY-ESO-1. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1 и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-1. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков NY-ESO-1, представленных в данном документе.

ния фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(8) NY-ESO-2.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген нью-йоркского рака пищевода-2 (NY-ESO-2; также известный как антиген рака яичек 2, ESO2 и LAGE1), его фрагмент или его вариант. NY-ESO-2 является аутоиммуногенным опухолевым антигеном, который принадлежит к семейству ESO/LAGE антигенов рака яичек. NY-ESO-2 может быть экспрессирован при различных видах рака, включая меланому, рак молочной железы, рак мочевого пузыря и рак простаты, и обычно экспрессируется в ткани яичка. Кроме того, NY-ESO-2 может быть обнаружен в 25-50% опухолевых образцов меланом, немелкоклеточного рака легкого, рака мочевого пузыря, предстательной железы и рака головы и шеи. Ген, кодирующий NY-ESO-2, также содержит альтернативную открытую рамку считывания, которая кодирует белок, названный CAMEL, опухолевый антиген, который распознается меланома-специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Подобно NY-ESO-1, NY-ESO-2 может экспрессироваться в яичке и яичнике. NY-ESO-2 также может быть ассоциирован с различными видами рака и иммуногенен у субъектов, страдающих от рака или опухолей. Соответственно, NY-ESO-2 может быть антигеном, ассоциированным с многочисленными опухолями.

Антиген NY-ESO-2 может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген NY-ESO-2 может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-2, в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с клеточным иммунным ответом у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-2. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген NY-ESO-2 может усиливать клеточный иммунный ответ у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-2, в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с клеточным иммунным ответом у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-2.

Антиген NY-ESO-2 может увеличивать уровни гамма-интерферона (IFN- γ) у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-2, в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-2. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген NY-ESO-2 может увеличивать уровни IFN- γ у субъекта, которому вводят антиген NY-ESO-2, в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300

раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили антиген NY-ESO-2.

Антиген NY-ESO-2 может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против NY-ESO-2. Антиген NY-ESO-2 может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген NY-ESO-2 может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена NY-ESO-2 посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген NY-ESO-2 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. Последовательность SEQ ID NO: 1 кодирует консенсусный белок NY-ESO-2, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок NY-ESO-2 может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок NY-ESO-2 может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген NY-ESO-2 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 15. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген NY-ESO-2 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16. Консенсусный антиген NY-ESO-2 может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку NY-ESO-2, иммуногенному фрагменту консенсусного белка NY-ESO-2 и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими по-

следовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков NY-ESO-2, иммуногенных фрагментов консенсусного белка NY-ESO-2 и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка NY-ESO-2. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2 и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности NY-ESO-2. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков NY-ESO-2, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 15. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 15. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка NY-ESO-2 представляет собой SEQ ID NO: 16. Аминокислотная последовательность консенсусного белка NY-ESO-2, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 16. Аминокислотная последовательность консенсусного белка NY-ESO-2, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые име-

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 16. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 16. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(9) PRAME.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать антиген PRAME, его фрагмент, или его вариант. PRAME, кодируемый геном PRAME, представляет собой белок, состоящий из 509 аминокислот и экспрессируемый в яичках, плаценте, эндометрии, яичниках, надпочечниках и в тканях, полученных из меланомы, карциномы легких, карциномы почек и карциномы головы и шеи. PRAME также экспрессируется при острого лейкоза у взрослых и детей и множественной миеломе. PRAME содержит иммуногенный нонапептид, способный вызывать цитотоксический ответ при презентации HLA-A24. Исследования показывают, что сверхэкспрессия PRAME в культивируемых клетках вызывает каспаза-независимую гибель клеток, приводящую к более низкой скорости пролиферации. Другие исследования демонстрируют, что сверхэкспрессия PRAME также обеспечивает преимущества роста или выживаемости путем антагонизации передачи сигналов рецептора ретиноевой кислоты (RAR) и участвует в онкогенном процессе в качестве одной из причин. Интерференция передачи сигналов RAR приводит к потере регуляции клеточной пролиферации, развития и дифференциации.

PRAME может иметь паттерн экспрессии, сходный с антигенами MAG, BAGE и GAGE рака яичек, а именно экспрессию в яичках. Однако PRAME может быть экспрессирован в меланомах человека и острых лейкозах. PRAME может распознаваться цитолитическими Т-лимфоцитами. Соответственно, PRAME может быть антигеном, связанным с меланомой и лейкозами.

Антиген PRAME может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или

как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

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

Антиген PRAME может увеличивать уровни гамма-интерферона (IFN- γ) у субъекта, которому вводят антиген PRAME, в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили антиген PRAME. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген PRAME может увеличивать уровни IFN- γ у субъекта, которому вводят антиген PRAME, в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в 3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз по сравнению с уровнями IFN- γ у субъекта, которому не вводили антиген PRAME.

Антиген PRAME может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против PRAME. Антиген PRAME может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген PRAME может содержать консенсусный белок.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PRAME, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PRAME, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PRAME, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PRAME, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PRAME, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина Е (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PRAME, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена PRAME посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PRAME, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PRAME, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

Консенсусный антиген PRAME может представлять собой последовательность нуклеиновой кисло-

ты SEQ ID NO: 17, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Последовательность SEQ ID NO: 17 кодирует консенсусный белок PRAME, соединенный с лидерной последовательностью IgE. Консенсусный белок PRAME может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок PRAME может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PRAME может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительной всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 17. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PRAME может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку PRAME, иммуногенному фрагменту консенсусного белка PRAME и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков PRAME, иммуногенных фрагментов консенсусного белка PRAME и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка PRAME. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PRAME. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот,

мере 95%, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

(10) PSA.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать простат-специфический антиген (PSA; также известный как гамма-семинопротеин или калликреин-3 (KLK3)), его фрагмент или его вариант. PSA является андроген-регулируемой сериновой протеазой, продуцируемой эпителиальными клетками предстательной железы и клетками рака предстательной железы и кодируется геном KLK3. PSA часто используется в качестве сывороточного маркера при раке предстательной железы. PSA является представителем семейства тканевых калликреинов и расщепляет семеногелины в семенном коагуляте после расщепления профермента для высвобождения активного фермента, тем самым разжижая сперму, чтобы сперма могла обладать текучестью. Кроме того, ферментативная активность PSA регулируется концентрацией цинка, а именно высокие концентрации цинка ингибируют ферментативную активность PSA.

Антиген PSA может индуцировать антиген-специфический T-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных T-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген PSA может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против PSA. Антиген PSA может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген PSA может содержать консенсусный белок.

Консенсусный антиген PSA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 63, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. Консенсусный белок PSA может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок PSA может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA. Консенсусная последовательность PSA может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, включая, но не ограничиваясь этим, стартовый кодон и по меньшей мере один стоп-кодон.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PSA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительной всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 63. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PSA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64. Консенсусный антиген PSA может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых ки-

слот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку PSA, иммуногенному фрагменту консенсусного белка PSA и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков PSA, иммуногенных фрагментов консенсусного белка PSA и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка PSA. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSA. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков PSA, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 63. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 63. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 63. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по

мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% консенсусного белка. Могут быть предложены иммуногенные фрагменты SEQ ID NO: 64. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 64. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 64. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 64. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, 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, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PSA, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PSA, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA)

для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена PSA посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSA, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

(11) PSMA.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый простат-специфический мембранный антиген (PSMA; также известный как глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II), N-ацетил-L-аспартил-L-глутаматпептидаза I (NAALADase I) и NAAG-пептидаза), его фрагмент, или его вариант. PSMA кодируется геном фолатгидролазы 1 (FOLH1). PSMA представляет собой цинковый металлофермент, находящийся в мембранах и внеклеточном пространстве. PSMA высоко экспрессируется в простате человека и имеет повышенные уровни экспрессии при раке предстательной железы. Также обнаружено, что PSMA сверхэкспрессируется при других формах рака, таких как солидные опухоли почки, молочной железы и толстой кишки.

Антиген PSMA может индуцировать антиген-специфический T-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных T-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген PSMA может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против PSMA. Антиген PSMA может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген PSMA может содержать консенсусный белок.

Консенсусный антиген PSMA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 65, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. Консенсусный белок PSMA может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок PSMA может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA. Консенсусная последовательность PSMA может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, включая, но не ограничиваясь этим, стартовый кодон и по меньшей мере один стоп-кодон.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PSMA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID №: 65. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PSMA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66. Консенсусный антиген PSMA может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку PSMA, иммуногенному фрагменту кон-

сенсусного белка PSMA и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков PSMA, иммуногенных фрагментов консенсусного белка PSMA и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка PSMA. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности PSMA, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSMA. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков PSMA, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 65. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 65. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%

по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% консенсусного белка. Могут быть предложены иммуногенные фрагменты SEQ ID NO: 66. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 66. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 66. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PSMA, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PSMA, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA)

для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена PSMA посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSMA, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

(12) STEAP.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген шеститрансмембранный эпителиальный антиген простаты (STEAP), его фрагмент, или его вариант. STEAP представляет собой металлоредуктазу, кодируемую геном STEAP1. STEAP в значительной степени экспрессируется в тканях предстательной железы и имеет повышенные уровни экспрессии в раковых клетках. Предполагается, что STEAP представляет собой шеститрансмембранный белок и является антигеном клеточной поверхности, обнаруживаемым в клеточных соединениях.

Антиген STEAP может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген STEAP может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против STEAP. Антиген STEAP может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген STEAP может содержать консенсусный белок.

Консенсусный антиген STEAP может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 67, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. Консенсусный белок STEAP может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок STEAP может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA. Консенсусная последовательность STEAP может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, включая, но не ограничиваясь этим, стартовый кодон и по меньшей мере один стоп-кодон.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген STEAP может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 67. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген STEAP может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68. Консенсусный антиген STEAP может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку STEAP, иммуногенному фрагменту консенсусного белка STEAP и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95%

гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков STEAP, иммуногенных фрагментов консенсусного белка STEAP и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка STEAP. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности STEAP, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности STEAP. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков STEAP, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 67. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 67. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% консенсусного белка. Могут быть предложены иммуногенные фрагменты SEQ ID NO: 68. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 68. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 68. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген STEAP, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген STEAP, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, также может кодировать лидер-

ную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена STEAP посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген STEAP, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

(13) PSCA.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген простат-специфический антиген стволовых клеток (PSCA), его фрагмент, или его вариант. PSCA представляет собой гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренный белок клеточной поверхности и кодируется андроген-чувствительным геном. PSCA является представителем семейства Thy-1/Ly-6 GPI-заякоренных антигенов клеточной поверхности. PSCA активируется при многих онкологических заболеваниях, включая рак предстательной железы, мочевого пузыря и рак поджелудочной железы.

Антиген PSCA может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию MHC, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген PSCA может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против PSCA. Антиген PSCA может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген PSCA может содержать консенсусный белок.

Консенсусный антиген PSCA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 69, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70. Консенсусный белок PSCA может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок PSCA может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA. Консенсусная последовательность PSCA может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, включая, но не ограничиваясь этим, стартовый кодон и по меньшей мере один стоп-кодон.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PSCA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID №: 69. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген PSCA может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70. Консенсусный антиген PSCA может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку PSCA, иммуногенному фрагменту консенсусного белка PSCA и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98%

гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков PSCA, иммуногенных фрагментов консенсусного белка PSCA и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка PSCA. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности PSCA, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности PSCA. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков PSCA, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 69. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 69. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей,

по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, гомологичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 70. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белка, который на 95% или более гомологичен последовательности, представленной в SEQ ID NO: 70. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 70. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PSCA, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген PSCA, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокис-

лотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена PSCA посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген PSCA, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

(14) MAGE A1.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать меланома-ассоциированный Антиген 1 (MAGE A1), его фрагмент или его вариант. MAGE A1, кодируемый геном MAGEA1, представляет собой белок из 280 аминокислот, и было обнаружено, что он экспрессируется только опухолевыми клетками и зародышевыми клетками. MAGE A1 зависит от метилирования ДНК при его репрессии в нормальных соматических тканях. Эти гены активируются во многих типах опухолей в ходе процесса деметилирования по всему геному, который часто сопровождает онкогенез. В частности, во время неопластической трансформации эти гены активируются, экспрессируются и могут стать антигенными мишенями, которые распознаются и атакуются иммунной системой. Следовательно, гены MAGE принимают участие в иммунном процессе, таргетируя некоторые ранние опухолевые клетки для иммунного уничтожения. MAGE A1 может быть экспрессирован при многочисленных раковых заболеваниях, включая, но не ограничиваясь этим, меланомы, карциномы легких и плоскоклеточные карциномы пищевода.

Антиген MAGE A1 может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

(15) WT1.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген опухоли Вильмса 1 (WT1), его фрагмент, или его вариант. WT1 представляет собой транскрипционный фактор, содержащий на N-конце богатый пролином/глутамином ДНК-связывающий домен и на C-конце четыре мотива цинкового пальца. WT1 играет роль в нормальном развитии мочеполовой системы и взаимодействует с многочисленными факторами, например, p53, известным супрессором опухолей и сериновой протеазой HtrA2, которая расщепляет WT1 в нескольких местах после лечения цитотоксическим препаратом.

Мутация WT1 может привести к опухоли или канцерогенезу, например, опухоли Вильмса или опухолям, экспрессирующим WT1. Опухоль Вильмса часто образуется в одной или обеих почках перед метастазированием в другие ткани, например, но не ограничиваясь этим, ткань печени, ткань мочевыводящих путей, лимфатическую ткань и ткань легких. Соответственно, опухоль Вильмса можно считать метастатической опухолью. Опухоль Вильмса обычно встречается у детей младшего возраста (например, до 5 лет) и в спорадических, и в наследственных формах. Раковой антиген WT1 может быть дополнительно определен в PCT/US13/75141, поданной 23 декабря 2013 года, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Антиген WT-1 может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующе-

го антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TFG- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Соответственно, иммуногенная композиция может быть использована для лечения субъектов, страдающих от опухоли Вильмса. Иммуногенная композиция может быть использована для лечения субъектов, страдающих от любого количества онкологических заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, меланому, рак простаты, рак печени, рак шейки матки, рецидивирующий респираторный папилломатоз (RRP), рак анального канала, рак головы и шеи и онкологические заболевания крови. Иммуногенная композиция также может быть использована для лечения субъектов с раком или опухолями, которые экспрессируют WT1, для предотвращения развития таких опухолей у субъектов. Антиген WT1 может отличаться от нативного "нормального" гена WT1 и, таким образом, обеспечивать терапию или профилактику против опухоли, экспрессирующей антиген WT1. Соответственно, в данном документе представлены последовательности антигена WT1, которые отличаются от нативного гена WT1 (то есть мутированные гены или последовательности WT1).

Транскрипты нативного гена WT1 процессируются во множество мРНК, и полученные белки не все имеют одинаковую ценность для индукции иммунного ответа. Мутантные гены WT1, описанные в данном документе, избегают альтернативного процессинга, производя один полноразмерный транскрипт и приводя к более сильной индукции эффекторных Т- и В-клеточных ответов. Первая мутированная последовательность WT1 называется CON WT1 с модифицированными цинковыми пальцами или ConWT1-L. SEQ ID NO: 19 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген WT1 CON WT1 с модифицированными цинковыми пальцами. SEQ ID NO: 20 представляет собой аминокислотную последовательность антигена WT1 CON WT1 с модифицированными цинковыми пальцами. Вторая мутированная последовательность WT1 называется CON WT1 без цинковых пальцев или ConWT1-S. SEQ ID NO: 21 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген WT1 CON WT1 без цинковых пальцев. SEQ ID NO: 22 представляет собой аминокислотную последовательность антигена WT1 CON WT1 без модифицированных цинковых пальцев.

Антиген WT1 может представлять собой консенсусную последовательность антигена (или иммуногена), полученную от двух или более видов. Антиген WT1 может содержать консенсусную последовательность и/или модификацию(и) для усиления экспрессии. Модификация может включать оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК, добавление последовательности Козака (например, GCC ACC) для усиления инициации трансляции и/или добавление лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности антигена WT1. Антиген WT1 может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, например, но не ограничиваясь этим, сигнальный пептид иммуноглобулина E (IgE) или иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген WT1 может содержать гемагглютининовую метку (HA). Консенсусный антиген WT1 может быть сконструирован так, чтобы вызывать более сильные и более широкие клеточные и/или гуморальные иммунные ответы, чем соответствующий кодон-оптимизированный антиген WT1.

Консенсусный антиген WT1 может содержать одну или более мутаций в одном или более цинковых пальцах, вызывая тем самым более сильный и широкий клеточный и/или гуморальный иммунный ответ, чем соответствующий кодон-оптимизированный антиген WT1. Одна или более мутаций могут представлять собой замену одной или более аминокислот, которые координируют ион цинка в одном или более цинковых пальцах. Одна или более аминокислот, которые координируют ион цинка, могут представлять собой мотив ССНН. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения одна или более мутаций могут заменять 1, 2, 3 или все 4 аминокислоты мотива ССНН.

В других вариантах реализации изобретения одна или более мутаций заключаются в том, что остатки 312, 317, 342 и 347 последовательности SEQ ID NO: 20 представляют собой любой остаток, кроме цистеина (С), а остатки 330, 334, 360 и 364 последовательности SEQ ID NO: 20 представляют собой любой остаток, кроме гистидина (Н). В частности, одна или более мутаций заключаются в том, что остатки 312, 317, 330, 334, 342, 347, 360 и 364 последовательности SEQ ID NO: 20 представляют собой глицин (G).

В других вариантах реализации изобретения один или более цинковых пальцев могут быть удалены из консенсусного антигена WT1. Один, два, три или все четыре цинковых пальца могут быть удалены из консенсусного антигена WT1.

Консенсусный антиген WT1 может представлять собой нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 19, которая кодирует SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген WT1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности относительной всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 19. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген WT1 может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по

если остатки 312, 317, 330, 334, 342, 347, 360 и 364 последовательности SEQ ID NO: 20 присутствуют в иммуногенном фрагменте, тогда эти остатки представляют собой глицин (G).

В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерная последовательность иммуноглобулина E (IgE). В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 20 и 22. Такие фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, имеющих 95% или более идентичности относительно SEQ ID NO: 20 и/или SEQ ID NO: 22. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% или более идентичности иммуногенным фрагментам белковых последовательностей WT1, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% или более идентичности иммуногенным фрагментам белковых последовательностей WT1, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% или более идентичности иммуногенным фрагментам белковых последовательностей WT1, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% или более идентичности иммуногенным фрагментам белковых последовательностей WT1, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты содержат лидерную последовательность, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерная последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты не содержат лидерной последовательности.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21. Иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% SEQ ID NO: 19 и/или SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерная последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты нуклеиновых кислот с нуклеотидными последовательностями, имеющими идентичность иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 21. Такие фрагменты могут содержать по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% нуклеиновых кислот, имеющих 95% или более идентичности относительно SEQ ID NO: 19 и/или SEQ ID NO: 21. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 96% или более идентичности иммуногенным фрагментам последовательностей нуклеиновых кислот WT1, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 97% или более идентичности иммуногенным фрагментам последовательностей нуклеиновых кислот WT1, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% или более идентичности иммуногенным фрагментам последовательностей нуклеиновых кислот WT1, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% или более идентичности иммуногенным фрагментам последовательностей нуклеиновых кислот WT1, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерная последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенные фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность.

(16) FAP.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген фибробласт-активирующий белок (FAP), его фрагмент, или его вариант. Антиген FAP может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный

ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген FAP может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против FAP. Антиген FAP может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген FAP может содержать консенсусный белок.

Консенсусный антиген FAP может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 59, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. Консенсусный белок FAP может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок FAP может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA. Консенсусная последовательность FAP может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, включая, но не ограничиваясь этим, стартовый кодон и по меньшей мере один стоп-кодон.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген FAP может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 59. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген FAP может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60. Консенсусный антиген FAP может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 60.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку FAP, иммуногенному фрагменту консенсусного белка FAP и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков FAP, иммуногенных фрагментов консенсусного белка FAP и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка FAP. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности FAP, до 90% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FAP. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков FAP, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 59. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 59. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка FAP представляет собой SEQ ID NO: 60. Аминокислотная последовательность консенсусного белка FAP, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 60. Аминокислотная последовательность консенсусного белка FAP, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 60. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 60. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 60. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 60. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 60. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 60.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые идентичны SEQ ID NO: 60. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют

фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 98% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным фрагментам, которые имеют 99% гомологии относительно иммуногенных фрагментов консенсусных белковых последовательностей, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 60. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевую метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген FAP, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген FAP, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена FAP посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FAP, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

(17) FSHR.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген рецептор фолликулостимулирующего гормона (FSHR), его фрагмент, или его вариант. Антиген FSHR может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые по-

вышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген FSHR может содержать белковые эпитопы, которые делают их особенно эффективными в качестве иммуногенов, против которых могут индуцироваться иммунные ответы против FSHR. Антиген FSHR может содержать полноразмерный продукт трансляции, его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антиген FSHR может содержать консенсусный белок.

Консенсусный антиген FSHR может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 61, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. Консенсусный белок FSHR может быть соединен с лидерной последовательностью IgE и меткой HA. В других вариантах реализации изобретения консенсусный белок FSHR может быть свободным или не связанным с лидерной последовательностью IgE и/или меткой HA. Консенсусная последовательность FSHR может быть функционально связана с регуляторной последовательностью, включая, но не ограничиваясь этим, стартовый кодон и по меньшей мере один стоп-кодон.

В некоторых вариантах реализации изобретения консенсусный антиген FSHR может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 61. В других вариантах реализации изобретения консенсусный антиген FSHR может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62. Консенсусный антиген FSHR может представлять собой аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90%. Идентичность 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности относительно всей длины аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки, гомологичные консенсусному белку FSHR, иммуногенному фрагменту консенсусного белка FSHR и иммуногенным фрагментам гомологичных белков. Могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 95% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 96% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 97% гомологии относительно консенсусной последовательности, до 98% гомологии относительно консенсусной последовательности и до 99%. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков, гомологичных белкам, представленным в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 95% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 96% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 97% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 98% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют 99% гомологии с кодирующими последовательностями нуклеиновых кислот, представленных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы нуклеиновой кислоты с кодирующими последовательностями, раскрытыми в данном документе, которые гомологичны кодирующей последовательности консенсусного белка, описанного в данном документе, включают последовательности, кодирующие лидерную последовательность IgE, соединенную с 5'-концом кодирующей последовательности, кодирующей гомологичные последовательности белка, описанные в данном документе.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим белки с определенным процентом идентичности относительно полноразмерных консенсусных белков FSHR, иммуногенных фрагментов консенсусного белка FSHR и иммуногенных фрагментов белков, обладающих идентичностью относительно консенсусного белка FSHR. Также могут быть предложены такие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногенные белки, которые имеют до 80% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 85% идентичности относительно полноразмерной последовательности FSHR, до 90% идентичности от-

носителем полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 91% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 92% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 93% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 94% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 95% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 96% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 97% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR, до 98% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR и до 99% идентичности относительно полноразмерной консенсусной последовательности FSHR. Аналогичным образом, также предложены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иммуногенные фрагменты, представленные в данном документе, и иммуногенные фрагменты белков с похожими процентными идентичностями, как указано выше, относительно белков FSHR, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты не содержит кодирующей последовательности, которая кодирует лидерную последовательность IgE.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к фрагментам SEQ ID NO: 61. Фрагменты могут представлять собой по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 61. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%, гомологичны фрагментам SEQ ID NO: 61. Фрагменты могут быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны фрагментам SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат последовательности, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат кодирующих последовательностей, которые кодируют лидерную последовательность, такую как, например, лидерная последовательность IgE.

Кроме того, аминокислотная последовательность консенсусного белка FSHR представляет собой SEQ ID NO: 62. Аминокислотная последовательность консенсусного белка FSHR, связанного с лидерной последовательностью IgE, представляет собой SEQ ID NO: 62. Аминокислотная последовательность консенсусного белка FSHR, связанного с лидерной последовательностью IgE, может быть соединена с меткой НА.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые гомологичны SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 95% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 96% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 97% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 98% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют 99% гомологии относительно консенсусных белковых последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 62.

Некоторые варианты реализации изобретения относятся к белкам, которые идентичны SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 80% идентична полноразмерной консенсусной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 85% идентична полноразмерной консенсусной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62. Некоторые варианты реализации изобретения относятся к иммуногенным белкам, которые имеют аминокислотную последовательность, которая на 90% идентична полноразмерной консенсусной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 62. Некоторые вари-

дерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Могут быть предложены иммуногенные фрагменты белков с аминокислотными последовательностями, идентичными иммуногенным фрагментам SEQ ID NO: 62. Такие иммуногенные фрагменты могут содержать по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, 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%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% белков, которые на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты содержат лидерную последовательность, такую как, например, лидерную последовательность иммуноглобулина, такую как лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагменты не содержат лидерной последовательности, такой как, например, лидерная последовательность IgE.

Как указано в данном документе в отношении присоединения сигнального пептида или лидерной последовательности к N-концу белка, сигнальный пептид/лидерная последовательность заменяет N-концевой метионин белка, который кодируется стартовым кодоном последовательности нуклеиновой кислоты, в отличие от последовательностей, кодирующих белок без сигнальных пептидов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген FSHR, может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов и соответствующих транскриптов РНК. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, может быть кодон-оптимизирована и РНК-оптимизирована для экспрессии. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный антиген FSHR, может содержать последовательность Козака (например, GCC ACC) для повышения эффективности трансляции. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, может содержать несколько стоп-кодонов (например, TGA TGA) для повышения эффективности терминации трансляции.

Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, также может кодировать лидерную последовательность иммуноглобулина E (IgE). Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, может дополнительно кодировать лидерную последовательность IgE, так что аминокислотная последовательность лидерной последовательности IgE связана с аминокислотной последовательностью консенсусного антигена FSHR посредством пептидной связи. Нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE.

В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая консенсусный антиген FSHR, может представлять собой гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и/или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты.

(18) gp100.

Иммуногенная композиция согласно данному изобретению может содержать раковый антиген гликопротеин 100 (gp100; также известный как Trp2 и белок премеланосомы (PMEL)), его фрагмент, или его вариант. gp100 кодируется геном PMEL. Он представляет собой трансмембранный гликопротеин 1-го типа массой 70 кДа, состоящий из 661 аминокислоты, который играет центральную роль в биогенезе меланосом, поскольку он участвует в созревании меланосом от стадии I до II. gp100 управляет образованием бороздок в мультивезикулярных тельцах и принимает непосредственное участие в биогенезе премеланосом. gp100 присутствует в большем количестве в премеланосомах по сравнению со зрелыми меланосомами, но сверхэкспрессируется пролиферирующими меланоцитами новорожденных и во время роста опухоли. Белок gp100 включает множество иммуногенных эпитопов, которые распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами из периферической крови пациентов с меланомой и из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль.

Антиген gp100 может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один

или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

(19) Вирусные антигены.

Раковой антиген может представлять собой вирусный антиген, его фрагмент, или его вариант. Вирусный антиген может представлять собой антиген вируса гепатита В, вируса гепатита С или вируса папилломы человека (HPV). HPV может представлять собой HPV 6, HPV 11, HPV 16 или HPV 18, как описано ниже.

Вирусный антиген может индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ и/или высокие титры антител, тем самым вызывая или индуцируя иммунный ответ, который таргетирует или реагирует на рак или опухоль, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может представлять собой клеточный, гуморальный или как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный клеточный иммунный ответ может включать индукцию или секрецию интерферона-гамма (IFN- γ) и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). В других вариантах реализации изобретения индуцированный или вызванный иммунный ответ может уменьшать или ингибировать один или более факторов иммуносупрессии, которые способствуют росту опухоли или рака, экспрессирующего антиген, например, но не ограничиваясь этим, факторы, которые подавляют презентацию МНС, факторы, которые повышают уровни антигенспецифических регуляторных Т-клеток (Treg), PD-L1, FasL, цитокины, такие как IL-10 и TGF- β , опухоль-ассоциированные макрофаги, опухоль-ассоциированные фибробласты, растворимые факторы, продуцируемые иммуносупрессорными клетками, CTLA-4, PD-1, MDSCs, MCP-1 и молекула иммунной контрольной точки, которые более подробно описана ниже.

Антиген вируса гепатита В.

Вирусный антиген может представлять собой антиген вируса гепатита В (HBV), его фрагмент, или его вариант. Антиген HBV может быть ассоциирован с раком печени или быть его причиной. В некоторых вариантах реализации изобретения антиген HBV может представлять собой гетерологичную молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, такую как плаزمид(ы), которая кодирует один или более антигенов из HBV. Антиген HBV может представлять собой полноразмерные или иммуногенные фрагменты полноразмерных белков.

Антиген HBV может содержать консенсусные последовательности и/или одну или более модификаций для усиления экспрессии. Генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности конструкций, могут быть внесены в модифицированные консенсусные последовательности. Консенсусный антиген HBV может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах реализации изобретения может содержать метку НА. Иммуногены могут быть сконструированы таким образом, чтобы вызывать более сильные и более широкие клеточные иммунные ответы, чем соответствующие кодон-оптимизированные иммуногены.

Антиген HBV может представлять собой коровый белок HBV, поверхностный белок HBV, ДНК-полимеразу HBV, белок HBV, кодируемый геном X, их фрагмент, их вариант или их комбинацию. Антиген HBV может представлять собой коровый белок HBV генотипа А, коровый белок HBV генотипа В, коровый белок HBV генотипа С, коровый белок HBV генотипа D, коровый белок HBV генотипа Е, коровый белок HBV генотипа F, коровый белок HBV генотипа G, коровый белок HBV генотипа H, поверхностный белок HBV генотипа А, поверхностный белок HBV генотипа В, поверхностный белок HBV генотипа С, поверхностный белок HBV генотипа D, поверхностный белок HBV генотипа Е, поверхностный белок HBV генотипа F, поверхностный белок HBV генотипа G, поверхностный белок HBV генотипа H, их фрагмент, их вариант или их комбинацию. Антиген HBV может представлять собой консенсусный коровый белок HBV или консенсусный поверхностный белок HBV.

В некоторых вариантах реализации изобретения антиген HBV может представлять собой конструкцию коровой консенсусной последовательности нуклеиновой кислоты HBV генотипа А, лидерную последовательность IgE, соединенную с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа А, или последовательность консенсусного корового белка HBV генотипа А.

В других вариантах реализации изобретения антиген HBV может представлять собой конструкцию коровой консенсусной последовательности нуклеиновой кислоты HBV генотипа В, лидерную последовательность IgE, соединенную с консенсусной последовательностью корового белка HBV генотипа В, или последовательность консенсусного корового белка HBV генотипа В.

В других вариантах реализации изобретения антиген HBV может представлять собой конструкцию коровой консенсусной последовательности нуклеиновой кислоты HBV генотипа С, лидерную последова-

каций для усиления экспрессии. Генетические модификации, включая оптимизацию кодонов, оптимизацию РНК и добавление высокоэффективной лидерной последовательности иммуноглобулина для повышения иммуногенности конструкций, могут быть внесены в модифицированные консенсусные последовательности. Консенсусный антиген HCV может содержать сигнальный пептид, такой как сигнальный пептид иммуноглобулина, такой как сигнальный пептид IgE или IgG, и в некоторых вариантах реализации изобретения может содержать метку НА. Иммуногены могут быть сконструированы таким образом, чтобы вызывать более сильные и более широкие клеточные иммунные ответы, чем соответствующие кодон-оптимизированные иммуногены.

Антиген HCV может представлять собой белок нуклеокапсида HCV (т.е. коровый белок), белок оболочки HCV (например, E1 и E2), неструктурный белок HCV (например, NS1, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a и NS5b), их фрагмент, их вариант, или их комбинацию.

Вирус папилломы человека.

Вирусный антиген может представлять собой антиген HPV, его фрагмент, или его вариант. Антиген HPV может быть типов HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 и 58, которые вызывают рак шейки матки, рак прямой кишки и/или другие виды рака. Антиген HPV может быть типов HPV 6 и/или 11, которые являются причиной генитальных бородавок и, как известно, являются причинами рака головы и шеи. Антиген HPV может быть типов HPV 16 и/или 18, которые являются причиной рака шейки матки. Антиген HPV может быть типов HPV 6, 11 и/или 16, которые являются причиной RRP и рака анального канала. Раковые антитела HPV могут быть дополнительно определены в патенте США № 8168769, поданном 30 июля 2007 года, патенте США № 8389706, поданном 21 января 2010 г., заявке на патент США № 13/271576, поданной 21 октября 2011 года, и заявке на патент США № 61/777198, поданной 12 марта 2013 года, каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

Антигены HPV могут представлять собой домены HPV E6 или E7 каждого типа HPV. Например, для HPV типа 16 (HPV16) антиген HPV16 может включать антиген E6 HPV16, антиген E7 HPV16, их фрагменты, варианты или комбинации. Аналогично, антиген HPV может представлять собой HPV 6 E6 и/или E7, HPV 11 E6 и/или E7, HPV 16 E6 и/или E7, HPV 18 E6 и/или E7, HPV 31 E6 и/или E7, HPV 33 E6 и/или E7, HPV 52, E6 и/или E7, или HPV 58, E6 и/или E7, их фрагменты, варианты или комбинации.

Вирусы герпеса.

Вирусный антиген может представлять собой антиген вируса герпеса. Антиген вируса герпеса может представлять собой антиген, выбранный из группы, состоящей из CMV, HSV1, HSV2, VZV, СeHV1, EBV, розеоовируса, герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши, и MuHV.

Консенсусный белок HCMV-gB (SEQ ID NO: 26), консенсусный белок HCMV-gM (SEQ ID NO: 28), консенсусный белок HCMV-gN (SEQ ID NO: 30), консенсусный белок HCMV-gH (SEQ ID NO: 32), консенсусный белок HCMV-gL (SEQ ID NO: 34), консенсусный белок HCMV-gO (SEQ ID NO: 36), консенсусный белок HCMV-UL128 (SEQ ID NO: 38), консенсусный белок HCMV-UL130 (SEQ ID NO: 40), консенсусный белок HCMV-UL-131A (SEQ ID NO: 42), консенсусный белок HCMV-UL-83 (pp65) (SEQ ID NO: 44).

Последовательности нуклеиновых кислот включают последовательности, кодирующие SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 44. Были получены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие консенсусные аминокислотные последовательности. Иммуногенные композиции могут содержать одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют одну или более консенсусных версий иммуногенных белков, выбранных из этой группы последовательностей, созданных для оптимизации стабильности и экспрессии у людей.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-gB (SEQ ID NO: 25), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-gM (SEQ ID NO: 27), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-gN (SEQ ID NO: 29), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-gH (SEQ ID NO: 31), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-gL (SEQ ID NO: 33), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-gO (SEQ ID NO: 35), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-UL128 (SEQ ID NO: 37), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-UL130 (SEQ ID NO: 39), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-UL-131A (SEQ ID NO: 41), последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая консенсусный белок HCMV-UL-83 (pp65) (SEQ ID NO: 43). Последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно иметь последовательность, кодирующую лидерную последовательность IgE, связанную с 5'-концом.

Ввиду эволюционной дивергенции от клинических изолятов и обширных генетических различий между распространенными циркулирующими человеческими штаммами были получены консенсусные аминокислотные последовательности для каждого из иммуногенных белков. Консенсусные аминокислотные последовательности для gB, gB, gH, gL, gE, gI, gK, gC, gD, UL128, UL130, UL-131A и UL-83 (pp65) были основаны на последовательностях клинических изолятов человека. Из-за большой эволюци-

онной дивергенции белка gN консенсусная последовательность была сформирована только из одного (gN-4с) из семи серотипов, который представляет собой наиболее распространенный серотип (gN-4). Подобным образом, в случае gO, консенсусные аминокислотные последовательности были сформированы из одного (gO-5) из восьми серотипов вследствие того, что для конкретных серотипов сообщалось о связи с серотипом gN-4с.

Как описано выше, вирусный антиген герпеса может представлять собой консенсусный антиген вируса герпеса. Консенсусный антиген вируса герпеса может быть снабжен сигнальным пептидом. В некоторых вариантах реализации изобретения лидерная последовательность IgE соединена с N-концом. Как описано в данном документе, при упоминании сигнального пептида, соединенного с N-концом консенсусной последовательности, предполагается, что конкретно включены варианты реализации изобретения, в которых N-концевой остаток Хаа консенсусных последовательностей заменен сигнальным пептидом. Таким образом, при использовании в данном документе, Хаа обозначает любую аминокислоту или отсутствие аминокислоты. Белки, которые содержат консенсусную последовательность, представленные в данном документе в SEQ ID NO: 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 могут содержать те последовательности, которые не содержат Хаа на N-конце.

Были получены аминокислотные последовательности, которые в каждом конкретном случае содержали лидерную последовательность IgE на N-конце консенсусных последовательностей иммуногенного белка вируса герпеса. В некоторых вариантах реализации изобретения предложены конструкции нуклеиновых кислот, в которых два или более антигена вируса герпеса экспрессируются в виде слитых белков, соединенных друг с другом с помощью сайтов протеолитического расщепления. Фуриновый сайт протеолитического расщепления является примером сайта протеолитического расщепления, который может соединять антигены вируса герпеса в слитом белке, экспрессируемом с помощью конструкции. Вирусные раковые антигены семейства герпеса может дополнительно представлять собой любой антиген, раскрытый в патентной заявке США № 13/982457, содержание которой включено в полном объеме посредством ссылки.

4. Иммуногенная композиция в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки.

Иммуногенная композиция может дополнительно содержать один или более ингибиторов одной или более молекул иммунной контрольной точки (то есть ингибитора иммунной контрольной точки). Молекулы иммунной контрольной точки описаны ниже более подробно. Ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой любую нуклеиновую кислоту или белок, которые предотвращают подавление любого компонента в иммунной системе, такого как презентация класса МНС, презентация и/или дифференциация Т-клеток, презентация и/или дифференциация В-клеток, любой цитокин, хемокин или передача сигналов для пролиферации и/или дифференциации иммунных клеток.

Такой ингибитор может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, аминокислотную последовательность, малую молекулу или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты также может содержать дополнительные последовательности, которые кодируют последовательности линкера или метки, которые соединены с ингибитором иммунной контрольной точки с помощью пептидной связи. Малая молекула может иметь низкую молекулярную массу, например, менее 800 Дальтон, может представлять собой органическое или неорганическое соединение, которое может служить субстратом фермента, лигандом (или его аналогом), связанным белком или нуклеиновой кислотой, или регулятором биологического процесса. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, их вариант, их фрагмент или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор иммунной контрольной точки может представлять собой одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. В других вариантах реализации изобретения ингибитор иммунной контрольной точки может представлять собой антитело, его вариант, его фрагмент или их комбинацию.

Молекула иммунной контрольной точки.

Молекула иммунной контрольной точки может представлять собой последовательность нуклеиновой кислоты, аминокислотную последовательность, малую молекулу или их комбинацию. Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой ДНК, РНК, кДНК, их вариант, их фрагмент или их комбинацию.

Последовательность нуклеиновой кислоты также может содержать дополнительные последовательности, которые кодируют последовательности линкера или метки, которые соединены с ингибитором иммунной контрольной точки с помощью пептидной связи. Малая молекула может иметь низкую молекулярную массу, например, менее 800 Дальтон, может представлять собой органическое или неорганическое соединение, которое может служить субстратом фермента, лигандом (или его аналогом), связанным белком или нуклеиновой кислотой, или регулятором биологического процесса. Аминокислотная последовательность может представлять собой белок, пептид, их вариант, их фрагмент или их комбинацию. Молекула иммунной контрольной точки может представлять собой ингибитор по меньшей мере одного белка иммунной контрольной точки. Белки иммунной контрольной точки включают, но не ограничива-

ются этим, PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3 и LAG3.

Антитело против молекулы иммунной контрольной точки.

Как описано выше, ингибитор иммунной контрольной точки может представлять собой антитело. Антитело может связываться или реагировать с антигеном (т.е. молекулой иммунной контрольной точки, описанной выше). Соответственно, антитело может считаться антителом против молекулы иммунной контрольной точки или антителом к молекуле иммунной контрольной точки. Антитело может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты.

Антитело может содержать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи может содержать переменную область тяжелой цепи (VH) и/или, по меньшей мере, одну константную область тяжелой цепи (CH). По меньшей мере, одна константная область тяжелой цепи может содержать константную область 1 тяжелой цепи (CH1), константную область 2 тяжелой цепи (CH2) и константную область 3 тяжелой цепи (CH3) и/или шарнирную область.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид тяжелой цепи может содержать область VH и область CH1. В других вариантах реализации изобретения полипептид тяжелой цепи может содержать область VH, область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3.

Полипептид тяжелой цепи может содержать набор областей, определяющих комплементарность ("CDR"). Набор CDR может содержать три гипервариабельные области участка VH. Начиная от N-конца полипептида тяжелой цепи, эти CDR обозначены как "CDR1", "CDR2" и "CDR3", соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида тяжелой цепи могут способствовать связыванию или распознаванию антигена.

Полипептид легкой цепи может содержать переменную область легкой цепи (VL) и/или константную область легкой цепи (CL). Полипептид легкой цепи может содержать набор областей, определяющих комплементарность ("CDR"). Набор CDR может содержать три гипервариабельные области участка VL. Начиная от N-конца полипептида легкой цепи, эти CDR обозначены как "CDR1", "CDR2" и "CDR3", соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 полипептида легкой цепи могут способствовать связыванию или распознаванию антигена.

Антитело может содержать набор областей, определяющих комплементарность ("CDR") легкой цепи и тяжелой цепи, и, соответственно, располагаться между каркасным ("FR") набором тяжелой цепи и легкой цепи, который обеспечивает поддержку CDR и определяют пространственное отношение CDR относительно друг друга. Набор CDR может содержать три гипервариабельных участка V-области тяжелой или легкой цепи. Начиная от N-конца тяжелой или легкой цепи, эти области обозначены как "CDR1", "CDR2" и "CDR3", соответственно. Следовательно, антигенсвязывающий сайт может содержать шесть CDR, содержащих набор CDR из каждой V-области тяжелой и легкой цепи.

Антитело может представлять собой иммуноглобулин (Ig). Ig может представлять собой, например, IgA, IgM, IgD, IgE и IgG. Иммуноглобулин может содержать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина может содержать область VH, область CH1, шарнирную область, область CH2 и область CH3. Полипептид легкой цепи иммуноглобулина может содержать область VL и область CL.

Кроме того, протеолитический фермент папаин предпочтительно расщепляет молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, два из которых (фрагменты F(ab)) каждый содержат ковалентный гетеродимер, который содержит интактный антигенсвязывающий сайт. Фермент пепсин способен расщеплять молекулы IgG с образованием нескольких фрагментов, включая фрагмент F(ab')₂, которые содержат оба антигенсвязывающих сайта. Соответственно, антитело может представлять собой Fab или F(ab')₂. Fab может содержать полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи. Полипептид тяжелой цепи Fab может содержать область VH и область CH1. Легкая цепь Fab может содержать область VL и область CL.

Антитело может представлять собой поликлональное или моноклональное антитело. Антитело может представлять собой химерное антитело, одноцепочечное антитело, аффинно-зрелое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Гуманизированное антитело может представлять собой антитело вида, не относящегося к человеку, которое связывается с желаемым антигеном, имеющее одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR) от вида, не относящегося к человеку, и каркасные области молекулы иммуноглобулина человека.

(1) Антитело против PD-1.

Антитело против молекулы иммунной контрольной точки может представлять собой антитело против PD-1 (также называемое в данном документе "антитело против PD-1"), его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антитело PD-1 может представлять собой ниволумаб. Антитело против PD-1 может ингибировать активность PD-1, таким образом вызывая, индуцируя или усиливая иммунный ответ против опухоли или рака и снижая рост опухоли.

(2) Антитело против PD-L1.

Антитело против молекулы иммунной контрольной точки может представлять собой антитело против PD-L1 (также называемое в данном документе "антитело против PD-L1"), его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антитело против PD-L1 может ингибировать активность PD-L1, таким образом вызывая, индуцируя или усиливая иммунный ответ против опухоли или рака и снижая рост опухоли.

(3) Антитело против CTLA4.

Антитело против молекулы иммунной контрольной точки может представлять собой антитело против CTLA4 (также называемое в данном документе "антитело против CTLA4"), его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антитело против CTLA4 может ингибировать активность CTLA4, таким образом вызывая, индуцируя или усиливая иммунный ответ против опухоли или рака и снижая рост опухоли.

(4) Антитело против TIM3.

Антитело против молекулы иммунной контрольной точки может представлять собой антитело против TIM3 (также называемое в данном документе "антитело против TIM3"), его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антитело против TIM3 может ингибировать активность TIM3, таким образом вызывая, индуцируя или усиливая иммунный ответ против опухоли или рака и снижая рост опухоли.

(5) Антитело против LAG3.

Антитело против молекулы иммунной контрольной точки может представлять собой антитело против LAG3 (также называемое в данном документе "антитело против LAG3"), его вариант, его фрагмент или их комбинацию. Антитело против LAG3 может ингибировать активность LAG3, таким образом вызывая, индуцируя или усиливая иммунный ответ против опухоли или рака и снижая рост опухоли.

5. Конструкции и плазмиды.

Иммуногенная композиция может содержать конструкции нуклеиновых кислот или плазмиды, которые кодируют вышеописанные антигены и/или антитела. Конструкции нуклеиновых кислот или плазмиды могут иметь или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот. В данном документе представлены генетические конструкции, которые могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует вышеописанные антигены и/или антитела. Генетическая конструкция может присутствовать в клетке в качестве функционирующей внехромосомной молекулы. Генетическая конструкция может представлять собой линейную минихромосому, содержащую центромеры, теломеры или плазмиды или космиды. Генетические конструкции могут иметь или содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот.

Генетическая конструкция может быть полезна для трансфекции клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей вышеописанные антигены и/или антитела, которую трансформированная клетка-хозяин культивирует и сохраняет в условиях, в которых происходит экспрессия вышеописанных антигенов и/или антител.

Кодирующие последовательности могут быть оптимизированы для стабильности и высокого уровня экспрессии. В некоторых случаях кодоны выбираются таким образом, чтобы уменьшить образование вторичной структуры РНК, образующейся, например, из-за внутримолекулярного связывания.

Генетические конструкции могут быть в форме плазмид, экспрессирующих описанные выше антигены и/или антитела в любом порядке.

Векторы экспрессии.

Вектор может представлять собой кольцевую плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. Кольцевая плазида и линейная нуклеиновая кислота способны управлять экспрессией конкретной нуклеотидной последовательности в соответствующей клетке субъекта. Вектор может иметь промотор, функционально связанный с кодирующей антиген нуклеотидной последовательностью, которая может быть функционально связана с сигналами терминации. Вектор также может содержать последовательности, необходимые для правильной трансляции нуклеотидной последовательности. Вектор, содержащий интересующую нуклеотидную последовательность, может быть химерным, что означает, что, по меньшей мере, один из его компонентов является гетерологичным по отношению, по меньшей мере, к одному из его других компонентов. Экспрессия нуклеотидной последовательности в кассете экспрессии может контролироваться конститутивным промотором или индуцибельным промотором, который инициирует транскрипцию только тогда, когда клетка-хозяин подвергается воздействию какого-либо конкретного внешнего стимула. В случае многоклеточного организма промотор также может быть специфичным для конкретной ткани или органа или стадии развития.

РНК Векторы.

В одном варианте реализации изобретения нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК. Соответственно, в одном варианте реализации изобретение относится к молекуле РНК, кодирующей один или более антигенов МАУУ. РНК может представлять собой плюс-цепь. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения молекула РНК может транслироваться клетками без необходимости каких-либо промежуточных стадий репликации, таких как обратная транскрипция. Молекула РНК, используемая в изобретении, может иметь 5'-кэп (например, 7-метилгуанозин). Данный кэп может усиливать трансляцию РНК *in vivo*. 5'-нуклеотид молекулы РНК, используемой в изобретении, может иметь 5'-трифосфатную группу. В кэпированной РНК она может быть связана с 7-метилгуанозином через 5'-5'-мостик. Молекула РНК может иметь 3' полиА-хвост. Он также может содержать последовательность распознавания поли-А-полимеразы (например, AAUAAA) вблизи его 3'-конца. Молекула РНК, используемая в изобретении, может быть одноцепочечной. В некоторых вариантах реализации изобретения молекула РНК представляет собой молекулу голый РНК. В одном варианте реализации изобретения молекула РНК содержится в векторе.

В одном варианте реализации изобретения РНК имеет 5' и 3' НТО. В одном варианте реализации изобретения 5'-НТО имеет длину от нуля до 3000 нуклеотидов. Длина 5'- и 3'-последовательностей НТО, которые должны быть добавлены в кодирующую область, может быть изменена различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, подбор праймеров для ПЦР, которые отжигаются на различных областях НТО. Используя этот подход, специалист в данной области техники может модифицировать длины 5' и 3' НТО, при необходимости достижения оптимальной эффективности трансляции после транскрипции транскрибированной РНК.

5' и 3' НТО могут представлять собой встречающиеся в природе эндогенные 5' и 3' НТО для представляющего интерес гена. Альтернативно, последовательности НТО, которые не являются эндогенными для интересующего гена, могут быть добавлены путем включения последовательностей НТО в прямой и обратный праймеры или с помощью любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей НТО, которые не являются эндогенными для интересующего гена, может быть полезным для изменения стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что АУ-богатые элементы в 3'-последовательностях НТО могут снижать стабильность РНК. Следовательно, 3'-НТО могут быть выбраны или разработаны для увеличения стабильности транскрибированной РНК на основе свойств НТО, которые хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте реализации изобретения 5'-НТО может содержать последовательность Козака эндогенного гена.

Альтернативно, когда 5'-НТО, которая не является эндогенной для интересующего гена, вносится с помощью ПЦР, как описано выше, консенсусная последовательность Козака может быть изменена путем добавления 5'-последовательности НТО. Последовательности Козака могут повысить эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но, по-видимому, не требуется, чтобы все РНК обеспечивали эффективную трансляцию. Требование к последовательностям Козака для многих РНК известно в данной области техники. В других вариантах реализации изобретения 5'-НТО может быть получен из РНК-вируса, чей РНК-геном стабилен в клетках. В других вариантах реализации изобретения различные нуклеотидные аналоги могут быть использованы в 3' или 5' НТО, чтобы препятствовать экзонуклеазной деградации РНК.

В одном варианте реализации изобретения РНК имеет как кэп на 5' конце, так и 3' поли (А) хвост, которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность РНК в клетке.

В одном варианте реализации изобретения РНК представляет собой нуклеозид-модифицированную РНК. Нуклеозид-модифицированная РНК обладает особыми преимуществами по сравнению с немодифицированной РНК, включая, например, повышенную стабильность, низкую или отсутствующую врожденную иммуногенность и усиленную трансляцию.

Кольцевые и линейные векторы.

Вектор может представлять собой кольцевую плазмиду, которая может трансформировать клетку-мишень путем интеграции в клеточный геном или существовать внехромосомно (например, автономно реплицирующаяся плазида с сайтом начала репликации).

Вектором может представлять собой рVAX, рсDNA3.0 или рprovaх или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК, кодирующую антиген и позволяющую клетке транслировать последовательность в антиген, который распознается иммунной системой.

Также в данном документе предложена иммуногенная композиция с линейной нуклеиновой кислотой или кассета с линейной экспрессией ("ЛЕС"), которая способна эффективно доставляться субъекту посредством электропорации и экспрессировать один или более желаемых антигенов. ЛЕС может представлять собой любую линейную ДНК, лишенную какого-либо фосфатного остова. ДНК может кодировать один или более антигенов. ЛЕС может содержать промотор, интрон, стоп-кодон и/или сигнал полиаденилирования. Экспрессия антигена может контролироваться с помощью промотора. ЛЕС может не содержать генов устойчивости к антибиотикам и/или фосфатного остова. ЛЕС может не содержать других нуклеотидных последовательностей, не связанных с экспрессией желаемого гена антигена.

ЛЕС может быть получена из любой плазмиды, способной к линейаризации. Плазида может быть способна экспрессировать антиген. Плазида может представлять собой рNP (Puerto Rico/34) или рM2 (New Caledonia/99). Плазида может представлять собой WLV009, рVAX, рсDNA3.0 или рprovaх или любой другой вектор экспрессии, способный экспрессировать ДНК, кодирующую антиген и позволяющую клетке транслировать последовательность в антиген, который распознается иммунной системой.

ЛЕС может представлять собой рсM2. ЛЕС может представлять собой рсrNP. рсrNP и рсrMR могут быть получены из рNP (Puerto Rico/34) и рM2 (New Caledonia/99), соответственно.

Промотор, интрон, стоп-кодон и сигнал полиаденилирования.

Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеописанные антигены и/или антитела, и может дополнительно содержать иницирующий кодон, который может быть расположен до одной или более кодирующих последовательностей антигена, и стоп-кодон, который может быть расположен после кодирующей последовательности (последовательностей) вышеописанных антигенов и/или антител.

Вектор может иметь промотор. Промотор может представлять собой любой промотор, который

способен управлять экспрессией гена и регулировать экспрессию выделенной нуклеиновой кислоты. Такой промотор представляет собой цис-действующий элемент последовательности, необходимый для транскрипции посредством ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая транскрибирует последовательность антигена, описанную в данном документе. Выбор промотора, используемого для прямой экспрессии гетерологичной нуклеиновой кислоты, зависит от конкретного применения. Промотор может быть расположен примерно на том же расстоянии от начала транскрипции в векторе, что и от начального сайта транскрипции в его естественном положении. Тем не менее, изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери функции промотора.

Кодон инициации и терминации может находиться в рамке с кодирующей последовательностью (последовательностями) вышеописанных антигенов и/или антител. Вектор также может содержать промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью (последовательностями) вышеописанных антигенов и/или антител. Промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью (последовательностями) описанных выше антигенов и/или антител, может представлять собой промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (HIV), такой как промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса лейкоза птиц (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как предранний промотор CMV, промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор может также представлять собой промотор из гена человека, такого как актин человека, миозин человека, гемоглобин человека, мышечный креатин человека или металлотioneин человека. Промотор также может представлять собой тканеспецифичный промотор, такой как специфический для мышц или кожи промотор, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикации заявки на патент США № US 20040175727, содержание которой полностью включено в данный документ.

Вектор также может содержать сигнал полиаденилирования, который может располагаться после кодирующей последовательности (последовательностей) описанных выше антигенов и/или антител. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH) или сигнал полиаденилирования β -глобина человека. Сигнал полиаденилирования SV40 может представлять собой сигнал полиаденилирования вектора pCER4 (Invitrogen, San Diego, CA).

Вектор также может содержать энхансер перед вышеописанными антигенами и/или антителами. Энхансер может быть необходим для экспрессии. Энхансер может представлять собой энхансер актина человека, миозина человека, гемоглобина человека, мышечного креатина человека или вирусный энхансер, такой как энхансер CMV, HA, RSV или EBV. Полинуклеотидные энхансеры функции описаны в патентах США № 5593972, 5962428 и WO 94/016737, содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки.

Вектор может содержать энхансер и интрон с функциональными донорными и акцепторными сайтами сплайсинга. Вектор может содержать область терминации транскрипции после структурного гена для обеспечения эффективной терминации. Область терминации может быть получена из того же гена, что и последовательность промотора, или может быть получена из других генов.

Множественные векторы.

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

Иммуногенные композиции могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность для одного антигена. В одном варианте реализации изобретения антиген представляет собой FAP. Иммуногенные композиции могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность множества антигенов. В качестве примера, в одном варианте реализации изобретения антигены представляют собой множественные антигены, выбранные из TERT и дополнительного ракового антигена. В одном типовом варианте реализации изобретения антигены представляют собой WT-1 и TERT. В другом типовом варианте реализации изобретения антигены представляют собой PSMA и TERT. В третьем типовом варианте реализации изобретения антигены представляют собой TERT, WT-1 и PSMA. Иммуногенные композиции могут содержать молекулы нуклеиновой кислоты, такие как плазмиды, которые в совокупности содержат кодирующую последовательность одного или более антигенов и одного или более раковых антигенов.

Точка начала репликации.

Вектор также может содержать точку начала репликации млекопитающего для поддержания внехромосомного вектора и создания множества копий вектора в клетке. Вектор может представлять собой

pVAX1, pCER4 или pREP4 от Invitrogen (San Diego, CA), который может содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барра и кодирующую область ядерного антигена EBNA-1, который может обеспечивать эписомальную репликацию высокой копийности без интеграции. Вектор может представлять собой pVAX1 или вариант pVax1 с изменениями, такими как вариант плазмиды, описанный в данном документе. Вариант плазмиды pVax1 представляет собой вариант из 2998 пар оснований каркаса плазмидного вектора pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad CA). Промотор CMV расположен в позициях оснований 137-724.

Промотор/праймающий сайт T7 расположен в позициях оснований 664-683. Множественные сайты встраивания расположены в позициях оснований 696-811. Сигнал полиаденилирования крупного рогатого скота расположен в позициях оснований 829-1053. Ген устойчивости к канамицину расположен в позициях оснований 1226-2020. Точка начала транскрипции pUC расположена в позициях оснований 2320-2993.

Основываясь на последовательности pVAX1, доступной в Invitrogen, были обнаружены следующие мутации в последовательности pVAX1, которая использовалась в качестве основы для плазмид 1-6, представленных в данном документе:

C>G241 в промоторе CMV.

C>T 1942 каркас после сигнала полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота (bGHpolyA).

A> - 2876 каркас после гена стойкости к канамицину.

C>T 3277 высокая копийность мутаций (смотри Nucleic Acid Research 1985) в точке начала репликации pUC (Ori).

G>C 3753 в самом конце pUC Ori предшествующему сайту RNaseH.

Пары оснований 2, 3 и 4 изменяются с АСТ на СТГ в каркасе, предшествующему промотору CMV.

Каркас вектора может представлять собой pAV0242. Вектор может представлять собой вектор аденовируса типа 5 (Ad5) с дефектной репликацией.

Вектор также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии генов в клетке млекопитающего или человека, в которую вводится вектор. Одна или более последовательностей ракового антигена, раскрытых в данном документе, могут содержать кодон, который может обеспечить более эффективную транскрипцию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

Вектор может представлять собой pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), который можно использовать для продуцирования белка в *Escherichia coli* (*E.coli*). Вектор может также представлять собой pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), который можно использовать для продуцирования белка в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Вектор может также представлять собой полную систему экспрессии бакуловируса MAXVAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая может быть использована для продуцирования белка в клетках насекомых. Вектор может также представлять собой pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), который может быть использован для продуцирования белка в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO). Вектор может представлять собой экспрессирующие векторы или системы продуцирования белка с помощью обычных способов и легкодоступных исходных материалов, включая Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989), которая полностью включена посредством ссылки.

6. Фармацевтические композиции.

Иммуногенная композиция может быть в форме фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать иммуногенную композицию. Фармацевтические композиции могут содержать от около 5 нг до около 10 мг молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген согласно изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции согласно данному изобретению содержат от около 25 нг до около 5 мг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 50 нг до около 1 мг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 0,1 до около 500 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 1 до около 350 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 5 до около 250 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 10 до около 200 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 15 до около 150 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 20 до около 100 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 25 до около 75 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 30 до около 50 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 35 до около 40 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 100 до около 200 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых

вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 10 мкг до около 100 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 20 мкг до около 80 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 25 мкг до около 60 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 30 нг до около 50 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 35 нг до около 45 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 0,1 до около 500 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 1 до около 350 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 25 до около 250 мкг нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат от около 100 до около 200 мкг нуклеиновой кислоты.

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

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

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать другие агенты для целей приготовления в соответствии с используемым способом введения. В тех случаях, когда фармацевтические композиции представляют собой фармацевтические композиции для инъекций, они являются стерильными, апирогенными и не содержат твердых частиц. В одном варианте реализации изобретения используется изотоническая композиция. Как правило, добавки для изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. В некоторых случаях используются изотонические растворы, такие как фосфатно-буферный солевой раствор. Стабилизаторы включают желатин и альбумин. В некоторых вариантах реализации изобретения к приготовлению добавляют вазоконстриктор.

Иммуногенная композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтически приемлемый эксципиент может представлять собой функциональные молекулы в качестве наполнителей, адъювантов, носителей или разбавителей. Фармацевтически приемлемый эксципиент может представлять собой агент, облегчающий трансфекцию, который может включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и сквален, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию.

Агент, облегчающий трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS) или липид.

Агент, облегчающий трансфекцию, представляет собой поли-L-глутамат. В одном варианте реализации изобретения поли-L-глутамат присутствует в иммуногенной композиции в концентрации менее 6 мг/мл. Также в сочетании с генетической конструкцией может быть использован агент, облегчающий

трансфекцию, который может также включать поверхностно-активные агенты, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, включая монофосфориллипид А, мурамилпептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, и гиалуроновую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенная композиция может также содержать агент, облегчающий трансфекцию, такой как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосомы (см., например, WO 9324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию. В одном варианте реализации изобретения агент, облегчающий трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, включая поли-L-глутамат (LGS), или липид. Концентрация агента трансфекции в иммуногенной композиции составляет менее 4 мг/мл, менее 2 мг/мл, менее 1 мг/мл, менее 0,750 мг/мл, менее 0,500 мг/мл, менее 0,250 мг/мл, менее 0,100 мг/мл, менее 0,050 мг/мл или менее 0,010 мг/мл.

Фармацевтически приемлемый эксципиент может представлять собой адъювант. Адъювант может представлять собой другие гены, которые экспрессируются в альтернативной плазмиде или доставляются в виде белков в комбинации с указанной выше плазмидой в иммуногенной композиции. Адъювант может быть выбран из группы, состоящей из: интерферона α (IFN- α), интерферона β (IFN- β), интерферона γ , тромбоцитарного фактора роста (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермального фактора роста (EGF), хемокина, привлекающего Т-лимфоциты кожи (CTACK), эпителиального хемокина экспрессируемого в тимусе (TECK), ассоциированного со слизистыми оболочками эпителиального хемокина (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, в том числе IL-15 с удаленной сигнальной последовательностью и, необязательно, с сигнальным пептидом IgE.

Адъювант может представлять собой IL-12, IL-15, IL-28, CTACK, TECK, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 или их комбинацию. В типовом варианте реализации изобретения адъювант представляет собой IL-12.

Другие гены, которые могут быть полезными адъювантами, включают те, которые кодируют: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, L-селектин, P-селектин, E-селектин, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, мутантные формы IL-18, CD40, CD40L, фактор роста сосудов, фактор роста фибробластов, IL-7, фактор роста нервов, фактор роста эндотелия сосудов, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазу ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, неактивную NIK, SAP K, SAP-1, JNK, чувствительные к интерферону гены, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK ЛИГАНД, Oх40, Oх40 ЛИГАНД, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональные фрагменты.

7. Комбинационные иммуногенные композиции для лечения отдельных видов рака.

Иммуногенная композиция может быть в форме различных комбинаций антигена TERT с одним или более раковыми антигенами, как описано выше, для лечения конкретного онкологического заболевания или опухолей. В зависимости от комбинации одного или более раковых антигенов иммуногенная композиция может быть нацелена на различные виды рака или другие типы опухоли. Эти раковые заболевания могут включать меланому, рак крови (например, лейкоз, лимфому, миелому), рак легкого, плоскоклеточный рак пищевода, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, гепатокарциному, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак анального канала, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, синовиальный рак, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак шейки матки, рецидивирующий респираторный папилломатоз, рак кожи и рак желудка.

Меланома.

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антигенов, таких как тирозиназа, PRAME или GP100-Trp2, для лечения или предотвращения меланомы. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать один или более раковых антигенов тирозиназы, PRAME или GP100-Trp2 с любым одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики меланомы. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики меланомы.

Рак головы и шеи.

Иммуногенная композиция может содержать комбинацию антигена TERT и одного или более раковых антигенов HPV 16 E6/E7 для лечения или профилактики рака головы и шеи. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать раковый антиген HPV 16 E6/E7 с любым одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики рака головы и шеи. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рака головы и шеи.

Рецидивирующий респираторный папилломатоз/рак анального канала.

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антиге-

нов с одним или более раковыми антигенами, такими как HPV 6, HPV11 или HPV 16, для лечения или предотвращения рецидивирующего респираторного папилломатоза или рака анального канала. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать один или более раковых антигенов HPV 6, HPV11 или HPV16 с одним или более раковыми антигенами, NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики рецидивирующего респираторного папилломатоза или рака анального канала. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рецидивирующего респираторного папилломатоза или рака анального канала.

Рак шейки матки.

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антигенов с одним или более раковыми антигенами, такими как HPV 16 E6/E7 или HPV 18 E6/E7, для лечения или профилактики рака шейки матки. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать один или более раковых антигенов, таких как HPV 16 E6/E7 или HPV 18 E6/E7, с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики рака шейки матки. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рака шейки матки.

Рак печени.

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антигенов, таких как коровый антиген HBV, поверхностный антиген HBV, HCVNS34A, HCVNS5A, HCV NS5B или HCVNS4B, для лечения или предотвращения рака печени. Иммуногенная композиция может дополнительно объединять один или более раковых антигенов, таких как коровый антиген HBV, поверхностный антиген HBV, HCVNS34A, HCVNS5A, HCV NS5B или HCVNS4B с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики рака печени. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рака печени.

Глиобластома.

Иммуногенная композиция может содержать антиген TERT и один или более раковых антигенов CMV для лечения или профилактики глиобластомы. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать ЦМВ с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики глиобластомы. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики глиобластомы.

Рак предстательной железы.

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антигенов, таких как PSA, PSMA или STEAP, для лечения или профилактики рака предстательной железы. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать один или более раковых антигенов PSA, PSMA или STEAP с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1, MAGE-A1 или WT1 для лечения или профилактики рака предстательной железы. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рака предстательной железы.

Рак крови (например, лейкоз, лимфома, миелома).

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антигенов, таких как PRAME и WT-1, для лечения или профилактики рака крови, такого как лейкоз, лимфома и миелома. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать один или более раковых антигенов PRAME и WT-1 с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1 или MAGE-A1 для лечения или профилактики рака крови, такого как лейкоз, лимфома и миелома. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рака крови, такого как лейкоз, лимфома и рак миеломы.

Рак яичников.

Иммуногенная композиция может комбинировать раковый антиген TERT и один или более раковых антигенов, таких как антиген рецептора фолликулостимулирующего гормона (FSHR), для лечения или профилактики рака яичников. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать FSHR с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1 или MAGE-A1 для лечения или профилактики рака яичников. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики рака яичников.

Другие онкологические заболевания.

Иммуногенная композиция может комбинировать антиген TERT и один или более раковых антигенов, таких как FAP, для лечения или профилактики онкологических заболеваний. Иммуногенная композиция может дополнительно комбинировать FAP с одним или более раковыми антигенами NY-ESO-1 или MAGE-A1 для лечения или профилактики онкологических заболеваний. Другие комбинации раковых антигенов могут также применяться для лечения или профилактики онкологических заболеваний.

8. Способ вакцинации.

В данном документе предложен способ лечения или предотвращения рака с использованием фармацевтических приготовлений для обеспечения генетических конструкций и белков одного или более раковых антигенов, как описано выше, которые содержат эпитопы, которые делают их особенно эффективными иммуногенами, против которых может быть вызван иммунный ответ на один или более рако-

вых антигенов. Способ введения иммуногенной композиции или вакцинации может быть предоставлен для индукции терапевтического и/или профилактического иммунного ответа. Процесс вакцинации может вызывать у млекопитающего иммунный ответ на один или более раковых антигенов, описанных в данном документе. Иммуногенную композицию можно вводить индивидууму для модуляции активности иммунной системы млекопитающего и усиления иммунного ответа. Введение иммуногенной композиции может представлять собой трансфекцию одного или более раковых антигенов, раскрытых в данном документе, в виде молекулы нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется в клетке и, таким образом, доставляется на поверхность клетки, на которой иммунная система распознает и индуцирует клеточный, гуморальный или клеточный и гуморальный ответ. Введение иммуногенной композиции может быть использовано для того, чтобы индуцировать или вызвать иммунный ответ у млекопитающих на один или более раковых антигенов, описанных в данном документе, посредством введения млекопитающим иммуногенной композиции, описанной в данном документе.

После введения иммуногенной композиции млекопитающему и, в дальнейшем, вектора в клетки млекопитающего, трансфицированные клетки будут экспрессировать и секретировать один или более раковых антигенов, раскрытых в данном документе. Эти секретлируемые белки или синтетические антигены будут распознаваться иммунной системой как чужеродные, что приведет к возникновению иммунного ответа, который может включать: антитела, продуцируемые против одного или более раковых антигенов, и Т-клеточный ответ, конкретно против одного или более раковых антигенов. В некоторых примерах млекопитающее, которому вводят обсуждаемую в данном документе иммуногенную композицию, будет иметь примированную иммунную систему, и при воздействии одного или более раковых антигенов, раскрытых в данном документе, примированная иммунная система обеспечит возможность быстрой очистки дополнительных раковых антигенов, описанных в данном документе, либо посредством гуморального, клеточного, либо как клеточного, так и гуморального иммунных ответов. Иммуногенную композицию можно вводить индивидууму для модуляции активности иммунной системы индивидуума, тем самым усиливая иммунный ответ.

Способы введения иммуногенной композиции описаны в патентах США № 4945050 и 5036006, оба из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Вакцина может быть введена млекопитающему, чтобы вызвать иммунный ответ у млекопитающего. Млекопитающее может представлять собой человека, примата, отличного от человека, корову, свинью, овцу, козу, антилопу, бизона, буйвола, полорогих, оленей, ежей, слонов, ламу, альпаку, мышей, крыс или кур.

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

Способ генерации иммунного ответа с помощью иммуногенной композиции.

Иммуногенная композиция может быть использована для генерации иммунного ответа у млекопитающего, включая терапевтический или профилактический иммунный ответ. Иммунный ответ может генерировать антитела и/или Т-клетки-киллеры, которые нацелены на один или более раковых антигенов, раскрытых в данном документе. Такие антитела и Т-клетки могут быть выделены.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы генерации иммунных ответов против одного или более раковых антигенов, раскрытых в данном документе, которые включают введение индивидууму иммуногенной композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы профилактической вакцинации индивидуума против рака или опухоли, экспрессирующих один или более раковых антигенов, как описано выше, которые включают введение иммуногенной композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы терапевтической вакцинации индивидуума, который страдает от рака или опухоли, экспрессирующей один или более раковых антигенов, которые включают введение иммуногенной композиции. Диагностика рака или опухоли, экспрессирующей один или более раковых антигенов, раскрытых в данном документе, может проводиться регулярно до введения иммуногенной композиции.

Способ лечения рака с помощью иммуногенной композиции.

Иммуногенная композиция может быть использована для генерации или индукции иммунного ответа млекопитающего, который реагирует или нацелен на рак или опухоль (например, меланому, рак головы и шеи, рак шейки матки, печени, простаты, онкологические заболевания крови, плоскоклеточный рак пищевода, рак желудка) у млекопитающего или субъекта, нуждающийся в этом. Вызванный иммунный ответ может предотвратить рак или рост опухоли.

Вызванный иммунный ответ может предотвращать и/или уменьшать метастазирование раковых или опухолевых клеток. Соответственно, иммуногенная композиция может быть использована в способе, который лечит и/или предотвращает рак или опухоли у млекопитающего или субъекта, которому вводят иммуногенную композицию. В зависимости от антигена, используемого в иммуногенной композиции, подлежащее лечению онкологическое заболевание или опухолевый рост может представлять собой лю-

бой тип рака, такой как, но не ограничиваясь этим, меланома, рак крови (например, лейкоз, лимфома, миелома), рак легкого, плоскоклеточный рак пищевода, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, гепатокарциному, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак анального канала, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, синовиальный рак, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак шейки матки, рецидивирующий респираторный папилломатоз, рак кожи и рак желудка.

В некоторых вариантах реализации изобретения введенная иммуногенная композиция может опосредовать клиренс или предотвращать рост опухолевых клеток путем индуцирования (1) гуморального иммунитета посредством В-клеточных ответов для генерации антител, которые блокируют выработку моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), тем самым замедляя развитие супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя рост опухоли; (2) увеличения уровней цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8⁺ (CTL), чтобы атаковать и убивать опухолевые клетки; (3) усиления ответов Т-хелперов; (4) и усиления воспалительных реакций с помощью IFN- γ и TFN- α или комбинации вышеуказанного.

В некоторых вариантах реализации изобретения иммунный ответ может генерировать гуморальный иммунный ответ и/или антигенспецифический цитотоксический ответ Т-лимфоцитов (CTL), который не вызывает повреждения или воспаления различных тканей или систем (например, мозга или неврологической системы и т.д.) у субъекта, которому ввели иммуногенную композицию.

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

Вводимая иммуногенная композиция может увеличить выживаемость с опухолью на 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 и 70% у субъекта после иммунизации. В некоторых вариантах реализации изобретения иммуногенную композицию можно вводить на периферию (как описано более подробно ниже) для формирования антиген-специфического иммунного ответа, нацеленного на раковые или опухолевые клетки или ткань, чтобы элиминировать или устранить рак или опухоль, экспрессирующую один или более раковых антигенов, не повреждая и не вызывая заболевание или смерть у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию.

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

Вводимая иммуногенная композиция может увеличивать уровни интерферона гамма (IFN- γ) у субъекта в около в около 50-6000 раз, в около 50-5500 раз, в около от 50 до 5000 раз, в около от 50 до 4500 раз, в около от 100 до 6000 раз, в около от 150 до 6000 раз, в около от 200 до 6000 раз, в около от 250 до 6000 раз или в около от 300 до 6000 раз. В некоторых вариантах реализации изобретения вводимая иммуногенная композиция может увеличивать уровни интерферона гамма (IFN- γ) у субъекта в около 50 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 550 раз, в 600 раз, в 650 раз, в 700 раз, в 750 раз, в 800 раз, в 850 раз, в 900 раз, в 950 раз, в 1000 раз, в 1100 раз, в 1200 раз, в 1300 раз, в 1400 раз, в 1500 раз, в 1600 раз, в 1700 раз, в 1800 раз, в 1900 раз, в 2000 раз, в 2100 раз, в 2200 раз, в 2300 раз, в 2400 раз, в 2500 раз, в 2600 раз, в 2700 раз, в 2800 раз, в 2900 раз, в 3000 раз, в

3100 раз, в 3200 раз, в 3300 раз, в 3400 раз, в 3500 раз, в 3600 раз, в 3700 раз, в 3800 раз, в 3900 раз, в 4000 раз, в 4100 раз, в 4200 раз, в 4300 раз, в 4400 раз, в 4500 раз, в 4600 раз, в 4700 раз, в 4800 раз, в 4900 раз, в 5000 раз, в 5100 раз, в 5200 раз, в 5300 раз, в 5400 раз, в 5500 раз, в 5600 раз, в 5700 раз, в 5800 раз, в 5900 раз или в 6000 раз.

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

(1) Комбинированная терапия с помощью антител иммунной контрольной точки.

Данное изобретение также относится к способу усиления иммунного ответа у млекопитающего с использованием иммуногенной композиции, описанной выше. Иммуногенная композиция, описанная выше, может содержать раковый антиген и антитело против PD1 и/или антитело против PDL1, описанное выше. Комбинация может быть в одной композиции или может быть отдельной и вводиться последовательно (сначала либо раковый антиген, а затем антитело иммунной контрольной точки или антитело иммунной контрольной точки, а затем раковый антиген). В некоторых вариантах реализации изобретения раковый антиген может быть введен субъекту за около 30 с, 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 минут, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин, 60 мин, 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 13 ч, 14 ч, 15 ч, 16 ч, 17 ч, 18 ч, 19 ч, 20 ч, 21 ч, 22 ч, 23 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 60 ч, 72 ч, 84 ч, 96 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель до введения субъекту антитела иммунной контрольной точки. В других вариантах реализации изобретения антитело иммунной контрольной точки может быть введено субъекту за около 30 с, 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин, 60 мин, 0,25 ч, 0,5 ч, 0,75 ч, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 13 ч, 14 ч, 15 ч, 16 ч, 17 ч, 18 ч, 19 ч, 20 ч, 21 ч, 22 ч, 23 ч, 24 ч, 36 ч, 48 ч, 60 ч, 72 ч, 84 ч, 96 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель или 8 недель до введения субъекту ракового антитела.

Комбинация ракового антигена и антитела иммунной контрольной точки индуцирует иммунную систему более эффективно, чем иммуногенная композиция, содержащая только раковый антиген. Этот более эффективный иммунный ответ обеспечивает повышенную эффективность при лечении и/или профилактике конкретного онкологического заболевания. В зависимости от антигена, используемого в иммуногенной композиции, комбинированной с антителом иммунной контрольной точки, подлежащее лечению онкологическое заболевание или опухолевый рост может представлять собой любой тип рака, такой как, но не ограничиваясь этим, меланома, рак крови (например, лейкоз, лимфома, миелома), рак легкого, плоскоклеточный рак пищевода, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудка, гепатокарциному, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак анального канала, немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы, синовиальный рак, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак шейки матки, рецидивирующий респираторный папилломатоз, рак кожи и рак желудка.

В некоторых вариантах реализации изобретения иммунный ответ может быть усилен от около 0,5 до 15 раз, от около 0,5 до около 10 раз или от около 0,5 до около 8 раз. Альтернативно, иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть увеличен по меньшей мере в около 0,5 раза, по меньшей мере в около 1,0 раз, по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2,0 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3,0 раза, по меньшей мере в около 3,5 раза, по меньшей мере в около 4,0 раза, по меньшей мере в около 4,5 раза, по меньшей мере в около 5,0 раз, по меньшей мере в около 5,5 раз, по меньшей мере в около 6,0 раз, по меньшей мере в около 6,5 раз, по меньшей мере в около 7,0 раз, по меньшей мере в около 7,5 раз, по меньшей мере в около 8,0 раз, по меньшей мере в около 8,5 раз, по меньшей мере в около 9,0 раз, по меньшей мере в около 9,5 раз, по меньшей мере в около 10,0 раз, по меньшей мере в около 10,5 раз, по меньшей мере в около 11,0 раз, по меньшей мере в около 11,5 раз, по меньшей мере в около 12,0 раз, по меньшей мере в около 12,5 раз, по меньшей мере в около 13,0 раз, по меньшей мере в около 13,5 раз, по меньшей мере в около 14,0 раз, по меньшей мере в около 14,5 раз или по меньшей мере в около 15,0 раз.

В других альтернативных вариантах реализации изобретения иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть усилен на от около 50% до около 1500%, от около 50% до около 1000% или от около 50% до около 800%. Альтернативно, иммунный ответ у субъекта, которому вводят иммуногенную композицию, может быть усилен по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 100%, по меньшей мере на около 150%, по меньшей мере на около 200%, по меньшей мере на около 250%, по меньшей мере на около 300%, по меньшей мере на около 350%, по меньшей мере на

около 400%, по меньшей мере на около 450%, по меньшей мере на около 500%, по меньшей мере на около 550%, по меньшей мере на около 600%, по меньшей мере на около 650%, по меньшей мере на около 700%, по меньшей мере на около 750%, по меньшей мере на около 800%, по меньшей мере на около 850%, по меньшей мере на около 900%, по меньшей мере на около 950%, по меньшей мере на около 1000%, по меньшей мере на около 1050%, по меньшей мере на около 1100%, по меньшей мере на около 1150%, по меньшей мере на около 1200%, по меньшей мере на около 1250%, по меньшей мере на около 1300%, по меньшей мере на около 1350%, по меньшей мере на около 1450%, или по меньшей мере на около 1500%.

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

(2) Онкологическое заболевание.

Иммуногенная композиция может быть использована для генерации или индукции иммунного ответа у млекопитающего, который является реактивным или нацелен на опухоль у млекопитающего или субъекта, нуждающегося в этом. Вызванный иммунный ответ может предотвратить рост опухоли. Вызванный иммунный ответ может снизить рост опухоли. Вызванный иммунный ответ может предотвращать и/или уменьшать метастазирование раковых или опухолевых клеток. Соответственно, иммуногенная композиция может быть использована в способе, который лечит и/или предотвращает онкологическое заболевание у млекопитающего или субъекта, которому вводят иммуногенную композицию.

В некоторых вариантах реализации изобретения введенная иммуногенная композиция может опосредовать клиренс или предотвращать рост опухолевых клеток путем индуцирования (1) гуморального иммунитета посредством В-клеточных ответов для генерации антител, которые блокируют выработку моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), тем самым замедляя развитие супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) и подавляя рост меланомы; (2) увеличения уровней цитотоксических Т-лимфоцитов, таких как CD8⁺ (CTL), чтобы атаковать и убивать клетки меланомы; (3) усиления ответов Т-хелперов; (4) и усиления воспалительных реакций с помощью IFN- γ и TFN- α или комбинации вышеуказанного.

В некоторых вариантах реализации изобретения вводимая иммуногенная композиция может увеличить безопухолевую выживаемость, уменьшить массу опухоли, увеличить выживаемость с опухолью или их комбинацию у субъекта. Вводимая иммуногенная композиция может увеличить безопухолевую выживаемость на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43% 44% и 45% у субъекта. Вводимая иммуногенная композиция может уменьшать массу опухоли на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59% и 60% у субъекта после иммунизации. Вводимая иммуногенная композиция может снижать васкуляризацию опухолевой ткани у субъекта. Вводимая иммуногенная композиция может увеличить выживаемость с опухолью на 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59% и 60% у субъекта.

9. Пути введения.

Иммуногенную композицию или фармацевтическую композицию можно вводить различными путями, включая пероральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, посредством ингаляции, посредством буккального введения, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, интраназальный, интратекальный и внутрисуставный или их комбинации. Для ветеринарного применения композицию можно вводить в виде подходящего приемлемого приготовления в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринар может легко определить схему применения и способ введения, которые наиболее подходят для конкретного животного. Иммуногенную композицию можно вводить с помощью традиционных шприцев, безыгольных инъекционных устройств, "биобалистически с применением микрочастиц" или других физических способов, таких как электропорация ("EP"), "гидродинамический способ" или ультразвук.

Вектор иммуногенной композиции может быть введен млекопитающему с помощью нескольких хорошо известных технологий, включая инъекцию ДНК (также называемую ДНК-вакцинацией) с электропорацией и без нее *in vivo*, опосредование липосомами, с помощью наночастиц, рекомбинантных векторов, такие как рекомбинантный аденовирус, вирус, ассоциированный с рекомбинантным аденовирусом и с помощью рекомбинантной вакцинация. Один или несколько раковых антигенов иммуногенной композиции можно вводить с помощью инъекции ДНК и вместе с электропорацией *in vivo*.

Электропорация.

Иммуногенная композиция или фармацевтическая композиция может быть введена с помощью электропорации. Введение иммуногенной композиции посредством электропорации может быть выполнено с использованием устройств для электропорации, которые могут быть выполнены с возможностью доставки в желаемую ткань млекопитающего импульса энергии, эффективного для образования обратимых пор в клеточных мембранах. В одном варианте реализации изобретения импульс энергии представ-

ляет собой постоянный ток, подобный заданному пользователем току. Устройство для электропорации может содержать компонент электропорации и электрод в сборе или ручку в сборе. Компонент электропорации может содержать и иметь в составе один или более различных элементов устройств для электропорации, в том числе: контроллер, генератор сигналов тока, тестер импеданса, регистратор сигналов, элемент ввода, элемент сообщения о состоянии, порт связи, компонент памяти, источник питания и выключатель. Электропорацию можно проводить с использованием устройства электропорации *in vivo*, например системы CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) или электропоратора Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) для облегчения трансфекции клеток плазмидой.

Примеры устройств для электропорации и способов электропорации, которые могут облегчать введение иммуногенных композиций согласно данному изобретению, включают те, которые описаны в патенте США № 7245963, Draghia-Akli, et al., патентной публикации США 2005/0052630, поданной Smith et al., содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Другие устройства для электропорации и способы электропорации, которые могут быть использованы для облегчения введения, включают предложенные в принадлежащей этому же заявителю и одновременно находящейся на рассмотрении заявке на патент США № 11/874072, поданной 17 октября 2007 года, по которой заявляется приоритет в соответствии с § 119(e) раздела 35 Кодекса законов США на основании предварительных заявок США № 60/852149, поданной 17 октября 2006 года, и № 60/978982, поданной 10 октября 2007 года, все из которых включены в данный документ в полном объеме.

В патенте США № 7245963, Draghia-Akli, et al. описаны модульные электродные системы и их использование для облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Модульные электродные системы могут содержать множество игольчатых электродов; иглу для подкожных инъекций; электрический разъем, который обеспечивает проводящую связь от программируемого импульсного контроллера постоянного тока к множеству игольчатых электродов; и источник питания. Оператор может взять множество игольчатых электродов, которые установлены на опорной конструкции и плотно вставить их в выбранную ткань в теле или растении. Затем биомолекулы вводят через подкожную иглу в выбранную ткань. Программируемый контроллер импульсов постоянного тока активируется и электрический импульс постоянного тока подается на множество игольчатых электродов. Применяемый электрический импульс постоянного тока облегчает введение биомолекулы в клетку между множеством электродов. Все содержание патента США № 7245963 включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Патентная публикация США 2005/0052630, поданная Smith et al. описывает устройство для электропорации, которое можно использовать для эффективного облегчения введения биомолекулы в клетки выбранной ткани организма или растения. Устройство электропорации содержит электрокинетическое устройство ("устройство ЕКD"), работа которого определяется программным обеспечением или встроенным программным обеспечением. Устройство ЕКD генерирует серию программируемых шаблонов импульсов постоянного тока между электродами в массиве на основе пользовательского управления и ввода параметров импульсов и позволяет хранить и получать данные о волновых характеристиках тока. Устройство электропорации также содержит сменный электродный диск, имеющий ряд игольчатых электродов, центральный канал для инъекционной иглы и съемный направляющий диск. Все содержание патентной публикации США 2005/0052630 включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Массивы электродов и способы описанные в патенте США № 7245963 и патентной публикации США 2005/0052630 можно адаптировать для глубокого проникновения не только в такие ткани, как мышцы, но и в другие ткани или органы. Из-за конфигурации массива электродов инъекционную иглу (в деневрологическую систему выбранной биомолекулы) также полностью вставляют в орган-мишень и вводят инъекцию перпендикулярно ткани-мишени, в области, которая предварительно очерчена электродами. В одном варианте реализации изобретения электроды имеют длину 20 мм и калибр 21, как описано в патенте США № 7245963 и патентной публикации США 2005/005263.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации изобретения, которые включают устройства электропорации и их использование, представлены устройства электропорации, которые описаны в следующих патентах: Патент США 5,273,525, выданный 28 декабря 1993 года, патенты США 6,110,161, выданный 29 августа 2000 года, 6,261,281, выданный 17 июля 2001 года, и 6,958,060, выданный 25 октября 2005 года, и патент США 6,939,862, выданный 6 сентября 2005 года. Кроме того, в данном документе рассматриваются патенты, охватывающие объект изобретения, представленный в патенте США № 6697669, выданном 24 февраля 2004 года, который относится к введению ДНК с использованием любого из множества устройств, и в патенте США № 7328064, выданном 5 февраля 2008 года, который относится к способу инъектирования ДНК. Указанные выше патенты включены посредством ссылки в полном объеме.

10. Способ приготовления иммуногенной композиции.

В данном документе представлены способы приготовления молекул нуклеиновых кислот, которые содержат иммуногенные композиции, обсуждаемые в данном документе. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть использованы для инокуляции клеточной культуры в крупномасштабном ферментацион-

ном резервуаре с использованием известных в данной области техники способов.

Молекулы нуклеиновой кислоты для использования с EP-устройствами согласно данному изобретению могут быть приготовлены или изготовлены с использованием комбинации известных устройств и технологий. В одном варианте реализации изобретения они изготовлены с использованием оптимизированной технологии изготовления плазмиды, которая описана в опубликованной заявке на патент США 20090004716, поданной 23 мая 2007 года. В некоторых примерах молекулы нуклеиновой кислоты, используемые в этих исследованиях, могут быть приготовлены в концентрациях, превышающих или равных 10 мг/мл. Технологии изготовления также включают или охватывают различные устройства и протоколы, которые обычно известны специалистам в данной области техники, в дополнение к тем, которые описаны в заявке на патент США 60/939792, и включая те, которые описаны в патенте, составляющем предмет лицензии, патенте США № 7238522, выданном 3 июля 2007 года. Указанные выше заявка и патент, заявка на патент США № 60/939792 и патент США № 7238522, соответственно, включены в данный документ в полном объеме.

Данное изобретение имеет множество аспектов, иллюстрируемых следующими неограничивающими примерами.

11. Примеры.

Пример 1.

Конструирование рТуг.

На изображено на фиг. 1А и 9, тирозиназа (Туг) может содержаться в различных организмах. Соответственно, консенсусную Туг получали посредством выравнивания последовательностей, соответствующих Туг из организмов, представленных на фиг. 1А, и выбора наиболее распространенной аминокислоты и/или нуклеотида для консенсусной Туг. Соответствующие последовательности Туг для каждого организма получали из GenBank (NCBI). Таким образом, консенсусная Туг отражала консервативные элементы последовательностей Туг у разных видов.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей консенсусный Туг, была адаптирована для содержания лидерной последовательности IgE. В частности, лидерная последовательность IgE была слита в рамке считывания до консенсусной последовательности нуклеиновой кислоты Туг (фиг. 1В). Полученную последовательность затем вставляли в вектор экспрессии рVax1 для создания конструкции Тирозиназы или плазмиды (рТуг), таким образом, что последовательность Козака предшествовала нуклеотидной последовательности, кодирующей лидерную последовательность IgE и консенсусную Туг.

Вставка консенсусной последовательности нуклеиновой кислоты Туг в рVax1 была подтверждена с помощью анализа с использованием рестрикционных ферментов. Как изображено на фиг. 1С, консенсусная последовательность нуклеиновой кислоты Туг была отделена от плазмиды рVax1 на агарозном геле для разделения ДНК (т.е. полоса, обозначенная BamH1/Xho1), подтверждая тем самым, что вектор рVax1 содержал консенсусную последовательность нуклеиновой кислоты Туг.

Экспрессия консенсусной Туг была подтверждена трансфекцией клеток HeLa с помощью рТуг. Вестерн-блоттинг с человеческим антителом против Туг подтвердил экспрессию консенсусного белка Туг в клетках HeLa (фиг. 1D). Окрашивание GFP дополнительно продемонстрировало экспрессию консенсусного белка Туг в трансфицированных клетках HeLa (фиг. 1E). В обоих экспериментах вестерн-блоттинга и окрашивания.

Пример 2.

Вакцинация с помощью рТуг индуцировала клеточный иммунный ответ.

Описанную выше рТуг использовали для вакцинации мышей, чтобы оценить, был ли индуцирован клеточный иммунный ответ с помощью рТуг. Мышей C57/B6 были иммунизировали с использованием стратегии иммунизации, представленной на фиг. 2А. Некоторых мышей иммунизировали с помощью рVax1, тогда как других мышей иммунизировали с помощью рТуг. Мышей, иммунизированных с помощью рТуг, далее разделяли на следующие группы: (1) дозировка 5 мкг рТуг; (2) дозировка 20 мкг рТуг; (3) дозировка 30 мкг рТуг; и (4) дозировка 60 мкг рТуг.

На 35-й день стратегии иммунизации спленоциты были выделены из мышей C57B/6 и оценены на предмет индукции интерферона- γ (IFN- γ) с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Как изображено на фиг. 2В, дозировка 20 мкг рТуг индуцировала самые высокие уровни IFN- γ .

Клеточный иммунный ответ на рТуг был дополнительно оценен у иммунизированных мышей Balb/c и C57B/6. Мышей иммунизировали либо с помощью рVax1, либо с помощью рТуг. Спленоциты выделяли через две недели после третьей иммунизации и стимулировали с помощью консенсусного пептида Туг. После стимуляции количество спленоцитов, секретирующих IFN- γ , рассчитывали как среднее количество пятен в трех повторах стимулированных лунок. Этот анализ показал, что мыши C57/B6 были пригодны для вакцинации с помощью рТуг (данные не показаны).

Пример 3.

Вакцинация с помощью рТуг увеличивала уровни цитокинов IFN- γ и TNF- α .

Продуцирование цитокинов исследовали на мышях, иммунизированных с помощью рТуг и рVax1. Мышей иммунизировали с использованием стратегии, представленной на фиг. 2А. На 35-й день страте-

гии иммунизации клетки, выделенные из иммунизированных мышей, стимулировали в течение ночи с помощью пептидов Tug. После стимуляции анализ полифункциональных ответов измеряли с помощью FACS. В частности, при анализе исследовали CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки. FACS позволил идентифицировать Т-клетки, положительные на цитокины IL-2, TNF- α и IFN- γ . Из CD44 hi-клеток значительный процент CD8⁺ Т-клеток продуцировал IFN- γ у мышей, иммунизированных с помощью pTug, по сравнению с мышами, иммунизированными с помощью pVax1 (фиг. 3).

Пример 4.

Tug-специфические антитела продуцируются в ответ на вакцинацию с помощью pTug.

Гуморальный иммунный ответ исследовали на мышах, вакцинированных с помощью pTug. В частности, мышью C57Bl/6 (n=4) иммунизировали три раза с 2-недельными интервалами либо с помощью pTug, либо с помощью pVax1. Каждая иммунизация представляла собой 20 мкг/внутримышечно с последующей электропорацией с помощью MID-EP. После третьей иммунизации (то есть на 35-й день) у мышей отбирали сыворотку и с помощью ELISA измеряли титры антител с использованием всех IgG-специфических вторичных антител, меченных HRP. Сыворотки разбавляли, как указано на фиг. 4А. Как изображено на фиг. 4А, специфические антитела против Tug продуцировались мышами, иммунизированными с помощью pTug. Мыши, иммунизированные с помощью pTug, представлены заштрихованным кружком на фиг. 4А, в то время как мыши, иммунизированные с помощью pVax1, представлены незакрашенным треугольником на фиг. 4А.

Кроме того, сыворотки от иммунизированных мышей серийно разводили в 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 и 1:640. Каждое разведение сыворотки добавляли в трех повторах в отдельные лунки (50 мкл/лунку), содержащие пептиды Tug. Повышение пика Tug-специфического титра по сравнению с преиммунной сывороткой было обнаружено для всех иммунизированных групп мышей в дни 90 и 120 повторного тестирования. Репрезентативные результаты трех независимых экспериментов в каждой точке серийного разбавления изображены на фиг. 4В. Эти данные также указывают на то, что иммунизация pTug индуцирует продуцирование специфических антител против Tug у мышей, иммунизированных с помощью pTug.

Пример 5.

Мыши, вакцинированные с помощью pTug, имеют повышенную выживаемость после введения опухоли pTug был дополнительно проанализирован, чтобы определить, может ли вакцинация с помощью pTug обеспечить защиту от опухолей. В частности, мышью C57Bl/6 (10 на группу) иммунизировали с 2-недельными интервалами либо с помощью pTug, либо с помощью pVax1. Каждая иммунизация представляла собой 20 мкг/внутримышечно с последующей электропорацией с помощью MID-EP. Через неделю после третьей иммунизации (т.е. на 35-й день) иммунизированных мышам внутрикожно вводили меланому B16 до тех пор, пока диаметр опухоли не превысил 200 мм².

Впоследствии безопухолева выживаемость и объем опухолей оценивали в иммунизированных группах мышей. Как изображено на фиг. 5А (кривая выживаемости Каплана-Мейера), Мыши, иммунизированные с помощью pTug, имели увеличенную безопухолевую выживаемость (т.е. 40% на 40-й день и после введения опухоли) по сравнению с мышами, вакцинированными с помощью pVax1 (p=0,05), которые все были мертвы на 20 день после введения опухоли. Мыши, иммунизированные с помощью pTug, также имели уменьшенный объем опухоли (т.е. около 50%) по сравнению с мышами, иммунизированными с помощью pVax1 (фиг. 5В). Для обеих фиг. 5А и 5В мыши, иммунизированные с помощью pVax1, представлены закрашенными квадратами, а мыши, иммунизированные pTug, представлены закрашенными кружками. Соответственно, эти данные продемонстрировали, что вакцинация с помощью pTug обеспечивала защиту от меланомы, а именно увеличивала безопухолевую выживаемость и уменьшала объем опухоли.

Пример 6.

Популяция MDSC снижается в опухолях из мышей, вакцинированных с помощью pTug.

Популяции MDSC исследовали у мышей, иммунизированных с помощью pTug, и неиммунизированных мышей, чтобы исследовать, изменяла ли вакцинация с помощью pTug уровни MDSC в опухолях из соответствующих групп мышей. В частности, процент клеток Gr-1⁺ и CD11b⁺ был исследован у иммунизированных и неиммунизированных мышей.

Как изображено на фиг. 6 и 7, уровни MDSC были значительно снижены в опухолях у мышей, иммунизированных с помощью pTug, по сравнению с неиммунизированными мышами (p=0,0004). Процент популяции MDSC у неиммунизированных мышей составил $40,00 \pm 4,826$. Процент популяции MDSC у мышей, иммунизированных с помощью pTug, составлял $5,103 \pm 0,7718$. Соответственно, эти данные продемонстрировали, что иммунизация с помощью pTug снижала популяцию MDSC в опухолях мышей, вакцинированных с помощью pTug.

Пример 7.

Уровни MCP-1 снижаются при вакцинации с помощью pTug.

MDSC могут секретировать цитокин MCP-1, который способствует ангиогенезу или васкуляризации путем миграции эндотелиальных клеток. Учитывая описанное выше влияние вакцинации с помощью

pTug на уровне MDSC в опухолях, уровни MCP-1 исследовали после вакцинации с помощью pTug.

Как изображено на фиг. 8A, MDSC в меланоме B16 могут секретировать MCP-1. Таким образом, мышей, иммунизированных с помощью pTug, и мышей, иммунизированных с помощью pVax1, заражали меланомой B16, чтобы проверить, изменяет ли иммунизация с помощью pTug уровни MCP-1. Нативные мыши были включены в качестве дополнительного контроля. После заражения MDSC выделяли непосредственно из опухолевой ткани, а уровни цитокинов MCP-1 анализировали с помощью ELISA. Эксперимент проводили дважды в трех повторах.

Как изображено на фиг. 8B, MDSC в меланоме B16 или опухолевой ткани значительно секретировали MCP-1 (см. иммунизированные с помощью pVax1 мыши). Однако у мышей, иммунизированных с помощью pTug, не было значительного увеличения уровней MCP-1. Тем не менее, уровни MCP-1 у мышей, иммунизированных с помощью pTug, были в около 3 раза ниже, чем у мышей, иммунизированных с помощью pVax1. Соответственно, эти данные продемонстрировали, что вакцинация с помощью pTug снижала уровень секреции MCP-1 MDSC в опухолях мышей, иммунизированных с помощью pTug.

Пример 8.

Конструирование pPRAME.

Была создана консенсусная последовательность для PRAME, и нуклеотидная последовательность, кодирующая консенсусный антиген PRAME, была вставлена в рестрикционные сайты ферментов BamHI и XhoI экспрессирующего вектора или плазмиды pVAX (также называемой в данном документе pVAX1) с получением pGX1411 (также называемого в данном документе pPRAME) (см. фиг. 10A).

Для подтверждения того, что pPRAME приводил к экспрессии консенсусного антигена PRAME, pVAX и pPRAME трансфицировали в клетки RD и клетки 293T. DAPI использовали для окрашивания ядер, и консенсусный антиген PRAME также флуоресцентно окрашивали. Это окрашивание вместе со слиянием окрашивания антигена DAPI и консенсусного антигена PRAME изображено на фиг. 10B. Это окрашивание продемонстрировало, что консенсусный антиген PRAME был экспрессирован из pPRAME, и консенсусный антиген PRAME не был обнаружен в клетках, трансфицированных с помощью pVAX (т.е. отрицательный контроль).

Кроме того, для подтверждения экспрессии консенсусного антигена PRAME в трансфицированных клетках использовали анализ вестерн-блоттинга для трансфицированных клеток (фиг. 10C). Нетрансфицированные клетки и клетки, трансфицированные с помощью pVAX, использовали в качестве отрицательных контролей (см. дорожки, обозначенные как "контроль" и "pVAX" соответственно на фиг. 10C). На фиг. 10C, обнаружение бета-актина использовали в качестве контроля нанесения. Таким образом, окрашивание трансфицированных клеток и вестерн-блоттинг лизатов из трансфицированных клеток продемонстрировали, что вектор pPRAME обеспечивает экспрессию консенсусного антигена PRAME в клетках.

Пример 9.

Ответ гамма-интерферона на вакцинацию с помощью pPRAME.

Описанную выше pPRAME использовали для вакцинации мышей, чтобы оценить, был ли индуцирован клеточный иммунный ответ с помощью pPRAME. Мыши C57BL/6 были разделены на группы. Первая группа была нативной и не получала pPRAME. Вторая, третья, четвертая, пятая и шестая группы мышей получали 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 25 мкг и 50 мкг pPRAME, соответственно.

После иммунизации спленциты были выделены из мышей C57BL/6 и оценены на предмет индукции интерферона гамма (IFN- γ) с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Как изображено на фиг. 11A и 11B, каждая доза pPRAME индуцировала продуцирование или секрецию IFN- γ в отличие от нативных мышей отрицательного контроля. В частности, уровни IFN- γ были увеличены в от около 3000 раз до около 4500 раз у вакцинированных мышей по сравнению с невакцинированными мышами. Соответственно, эти данные продемонстрировали, что вакцинация с помощью pPRAME, которая кодирует консенсусный антиген PRAME, индуцировала клеточный иммунный ответ, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN- γ по сравнению с отсутствием вакцинации.

Пример 10.

Конструирование pNY-ESO-1.

Была создана консенсусная последовательность для NY-ESO-1, и нуклеотидная последовательность, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-1, была вставлена в рестрикционные сайты ферментов BamHI и XhoI экспрессирующего вектора или плазмиды pVAX (также называемой в данном документе pVAX1) с получением pGX1409 (также называемого в данном документе pNY-ESO-1) (см. фиг. 12A).

Для подтверждения того, что pNY-ESO-1 приводил к экспрессии консенсусного антигена NY-ESO-1, pVAX и pNY-ESO-1 трансфицировали в клетки. DAPI использовали для окрашивания ядер, и консенсусный антиген NY-ESO-1 также флуоресцентно окрашивали. Это окрашивание вместе со слиянием окрашивания антигена DAPI и консенсусного антигена NY-ESO-1 изображено на фиг. 12B. Это окрашивание продемонстрировало, что консенсусный антиген NY-ESO-1 был экспрессирован из pNY-ESO-1, и консенсусный антиген NY-ESO-1 не был обнаружен в клетках, трансфицированных с помощью pVAX

(т.е. отрицательный контроль).

Кроме того, для подтверждения экспрессии консенсусного антигена NY-ESO-1 в трансфицированных клетках использовали анализ вестерн-блоттинга лизатов из трансфицированных клеток 293T и RD (фиг. 12C). Нетрансфицированные клетки и клетки, трансфицированные с помощью pVAX, использовали в качестве отрицательных контролей (см. дорожки, обозначенные как "контроль" и "pVAX" соответственно на фиг. 12C). На фиг. 12C, обнаружение альфа-актина использовали в качестве контроля нанесения. Таким образом, окрашивание трансфицированных клеток и вестерн-блоттинг лизатов из трансфицированных клеток продемонстрировали, что вектор pNY-ESO-1 обеспечивает экспрессию консенсусного антигена NY-ESO-1 в клетках.

Пример 11.

Ответ гамма-интерферона на вакцинацию с помощью pNY-ESO-1.

Описанную выше pNY-ESO-1 использовали для вакцинации мышей, чтобы оценить, был ли индуцирован клеточный иммунный ответ с помощью pNY-ESO-1. Мыши C57BL/6 были разделены на группы. Первая группа была нативной и не получала pNY-ESO-1. Вторая и третья группы мышей получали 25 мкг и 50 мкг pNY-ESO-1 соответственно.

После иммунизации спленоциты были выделены из мышей C57BL/6 и оценены на предмет индукции интерферона гамма (IFN- γ) с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Как изображено на фиг. 13, каждая доза pPRAME индуцировала продуцирование или секрецию IFN- γ в отличие от нативных мышей отрицательного контроля. В частности, уровни IFN- γ были увеличены в от около 700 раз до около 1100 раз у вакцинированных мышей по сравнению с невакцинированными мышами. Соответственно, эти данные продемонстрировали, что вакцинация с помощью pNY-ESO-1, которая кодирует консенсусный антиген NY-ESO-1, индуцировала клеточный иммунный ответ, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN- γ по сравнению с отсутствием вакцинации.

Пример 12.

Ответ гамма-интерферона на вакцинацию с помощью pNY-ESO-2.

Была получена консенсусная последовательность NY-ESO-2, и нуклеотидная последовательность, кодирующая консенсусный антиген NY-ESO-2 была вставлена в множественный сайт встраивания вектора экспрессии или плазмиды pVAX (также называемой в данном документе pVAX1) для получения pNY-ESO-2.

Данную pNY-ESO-2 использовали для вакцинации мышей, чтобы оценить, был ли индуцирован клеточный иммунный ответ с помощью pNY-ESO-2. Мыши C57BL/6 были разделены на группы. Первая группа была нативной и не получала pNY-ESO-2. Вторая и третья группы мышей получали 25 мкг и 50 мкг pNY-ESO-2 соответственно.

После иммунизации спленоциты были выделены из мышей C57BL/6 и оценены на предмет индукции интерферона гамма (IFN- γ) с помощью анализа ELISpot IFN- γ . Как изображено на фиг. 14, каждая доза pNY-ESO-2 индуцировала продуцирование или секрецию IFN- γ в отличие от нативных мышей отрицательного контроля. В частности, уровни IFN- γ были увеличены в от около 400 раз до около 500 раз у вакцинированных мышей по сравнению с невакцинированными мышами. Соответственно, эти данные продемонстрировали, что вакцинация с помощью pNY-ESO-2, которая кодирует консенсусный антиген NY-ESO-2, индуцировала клеточный иммунный ответ, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN- γ по сравнению с отсутствием вакцинации.

Понятно, что представленное выше подробное описание и прилагаемые примеры являются лишь иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения, который определяется исключительно пунктами прилагаемой формулой изобретения и их эквивалентами.

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

Пример 13.

Синтетический консенсусный hTERT.

Эксперименты, представленные в данном документе, были разработаны для оценки способности синтетического консенсусного hTERT, разработанного и изготовленного с использованием способов, описанных в данном документе, нарушать толерантность у приматов, не являющихся людьми. Был разработан синтетический консенсусный hTERT (pGX1434), который приблизительно на 96% идентичен TERT макаки-резус. Макаки-резус либо иммунизировали плазмидой, кодирующей синтетический консенсусный hTERT, либо плазмидой, кодирующей нативный RhTERT, в присутствии адьюванта IL12. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует синтетический консенсусный hTERT (pGX1434), представлена в SEQ ID NO: 45. Аминокислотная последовательность синтетического консенсусного hTERT (pGX1434) представлена в SEQ ID NO: 46. Обезьян иммунизировали четыре раза, и клеточные иммунные ответы оценивали с помощью анализа ELISpot. Было отмечено, что по сравнению с нативным RhTERT

иммунизация синтетическим консенсусным hTERT вызывала более сильные иммунные ответы ($1200 \text{ SFU}/10^6$ против $400 \text{ SFU}/10^6$).

Синтетический консенсус hTERT был разработан для TERT человека с 5 мутациями для устранения его функции. Нативный RhTERT кодирует TERT резуса с 2 мутациями. Обе конструкции были оптимизированы. Схематическое представление конструкций TERT представлено на фиг. 16 (вверху). На фиг. 16 также изображена гомология белка между оптимизированным TERT и нативным TERT, идентифицированным у человека, резуса и мыши (фиг. 16 (внизу)).

Эксперименты проводились для характеристики TERT-специфических ответов IFN- γ у мышей против нативных пептидов резуса. Мышей ($n=8$ на группу) иммунизировали в 0, 2 и 4 недели с помощью нативного RhTERT и синтетического консенсусного hTERT посредством ИМ/электропорации. Схема иммунизации с помощью ДНК-вакцины изображена на фиг. 17А. Частота TERT-специфических IFN- γ пятнообразующих единиц (SFU) на миллион спленоцитов, выделенных из вакцинированных мышей, была определена с помощью анализа.

ELISpot IFN- γ с использованием пептидов резуса. Наблюдалось, что иммунизация с помощью RhTERT и синтетического консенсусного hTERT вызывала сильный клеточный иммунный ответ (фиг. 17В).

Эксперименты проводились для характеристики TERT-специфических ответов IFN- γ у резуса. Мак-как-резус ($n=5$ на группу) иммунизировали в 0, 4, 8 и 12 недели с помощью нативного RhTERT или с помощью синтетического консенсусного hTERT, а также с помощью rhIL-12 посредством ИМ/электропорации. Схема иммунизации с помощью ДНК-вакцины изображена на фиг. 18А. Частота TERT-специфических IFN- γ пятнообразующих единиц (SFU) на миллион спленоцитов, выделенных из вакцинированных мышей, была определена с помощью анализа ELISpot IFN- γ с использованием нативных пептидов резуса и пептида SynCon hTERT. Было отмечено, что синтетический консенсусный hTERT проявляет лучшую способность нарушать толерантность у приматов, не являющихся человеком, по сравнению с RhTERT (фиг. 18В и 18С).

Дальнейшие эксперименты проводились для оценки влияния синтетического консенсусного hTERT (pGX1434) на ответы Т-клеток и рост опухоли. Мыши проходили 3 иммунизации с интервалом в 2 недели с помощью 0, 20, 40 или 60 мкг pGX1434. Т-клеточные ответы у мышей оценивали через 5 недель, демонстрируя, что pGX1434 индуцировал устойчивый Т-клеточный ответ (фиг. 19 (слева)). Для оценки роста опухоли мышам имплантировали 25×10^4 клеток ТС-1. Затем мыши проходили 4 иммунизации с интервалом в 1 неделю с помощью 25 мкг pGX1434. Объем опухоли измеряли в течение 32 дней, было определено, что мыши, обработанные с помощью pGX1434, имели уменьшенный объем опухоли по сравнению с необработанными мышами (фиг. 19 (справа), фиг. 20 и 21).

Представленные в данном документе эксперименты демонстрируют, что синтетический консенсусный hTERT способен нарушать толерантность, вызывать сильный клеточный иммунный ответ и снижать рост опухоли. Синтетический консенсусный hTERT превосходит нативный аутоантиген в отношении способности вызывать нео-антигенподобный иммунный ответ для нарушения толерантности.

Пример 14.

SynCon hTERT нарушает толерантность в NHP.

Были проведены эксперименты для оценки иммунных ответов, индуцированных с помощью pGX1434 в NHP +/- IL-12 (фиг. 22В, группы 1 и 2) и для оценки иммунных ответов, индуцированных с помощью pGX1434 в комбинации антигенов Wave 1 (фиг. 22В, группа 3). Эксперименты были дополнительно разработаны, чтобы определить, позволяет ли конструкция SynCon нарушать толерантность (фиг. 22В, группа 4) и для оценки способности SynCon hTERT нарушать толерантность в NHP (фиг. 22В, группы 1-4).

Схема эксперимента представлена на фиг. 22А. Приготовление, используемое для этих экспериментов, было следующим: 3,0 мг/конструкцию в 1,0 мл 20X SSC с объемом инъекции 1 мл.

Результаты экспериментов представлены на фиг. 23-26. Ответы на нативный TERT были обнаружены PD3 и PD4 в группе pGX1434+pGX6006 (фиг. 23). pGX1406 индуцирует более устойчивые ответы TERT по сравнению с pGX1434 при комбинировании в мультивалентном приготовлении Wave 1 с 0,20 мг pGX6006 (фиг. 25). Специфические ответы SynCon PSMA и SynCon WT-1 PD4 аналогичны для групп, содержащих pGX1434 и pGX1406.

Мультивалентное приготовление WT-1, TERT и PSMA индуцировало устойчивые иммунные ответы у мышей при исследовании с помощью IFN γ ELISpot и в компартменте CD8⁺ Т-клеток (фиг. 27), а мыши, иммунизированные комбинацией WT1, PSMA и консенсусного mTERT, продемонстрировали снижение опухолевой нагрузки и увеличение выживаемости (фиг. 28).

Представленные в данном документе эксперименты демонстрируют, что синтетический консенсусный hTERT способен нарушать толерантность и вызывать сильный клеточный иммунный ответ у приматов, не являющихся человеком.

Пример 15.
Последовательности.

SEQ ID NO:	Антиген	Тип	Плазмид а
1	Консенсусная тирозиназа	Нуклеиновая кислота	
2	Консенсусная тирозиназа	Аминокислота	
3	Консенсусный тирозиназа-зависимый белок 1	Нуклеиновая кислота	
4	Консенсусный тирозиназа-зависимый белок 1	Аминокислота	
5	Консенсусный тирозиназа-зависимый белок 2	Нуклеиновая кислота	
6	Консенсусный тирозиназа-зависимый белок 2	Аминокислота	
7	Консенсусный меланома-ассоциированный антиген 4	Нуклеиновая кислота	
8	Консенсусный меланома-ассоциированный антиген 4	Аминокислота	
9	Консенсусный соматотропин-рилизинг-гормон	Нуклеиновая кислота	
10	Консенсусный соматотропин-рилизинг-гормон	Аминокислота	
11	Консенсусный Мелан-А	Нуклеиновая кислота	
12	Консенсусный Мелан-А	Аминокислота	
13	Консенсусный NY-ESO-1	Нуклеиновая кислота	
14	Консенсусный NY-ESO-1	Аминокислота	
15	Консенсусный NY-ESO-2	Нуклеиновая кислота	
16	Консенсусный NY-ESO-2	Аминокислота	
17	Консенсусный PRAME	Нуклеиновая кислота	
18	Консенсусный PRAME	Аминокислота	
19	Con WT1-L с модифицированными цинковыми пальцами	Нуклеиновая кислота	pGX1404
20	Con WT1-L с модифицированными цинковыми пальцами	Аминокислота	pGX1404
21	Con WT1-S без цинковых пальцев	Нуклеиновая кислота	

		кислота	
22	Сop WT1-S без цинковых пальцев	Аминокислота	
23	hTERT функционально связанный с IgE	Нуклеиновая кислота	pGX1406
24	hTERT функционально связанный с IgE	Аминокислота	pGX1406
25	Консенсусный gV	Нуклеиновая кислота	
26	Консенсусный gV	Аминокислота	
27	Консенсусный gM	Нуклеиновая кислота	
28	Консенсусный gM	Аминокислота	
29	Консенсусный gN	Нуклеиновая кислота	
30	Консенсусный gN	Аминокислота	
31	Консенсусный gH	Нуклеиновая кислота	
32	Консенсусный gH	Аминокислота	
33	Консенсусный gL	Нуклеиновая кислота	
34	Консенсусный gL	Аминокислота	
35	Консенсусный gO	Нуклеиновая кислота	
36	Консенсусный gO	Аминокислота	
37	Консенсусный UL128	Нуклеиновая кислота	
38	Консенсусный UL128	Аминокислота	
39	Консенсусный UL130	Нуклеиновая кислота	
40	Консенсусный UL130	Аминокислота	
41	Консенсусный UL131a	Нуклеиновая кислота	
42	Консенсусный UL131a	Аминокислота	
43	Консенсусный UL83	Нуклеиновая кислота	

44	Консенсусный UL83	Аминокислота	
45	Синтетический Консенсусный hTERT функционально связанный с IgE	Нуклеиновая кислота	pGX1434
46	Синтетический Консенсусный hTERT функционально связанный с IgE	Аминокислота	pGX1434
47	Синтетический Консенсусный hTERT	Нуклеиновая кислота	pGX1434
48	Синтетический Консенсусный hTERT	Аминокислота	pGX1434
49	Синтетический Консенсусный mTERT функционально связанный с IgE	Нуклеиновая кислота	pGX1418
50	Синтетический Консенсусный mTERT функционально связанный с IgE	Аминокислота	pGX1418
51	Синтетический Консенсусный mTERT	Нуклеиновая кислота	pGX1418
52	Синтетический Консенсусный mTERT	Аминокислота	pGX1418
53	Синтетический Консенсусный rhTERT функционально связанный с IgE	Нуклеиновая кислота	pGX1473
54	Синтетический Консенсусный rhTERT функционально связанный с IgE	Аминокислота	pGX1473
55	Синтетический Консенсусный rhTERT	Нуклеиновая кислота	pGX1473
56	Синтетический Консенсусный rhTERT	Аминокислота	pGX1473
57	mut rhTERT	Нуклеиновая кислота	pGX1447
58	mut rhTERT	Аминокислота	pGX1447
59	Консенсусный GAP	Нуклеиновая	

		кислота	
60	Консенсусный FAP	Аминокислота	
61	Консенсусный FSHR	Нуклеиновая кислота	
62	Консенсусный FSHR	Аминокислота	
63	Консенсусный PSA	Нуклеиновая кислота	
64	Консенсусный PSA	Аминокислота	
65	Консенсусный PSMA	Нуклеиновая кислота	pGX1108
66	Консенсусный PSMA	Аминокислота	pGX1108
67	Консенсусный STEAP	Нуклеиновая кислота	
68	Консенсусный STEAP	Аминокислота	
69	Консенсусный PSCA	Нуклеиновая кислота	
70	Консенсусный PSCA	Аминокислота	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая эффективное количество молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей консенсусный антиген TERT, причем консенсусный антиген TERT содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56,

б) аминокислотной последовательности, которая на 98% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, и

в) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной аминокислотной последовательности.

2. Иммуногенная композиция по п.1, причем иммуногенная композиция дополнительно содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

а) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70;

б) аминокислотной последовательности, которая на 98% или более идентична аминокислотой последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, и

в) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной аминокислотной последовательности.

3. Иммуногенная композиция по п.1, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более антигенов, выбранных из группы, состоящей из: MAGE A1, gp100, вирусного антигена и их комбинации.

4. Иммуногенная композиция по п.3, причем вирусный антиген представляет собой антиген вируса гепатита В (HBV), вируса гепатита С (HCV) или вируса папилломы человека (HPV).

5. Иммуногенная композиция по п.4, причем антиген HBV представляет собой коровый антиген HBV или поверхностный антиген HBV, или их комбинацию.

6. Иммуногенная композиция по п.5, причем антиген HCV представляет собой антиген NS34A HCV, антиген NS5A HCV, антиген NS5B HCV, антиген NS4B HCV или их комбинацию.

7. Иммуногенная композиция по п.4, причем антиген HPV представляет собой антиген E6 HPV типа

6, антиген E7 HPV типа 6, антиген E6 HPV типа 11, антиген E7 HPV типа 11, антиген E6 HPV типа 16, антиген E7 HPV типа 16, антиген E6 HPV типа 18, антиген E7 HPV типа 18 или их комбинацию.

8. Иммуногенная композиция по п.1, дополнительно содержащая ингибитор белка иммунной контрольной точки.

9. Иммуногенная композиция по п.1, в которой молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55,

б) нуклеотидной последовательности, которая на 98% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, и

в) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

10. Иммуногенная композиция по п.2, причем иммуногенная композиция содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69;

б) нуклеотидной последовательности, которая на 98% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, и

в) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

11. Иммуногенная композиция по п.1, в которой нуклеиновая кислота представляет собой плазмиду.

12. Иммуногенная композиция по п.1, причем композиция содержит одну или более плазмид.

13. Иммуногенная композиция по п.1, дополнительно содержащая адъювант.

14. Иммуногенная композиция по п.13, в которой адъювант представляет собой IL-12, IL-15, IL-28 или RANTES.

15. Способ лечения или профилактики онкологического заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, который включает введение субъекту иммуногенной композиции по п.1.

16. Способ по п.15, в котором введение включает стадию электропорации.

17. Способ по п.15, дополнительно включающий введение субъекту ингибитора белка иммунной контрольной точки.

18. Способ по п.17, в котором иммуногенную композицию и ингибитор белка иммунной контрольной точки вводят субъекту в виде одного состава.

19. Способ по п.17, в котором иммуногенную композицию и ингибитор белка иммунной контрольной точки вводят субъекту отдельно.

20. Способ по п.15, в котором онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из меланомы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, рака печени, рака шейки матки, рецидивирующего респираторного папилломатоза (РРП), рака анального канала, рака крови, рака яичников и их комбинации.

21. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая одну нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55,

б) нуклеотидной последовательности, которая на 98% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, и

в) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по п.21, дополнительно содержащая одну или более нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из

а) нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID

NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69;

b) нуклеотидной последовательности, которая на 98% или более идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, и

с) фрагмента нуклеотидной последовательности, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 69, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной нуклеотидной последовательности.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по п.21, причем молекула нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

24. Полипептид, содержащий одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56,

b) аминокислотной последовательности, которая на 98% или более идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, и

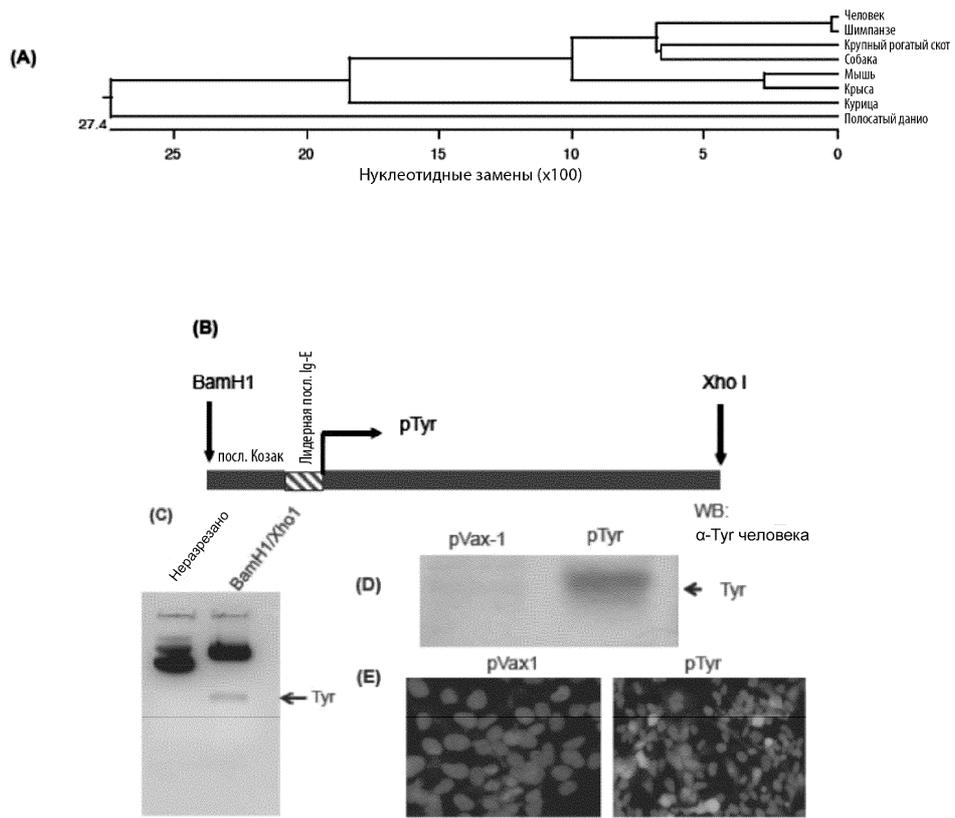
с) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной аминокислотной последовательности.

25. Полипептид по п.24, дополнительно содержащий одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из:

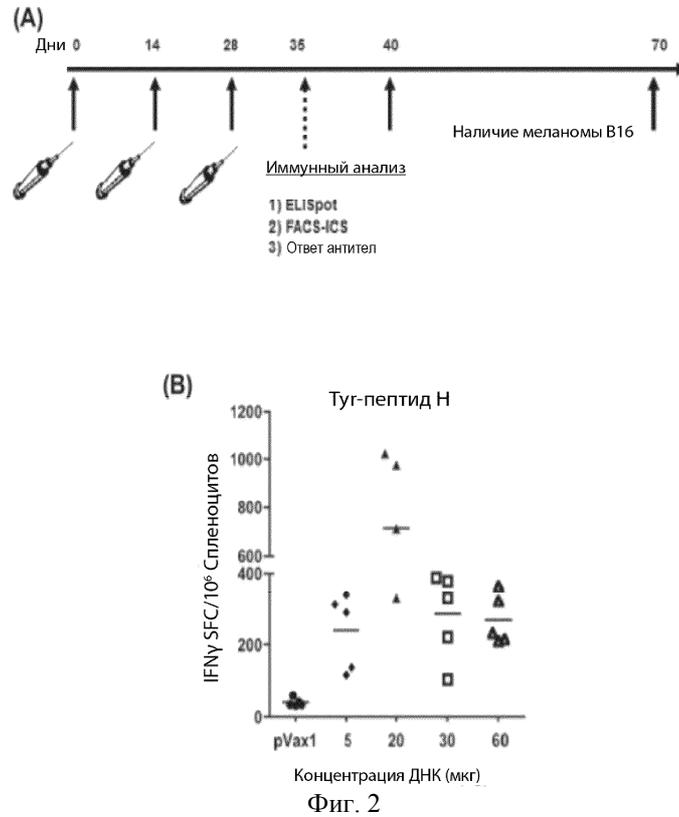
a) аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70;

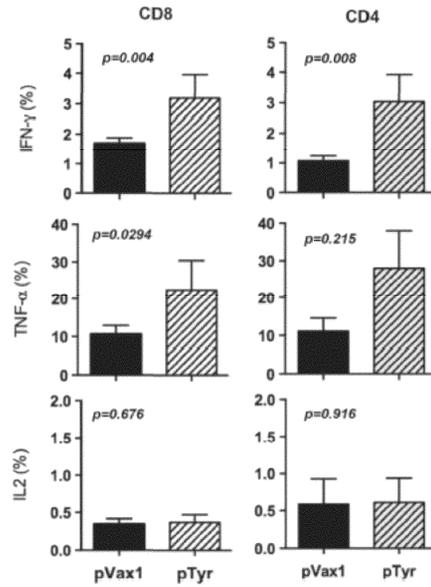
b) аминокислотной последовательности, которая на 98% или более идентична аминокислотой последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, и

с) фрагмента аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, причем фрагмент содержит по меньшей мере 98% полноразмерной аминокислотной последовательности.

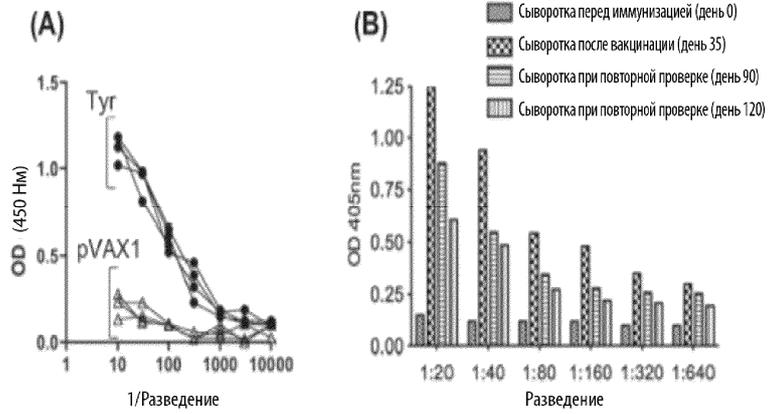


Фиг. 1

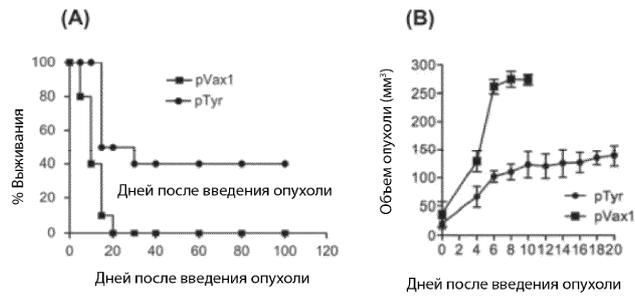




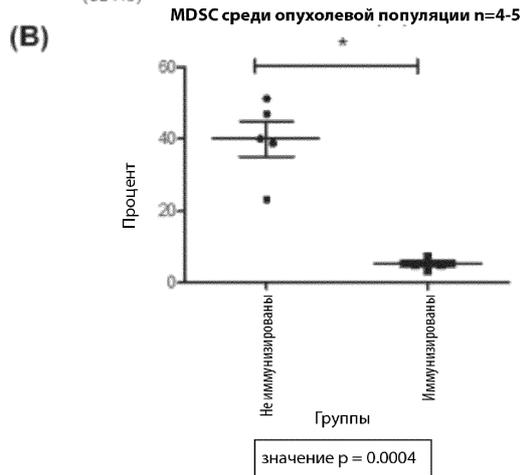
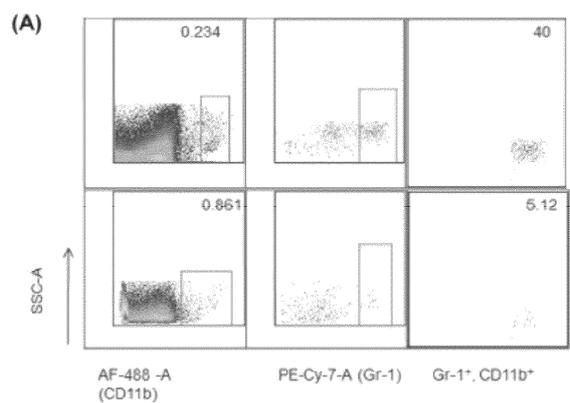
Фиг. 3



Фиг. 4

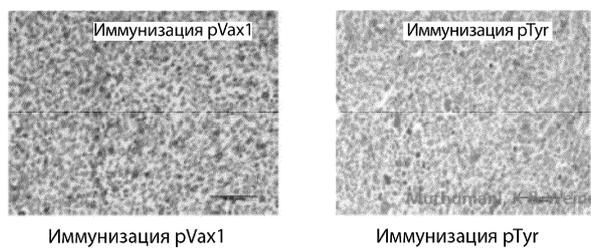


Фиг. 5



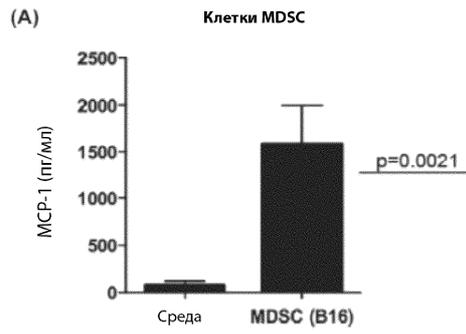
Фиг. 6

Окрашивание на предмет клеток MDSC

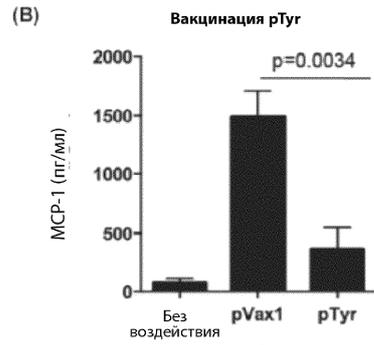


Фиг. 7

Культура ткани



Иммунизированные мыши относительно неиммунизированных

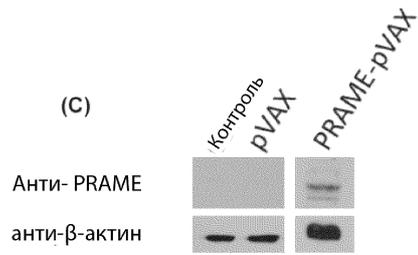
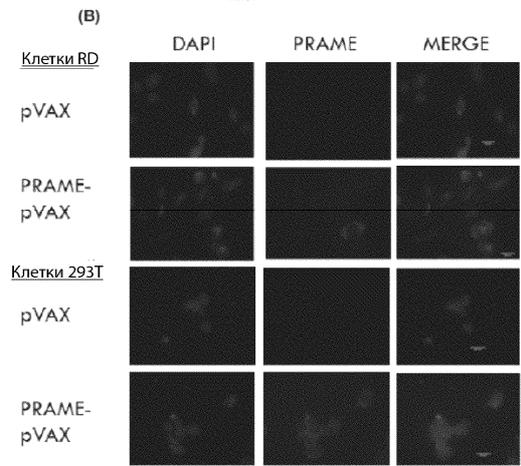
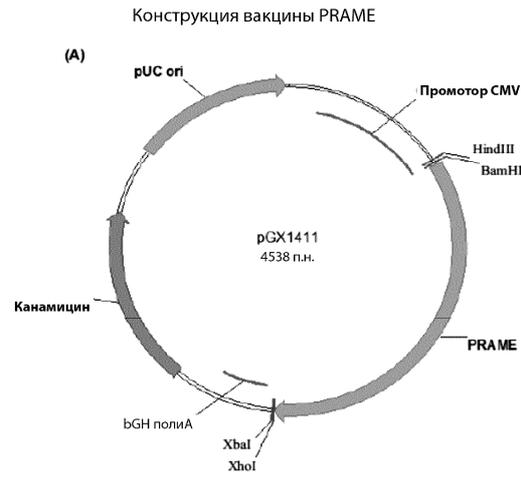


Фиг. 8

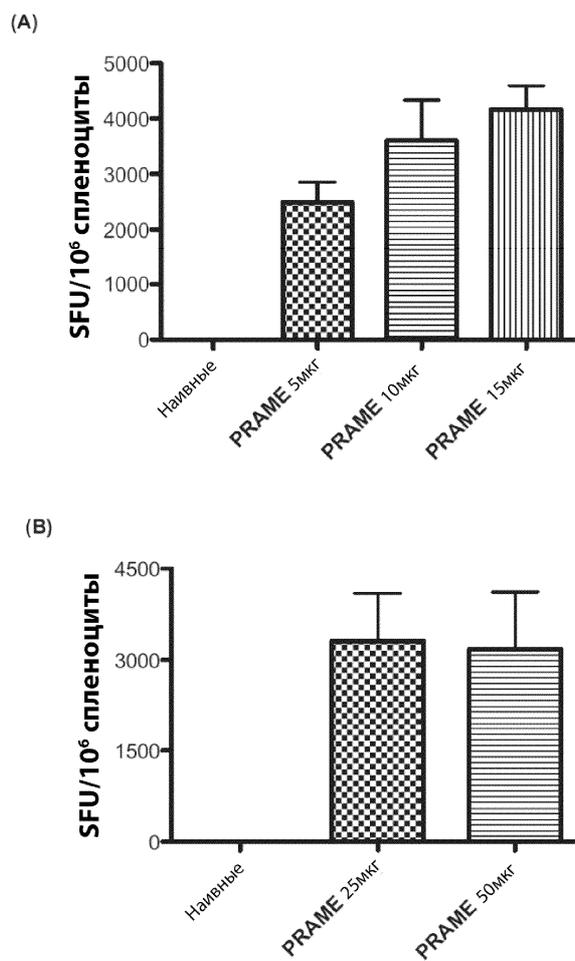
Tyr – Филогенетическое древо



Фиг. 9

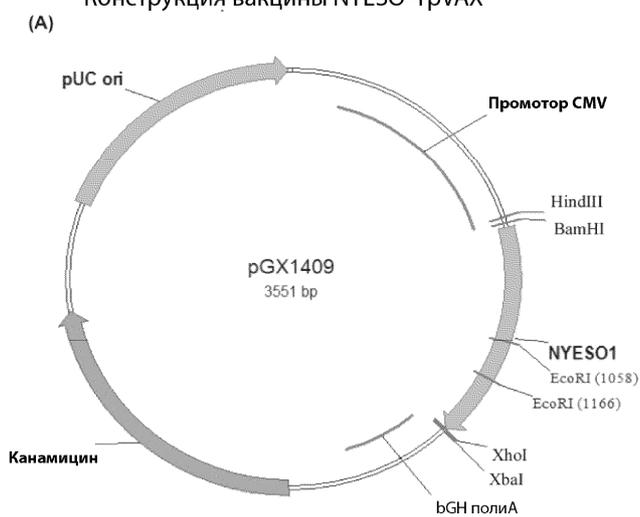


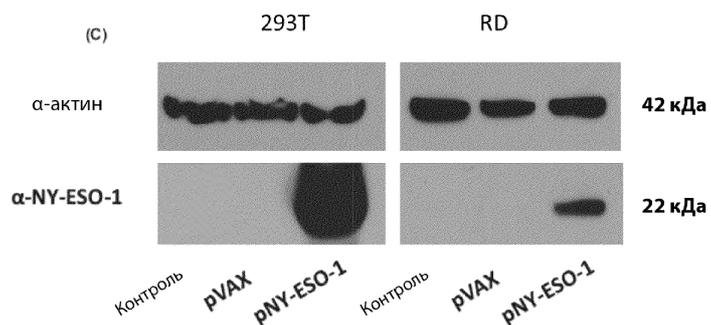
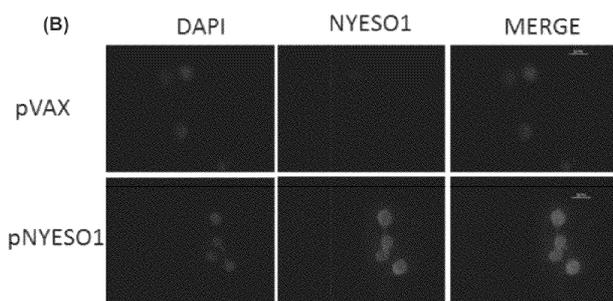
Фиг. 10



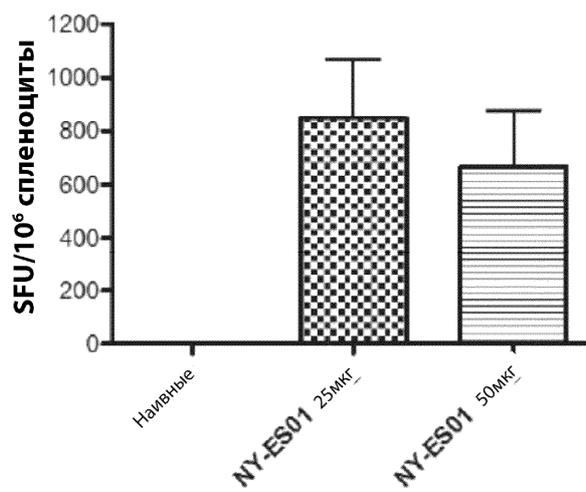
Фиг. 11

Конструкция вакцины NYESO-1 pVAX

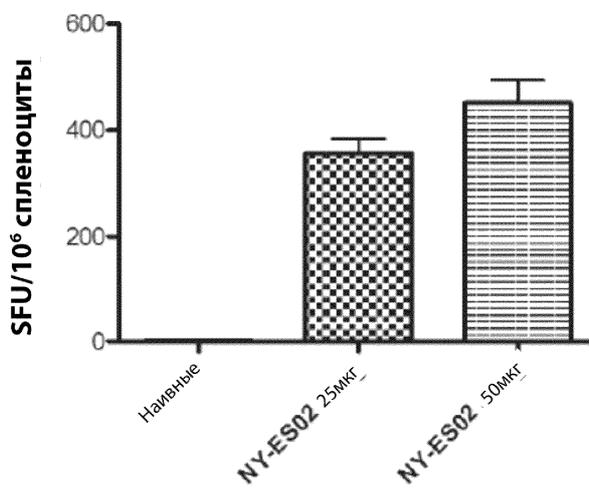




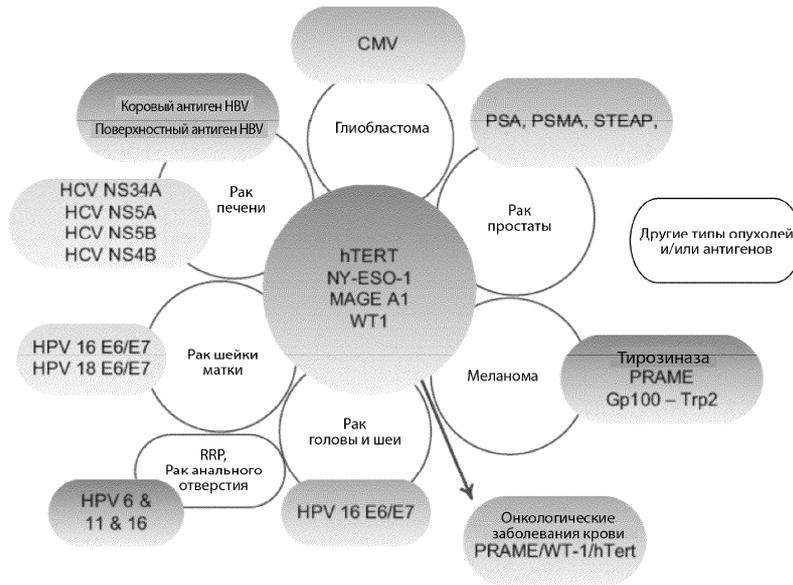
Фиг. 12



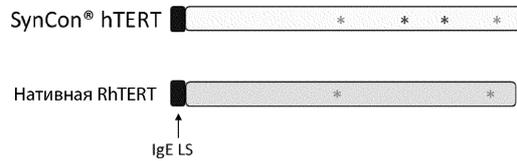
Фиг. 13



Фиг. 14

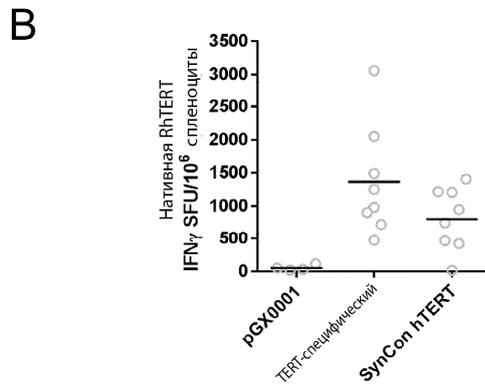


Фиг. 15



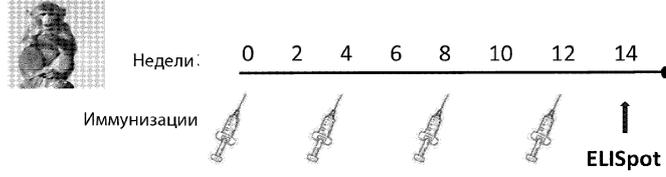
	TERT человека	TERT макаки-резус	TERT мыши
SynCon® hTERT	95.7%	94.6%	66%
Нативная RhTERT	96%	100%	63%

Фиг. 16

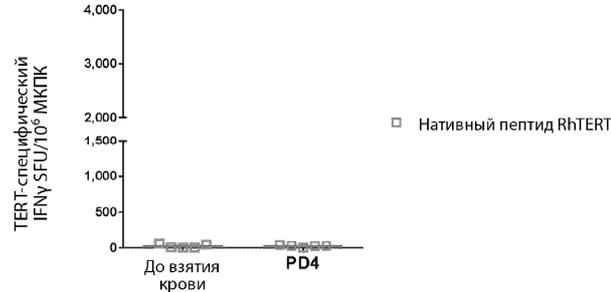


Фиг. 17

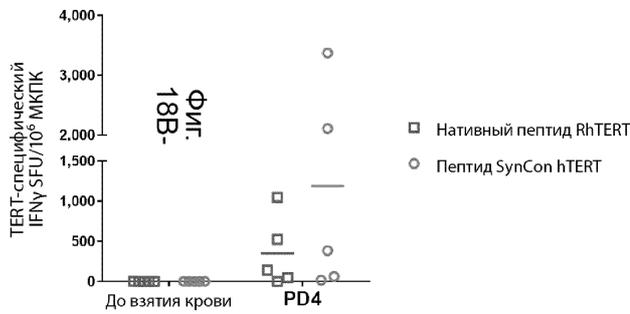
А Доза: 3 мг конструкции TERT плюс 0,07 мг опт. rhIL-12 на иммунизацию



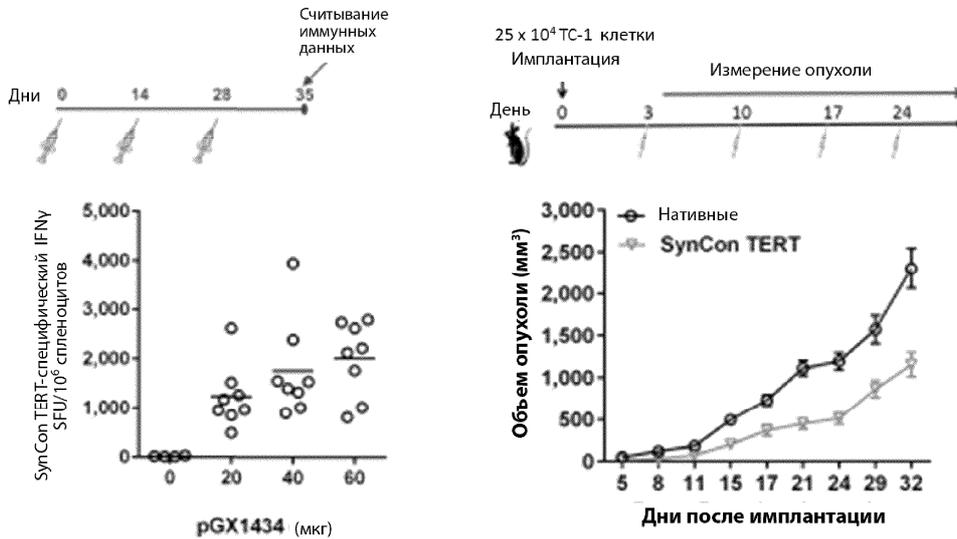
В RhTERT-иммунизированная группа



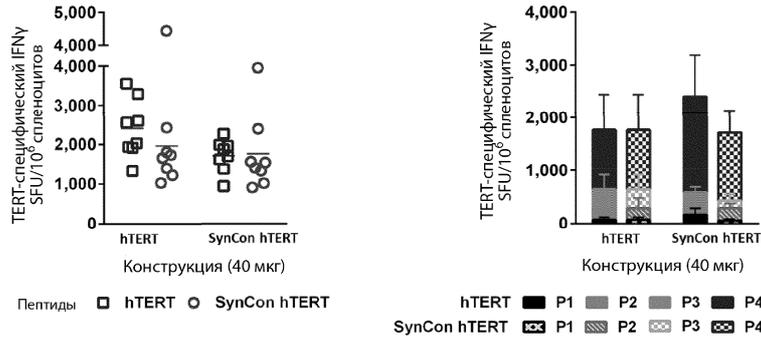
С Группа, иммунизированная синтетической консенсусной hTERT



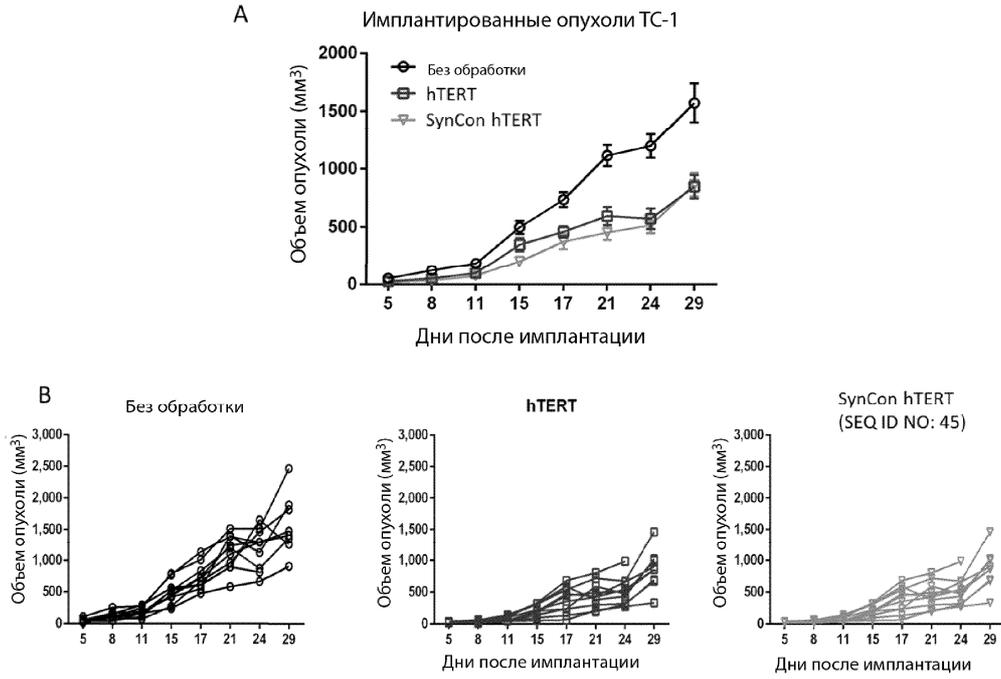
Фиг. 18



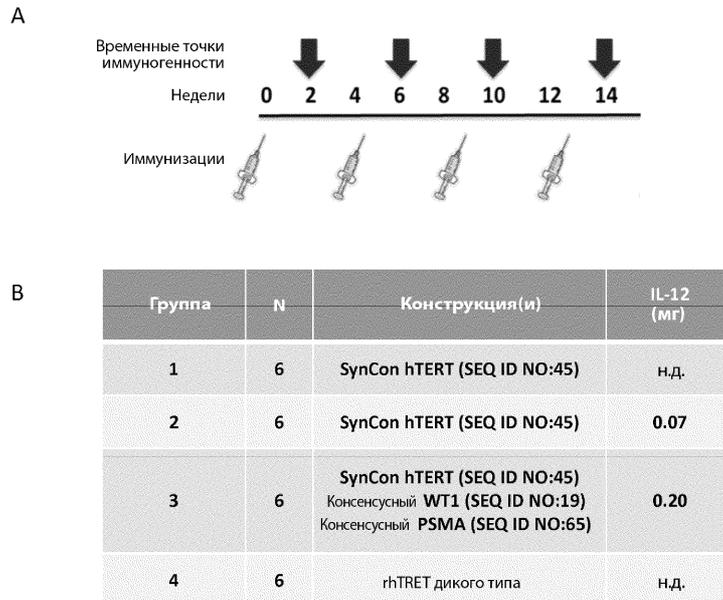
Фиг. 19



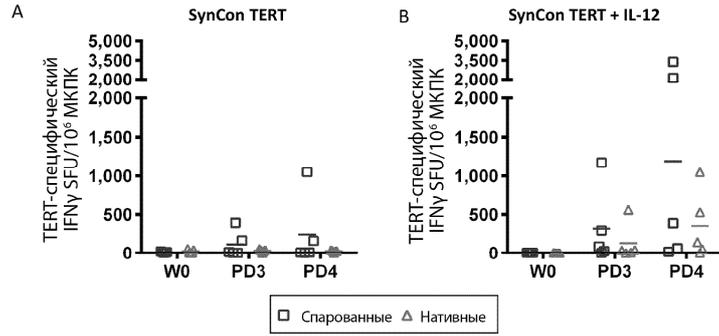
Фиг. 20



Фиг. 21



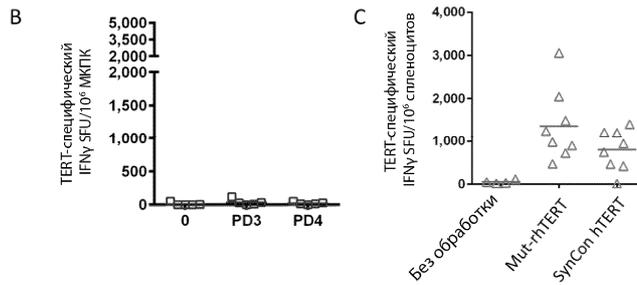
Фиг. 22



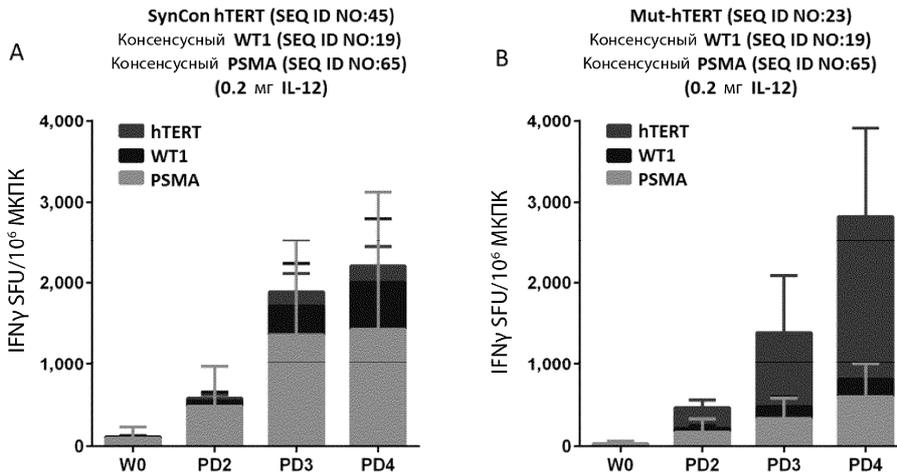
Фиг. 23

Table 1: TERT expression efficiency in different species.

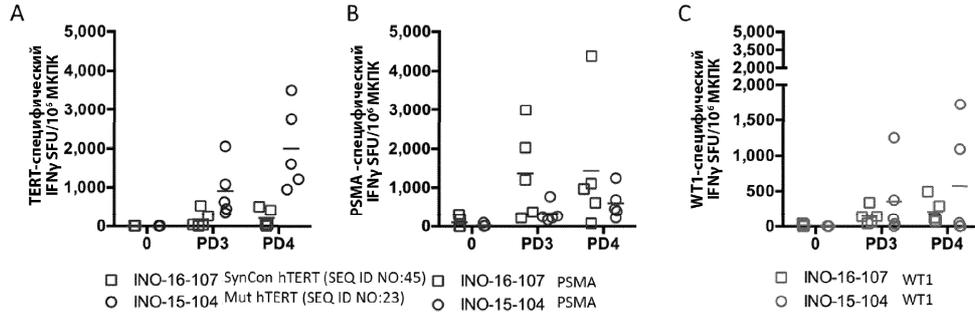
	Мышь	Макака-резус	Человек
Mut-hTERT (pGX1406)	64.2%	95.6%	99.8%
SynCon hTERT (pGX1434)	66.0%	94.6%	95.6%
rhTERT (pGX1441)		100%	



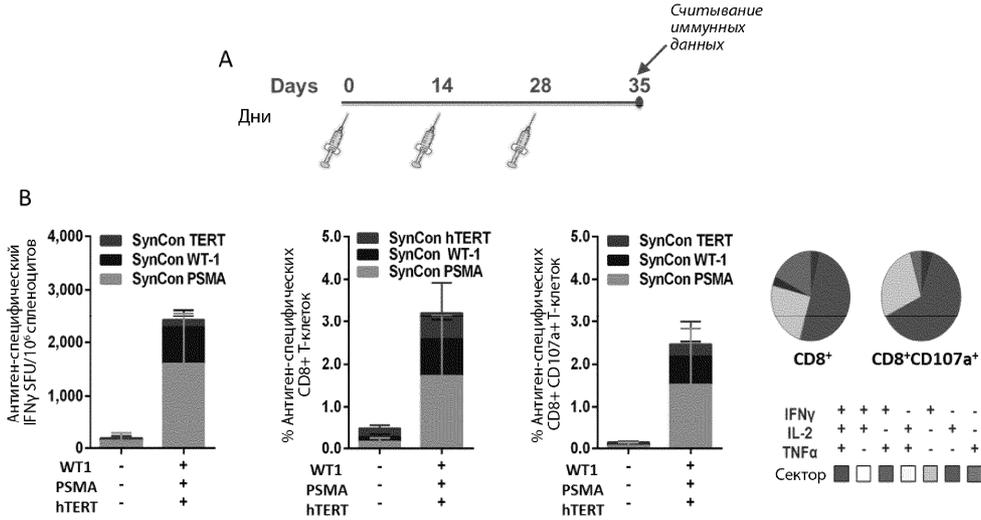
Фиг. 24



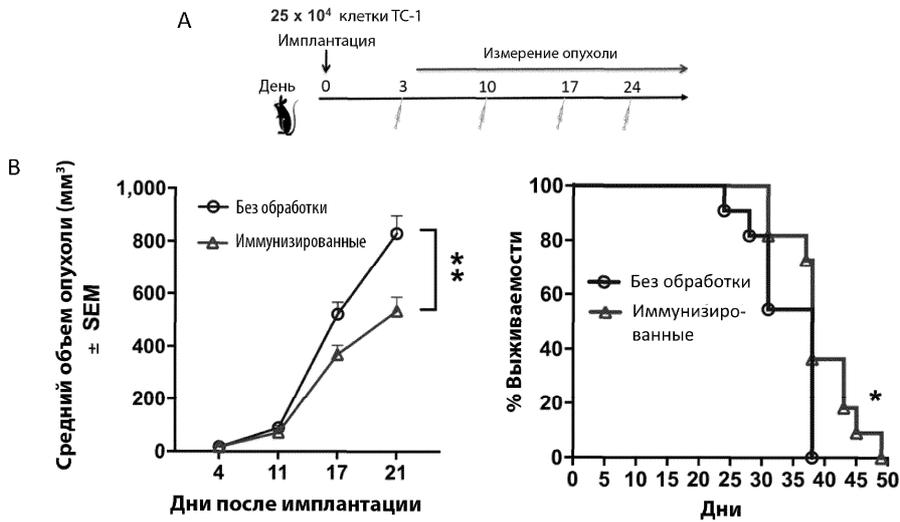
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28

