

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 026926

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2017.05.31

(51) Int. Cl. C07H 15/24 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201491171

(22) Дата подачи заявки  
2012.12.11

---

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ УЛУЧШЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ IL-12, ВАКЦИНЫ, ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

---

(31) 61/569,600

(56) US-A1-20030181405  
US-B1-8026223  
US-A-6096869  
WO-A2-2008089144

(32) 2011.12.12

(33) US

(43) 2014.09.30

(86) PCT/US2012/069017

(87) WO 2013/090296 2013.06.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:  
Уэйнер Дэвид Б., Морроу Мэттью П.,  
Янь Цзянь (US)

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

---

(57) В изобретении представлены молекулы нуклеиновых кислот и композиции, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент. Описаны также молекулы нуклеиновых кислот, дополнительно содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген. Предложены способ модулирования иммунного ответа и способы индуцирования иммунного ответа против иммуногена. Приведены также способы проведения вакцинации с терапевтической и профилактической целями.

---

B1

026926

026926

B1

### Область изобретения

Данное изобретение относится к улучшенным генетическим конструкциям, кодирующим интерлейкин-12 (IL-12) человека и молекулы нуклеиновых кислот, содержащие его последовательность. Данное изобретение также относится к улучшенным векторам экспрессии, вакцинам и иммунотерапевтическим составам, включающим нуклеотидные последовательности, кодирующие IL-12 человека, а также способы их применения.

### Предпосылки создания изобретения

Применение иммунотерапии касается модулирования иммунного ответа пациента для получения желаемого терапевтического ответа. Иммунотерапевтические препараты относятся к таким композициям, которые при назначении пациенту обеспечивают модуляцию иммунной системы пациента в степени, достаточной для снижения в перспективе проявления симптомов, связанных с нежелательными иммунологическими реакциями или, в конечном счете, для облегчения симптомов путем увеличения благоприятных иммунологических реакций. В некоторых случаях иммунотерапия является частью протокола вакцинации, при котором пациенту назначают вакцину, передающую пациенту иммуноген, против которого организм пациента генерирует иммунный ответ. В таких случаях иммунотерапевтические средства повышают иммунный ответ и/или избирательно улучшают тип этого ответа (такой как клеточный или гуморальный тип иммунного ответа), который способствует лечению или предотвращению развития патологического состояния, инфекции или заболевания.

При разработке вакцин было установлено, что вакцины, обеспечивающие синтез антигенов-мишеней в клетках вакцинированных людей, являются эффективными при индукции клеточного типа ответа иммунной системы. В частности, каждая из живых аттенуированных вакцин, рекомбинантных вакцин, в которых используются авирулентные векторы и ДНК-вакцины, приводит к продукции антигенов в клетках вакцинированных пациентов, что в результате обеспечивает индуцирование клеточного типа ответа иммунной системы. С другой стороны, убитые или инактивированные вакцины и субъединичные вакцины, которые состоят только из белков, не индуцируют надлежащих клеточных иммунологических реакций, тем не менее, они действительно индуцируют эффективный гуморальный ответ.

Получение клеточного иммунного ответа часто является необходимым для обеспечения защиты от патогенной инфекции и для обеспечения эффективной иммуно-опосредованной терапии для лечения патогенной инфекции, раковых или аутоиммунных заболеваний. Следовательно, часто предпочтительным является применение вакцин, которые обеспечивают продукцию антигенов-мишеней в клетках вакцинированных пациентов, такие как живые аттенуированные вакцины, рекомбинантные вакцины, в которых используются авирулентные векторы и ДНК-вакцины.

Существует необходимость в разработке подходов для вакцинирования, которые способны создавать у людей сильный Т- и В-клеточный иммунитет. Недавние опасения, связанные с аттенуированием, сложностями производства вакцин, серологической интерференцией, которые наблюдали при проведении клинического исследования STEP лечения ВИЧ (HIV), среди массы других проблем приводят к недооценке этого важного вопроса. При использовании в качестве моделей нечеловекообразных приматов и при проведении клинических испытаний на людях простые плазмидные ДНК, использованные как платформа для получения вакцин, не приводили к индукции уровней иммуногенности, достаточных для того, чтобы поддержать предпринятые усилия их коммерческих разработок. При прямом сравнительном исследовании некоторые вакцины, основанные на чистых плазидах, не обеспечили индуцирование клеточного или гуморального ответа по сравнению с ответом, который индуцировали их аналоги на основе вирусных векторов, включая обычно используемую платформу на основе аденовируса, серотипа 5 (Ad5).

Разработка технологии получения ДНК вакцин как отдельно стоящего метода вакцинации, а также их использования в действующих платформах для прайм-буст вакцин, принесет преимущество при разработке подходов для повышения их иммунной активности. Сообщалось, что манипуляции с кодонами и кодирующими РНК-последовательностями, а также изменения лидерных последовательностей усиливали экспрессию иммуногенов, которые кодировались плазидами. В дополнение этого, предпринимаются попытки создания консенсусных иммуногенов, которые направлены на потребности расширения спектра иммунологического охвата, принимая во внимание в частности разнообразие вирусов.

Кроме того, внедряются другие стратегии, которые фокусируются на улучшении физической доставки ДНК-плазмид путем улучшения рецептуры лекарственных средств и применения аппаратно-управляемых технологий. Как сообщалось, ДНК-вакцины, доставленные с помощью электропорации (ЭП), усилили антиген-специфическую продукцию интерферона-гамма (IFN $\gamma$ ) после иммунизации макаков резус с помощью плазмидных ДНК.

Другой важной областью этого специального исследования является тот факт, что совместная доставка молекулярных адъювантов, кодированных плазидами, привела к увеличению индуцированных вакцинами ответов. Одним из наилучше охарактеризованных молекулярных адъювантов у нечеловекообразных приматов является IL-12 - Т<sub>H</sub>1-поляризующий цитокин, который стимулирует реакции цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), обеспечивая передачу "третьего сигнала", необходимого для эффективной активации и антиген-специфического развития первичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Молекула IL-12 представляет собой гомодимер, который содержит две субъединицы: p35 и p40. Было показано, что он явля-

ется цитокином с наиболее впечатляющим спектром повышения активности иммунной системы, особенно для стимулирования CD8 Т-клеток при его использовании как ДНК-вакцины. В исследовании на макаках было показано, что IL-12 был адъювантом, проявившим высокую активность для расширения интенсивности клеточного иммунного ответа ДНК-вакцин, направленного против многих антигенов. Как в случае применения для макак, так и для людей такой адъювант ДНК-вакцин может значительно улучшить иммунные реакции, индуцированные ДНК-вакцинами.

Патент США № 5723127, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, раскрывает информацию об IL-12 как об адъюванте вакцин. Заявка на РСТ (Договор о патентной кооперации) № РСТ/US1997/019502 и соответствующая заявка США серийный № 08/956865, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, раскрывает информацию о ДНК-вакцинах и ДНК-конструкциях, содержащих кодирующие IL-12 последовательности.

Сохраняется необходимость улучшения вакцин и иммунотерапевтических препаратов. Существует потребность в композициях и способах, обеспечивающих усиление иммунных реакций. Аналогично, если некоторые иммунотерапевтические средства полезны для модулирования иммунного ответа у пациентов, сохраняется необходимость улучшения иммунотерапевтических композиций и способов их использования. Сохраняется необходимость улучшения конструкций, которые кодируют IL-12 и могут использоваться как часть подходов при применении ДНК-вакцин. Сохраняется необходимость улучшения конструкций, которые кодируют IL-12 и могут использоваться как иммунотерапевтические препараты. Сохраняется необходимость улучшения конструкций, которые кодируют IL-12 и могут использоваться для достижения высоких уровней экспрессии IL-12.

#### **Краткое описание изобретения**

Предложены композиции, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р40 IL-12 или ее функциональный фрагмент. Последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют субъединицу р35 IL-12, могут быть по меньшей мере на 98% гомологичны последовательности SEQ ID № 1 и кодировать белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 2. Последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, могут быть фрагментами последовательности нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на 98% гомологичны последовательности SEQ ID № 1 и кодируют белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту последовательности SEQ ID № 2. Последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют субъединицу р40 IL-12, могут быть по меньшей мере на 98% гомологичны последовательности SEQ ID № 3 и кодировать белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 4. Последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, могут быть фрагментами последовательности нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на 98% гомологичны последовательности SEQ ID № 3 и кодируют белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту последовательности SEQ ID № 4. Вещества могут дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуноген.

Предложен также способ модулирования иммунного ответа. Этот способ включает стадию назначения пациенту состава, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р40 IL-12 или ее функциональный фрагмент.

Предложен также способ индуцирования иммунного ответа против иммуногена. Этот способ включает стадию назначения пациенту состава, который кодирует субъединицу р35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р40 IL-12 или ее функциональный фрагмент, в комбинации с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуноген в достаточном количестве. Эти способы индуцирования иммунного ответа против иммуногена могут быть частью способов индуцирования терапевтического иммунного ответа или способов индуцирования профилактического иммунного ответа.

#### **Краткое описание графического материала**

Фиг. 1А и 1В иллюстрируют графики сравнения уровней экспрессии в клетках IL-12 человека (HuIL12) после трансфекции с помощью генетических конструкций в количестве 2 мкг HuIL12-opt (оптимальной) или HuIL12-nonopt (неоптимальной) (фиг. 1А) или в количестве 4 мкг HuIL12-opt или HuIL12-nonopt (фиг. 1В).

Фиг. 2 иллюстрирует увеличение специфических клеточных иммунных реакций на антигены PSA (специфический антиген простаты) и PSMA (простатический специфический мембранный антиген) у макак резусов.

Фиг. 3 иллюстрирует увеличение специфических клеточных иммунных реакций на коровый и поверхностный антигены вируса гепатита В (ВГВ) у макак резусов.

#### **Подробное описание предпочтительного осуществления изобретения**

В одном из аспектов изобретения желательно, чтобы улучшенные конструкции IL-12 обеспечивались средствами для улучшенной транскрипции и трансляции, включая наличие одного или большего

количества следующих элементов: низкое содержание нуклеотидов GC в лидерной последовательности для усиления транскрипции, стабилизация мРНК и оптимизация кодонов, удаление, насколько возможно, цис-активных фрагментов последовательности (например, внутренних ТАТА-боксов).

В некоторых аспектах изобретения в схему вакцинации желательно включить улучшенные конструкции IL-12 или как часть состава вакцины или как отдельный состав, вводимый согласованно с вакциной для того, чтобы создать расширенный иммунный ответ против антигенов вакцины. В некоторых аспектах изобретения желательно использование улучшенных конструкций IL-12 как иммунотерапевтических средств, которые могут быть использованы для модулирования у пациентов иммунных реакций. В некоторых аспектах изобретения желательно обеспечить использование улучшенных конструкций IL-12 для того, чтобы обеспечить экспрессию векторов, которые могут быть использованы для получения высоких уровней экспрессии IL-12.

В данной заявке приводятся высокоактивные генные адъюванты IL-12. Эти новые адъюванты обладают несколькими преимуществами перед предыдущими молекулами IL-12. Улучшенная лидерная последовательность способствует секреции молекул, а также обеспечивает улучшение загрузки рибосом, таким образом, расширяется влияние этих адъювантов и усиливается экспрессия. Значительные изменения последовательностей РНК впоследствии удаляют гомологию синтезированных белков к природным последовательностям IL-12, таким образом, предотвращая интерференцию между вводимым адъювантом и иммунной системой хозяина, а также снижая возможные разрушительные взаимодействия между последовательностями IL-12 хозяина и доставляющими гены молекулами. Более того, высокая активность новых конструкций снижает требуемые дозы, что, таким образом, благоприятно сказывается на вопросах производства и обеспечения введения, связанных с такими адъювантами. Наконец, так как такие молекулы имеют более высокую биологическую активность, то они улучшают показатели эффективности вакцины при применении *in vivo*. В общей сложности эти конструкции являются важными новыми инструментами, как для вакцинации, так и для применения для иммунотерапии.

#### Определения.

Терминология, использованная в этой заявке, применяется только с целью описания особых вариантов осуществления изобретения и не претендует на исчерпывающее описание. Как принято в описании и приложенных пунктах формулы изобретения, единственные формы слов включают множество определяемых объектов, если только в контексте четко не указано иное.

При перечислении в настоящей заявке числовых диапазонов каждое промежуточное число, находящееся в них имеет такую степень точности как явно предусмотрено. Например, для диапазона 6-9, числа 7 и 8 подразумеваются как дополняющие 6 и 9. И 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 являются явно предусмотренными.

#### Адъювант.

"Адъювант", как используется в этой заявке, может означать молекулу, включая молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, обладающий иммуномодулирующей активностью, добавляемый к ДНК-плазмидным или другим вакцинам для усиления иммуногенных свойств одного или более антигенов, кодируемых ДНК-плазмидами или вакцинами и последовательностями нуклеиновых кислот, которые кодируют адъюванты белок, описанный в дальнейшем в этой заявке.

#### Антитело.

"Антитело" может обозначать антитела классов IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или их фрагменты, фрагменты или их производные, включая Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и одноцепочечные антитела, димеры антител, биспецифические антитела, бифункциональные антитела и их производные. Это антитело может быть антителом, изолированным из образца сыворотки млекопитающего, поликлональным антителом, аффинно-очищенным антителом или их смесью, которые проявляют достаточную специфичность связывания необходимого эпитопа, или последовательностью, из которой оно походит.

#### Кодирующая последовательность.

"Кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота" при использовании в этой заявке подразумевают нуклеиновую кислоту (молекула РНК или ДНК), которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Эта кодирующая последовательность может дополнительно содержать сигналы инициации и терминации, функционально присоединенные к регуляторным элементам, включающим промотор и сигнал полиаденирования, отвечающие за направление экспрессии в клетках человека или млекопитающих, которым назначается эта нуклеиновая кислота.

#### Комплементарность.

"Комплементарность" или "комплементарный", используемые в этой заявке, обозначают правила образования пар оснований между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот как предложено Уотсоном-Криком (например, А-Т/У и С-Г) и Хугстином.

#### Постоянный ток.

"Постоянный ток" используется в этой заявке для обозначения тока, который получают или которому подвергаются ткани или клетки, обозначающие указанные ткани, в течение длительности электрического импульса, передаваемого такой ткани. Электрический импульс поступает из устройств для электропорации, описанных в настоящей заявке. В течение продолжительности электрического импульса

этот ток сохраняет постоянную силу для указанных тканей, потому что предложенное в данной заявке устройство для электропорации обладает элементом обратной связи, преимущественно обеспечивающем постоянную обратную связь. Элемент обратной связи может измерять сопротивление тканей (или клеток) на протяжении длительности импульса и обуславливает изменение выходной электрической мощности устройства для электропорации (например, увеличением напряжения). Таким образом, сила электрического тока в этой ткани остается постоянной в продолжение электрического импульса (порядка микросекунд) или от импульса к импульсу. В некоторых вариантах осуществления изобретения элемент обратной связи включает контроллер.

"Ток обратной связи" или "обратная связь".

"Ток обратной связи" или "обратная связь", как используется в настоящей заявке, применяются взаимозаменяемо и обозначают активный отклик предложенных устройств для электропорации, который включает измерение силы тока между электродами в ткани и изменение выходной мощности, подаваемой устройством для ЭП соответственно для того, чтобы поддерживать силу тока на постоянном уровне. Перед началом подачи последовательности импульсов или лечения с помощью электричества этот постоянный уровень силы тока устанавливается пользователем. Обратная связь осуществляется компонентом для электропорации, например, контроллером, устройства для электропорации, так как электрический контур в нем способен постоянно проводить мониторинг электрического тока между электродами в ткани и сравнивать наблюдаемую силу тока (или ток в ткани) с предустановленной силой тока и постоянно проводить регулирование выходной мощности для поддержания наблюдаемой силы тока на предустановленных уровнях. Петля обратной связи может реагировать немедленно, так как является аналоговой обратной связью с закрытым контуром.

Децентрализованный ток.

"Децентрализованный ток" используется в настоящей заявке для обозначения набора электрических токов подаваемых из различных решеток игольчатых электродов устройств для электропорации, описанных в настоящей заявке, в отношении которых эти наборы минимизируют, или предпочтительнее ликвидируют, появления при электропорации соответствующего теплового стресса на каком-либо участке ткани, подвергаемого электропорации.

Электропорация.

"Электропорация" (ЭП), "электропермеабиллизация" или "электрокинетическое усиление" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и касаются использования трансмембранного импульса электрического поля для индуцирования микроскопических проходов (пор) в биомембране. Их присутствие позволяет таким биомолекулам как плазмиды, олигонуклеотиды, миРНК (siRNA), лекарственным препаратам, ионам и воде проходить с одной стороны клеточной мембраны на другую.

Механизм обратной связи.

"Механизм обратной связи", используемый в настоящей заявке, относится к процессу, выполняемому или программным обеспечением, или аппаратными средствами (или программно-аппаратными средствами), которые обрабатывают процессы получения и сравнения значений импеданса интересующих тканей (перед, во время и/или после получения импульса энергии) с данным значением, преимущественно силы тока, и регулируют импульс энергии, подаваемый для получения предустановленного значения. Механизм обратной связи может быть выполнен петлей с аналоговым закрытым контуром.

Фрагмент.

"Фрагмент", как используется в настоящей заявке, обозначает часть нуклеиновой кислоты или нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептид, обладающий свойством вызывать иммунный ответ у млекопитающих в основном подобный тому, что вызывает нефрагментированная молекула. Фрагментами могут быть ДНК-фрагменты, выбранные из фрагментов последовательности SEQ ID № 1, фрагментов последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98% гомологична последовательности SEQ ID № 1 и кодирует функциональные фрагменты белка, который по меньшей мере на 98% гомологичен последовательности SEQ ID № 2; фрагментов последовательности SEQ ID № 3 и фрагментов последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 98% гомологична последовательности SEQ ID № 3 и кодирует функциональные фрагменты белка, который по меньшей мере на 98% гомологичен последовательности SEQ ID № 4.

ДНК-фрагменты последовательности SEQ ID № 1, фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на 98% гомологичны последовательности SEQ ID № 1 и кодируют функциональные фрагменты белка, который по меньшей мере на 98% гомологичен последовательности SEQ ID № 2, способной кодировать полипептиды длиной 50 или более, 55 или более, 60 или более, 65 или более, 70 или более, 75 или более, 80 или более, 85 или более, 90 или более, 95 или более, 100 или более, 105 или более, 110 или более, 115 или более, 120 или более, 125 или более, 130 или более, 135 или более, 140 или более, 145 или более, 150 или более, 155 или более, 160 или более, 165 или более, 170 или более, 175 или более, 180 или более, 185 или более, 190 или более, 195 или более, 200 или более, 205 или более, 210 или более, 215 или более аминокислот последовательности SEQ ID № 2 или белок, который по меньшей мере на 98% гомологичен последовательности SEQ ID № 2. ДНК-фрагменты последовательности SEQ ID № 1, фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на

- 5 -

изобретения предлагаются фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99% гомологична последовательности SEQ ID № 3 и кодирует функциональные фрагменты белка, который по меньшей мере на 99% гомологичен последовательности SEQ ID № 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагаются фрагменты последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 99% гомологична последовательности SEQ ID № 3 и кодирует функциональные фрагменты последовательности SEQ ID № 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагменты являются фрагментами последовательности SEQ ID № 3, которые кодируют функциональные фрагменты последовательности SEQ ID № 4.

ДНК-фрагменты могут не содержать кодирующих последовательностей для сигнального пептида IL-12. ДНК-фрагменты могут включать кодирующие последовательности сигнальных пептидов иммуноглобулинов таких как последовательности сигнальных пептидов IgE или IgG. Так, например ДНК-фрагменты, которые кодируют субъединицу p35 IL-12 не кодируют аминокислоты 1-22 последовательности SEQ ID № 2, и в некоторых таких вариантах осуществления изобретения могут включать последовательности, кодирующие сигнальные пептиды иммуноглобулинов, такие как последовательность сигнальных пептидов IgE (SEQ ID № 5) или IgG.

"Фрагмент" также может относиться к полипептидным фрагментам, способным в основном функционировать подобно полноразмерным полипептидам. Фрагмент p35 IL-12 может быть фрагментом последовательности SEQ ID № 2 или фрагментом полипептида, который по меньшей мере на 98% гомологичен фрагменту последовательности SEQ ID № 2. Фрагмент p35 IL-12 может быть фрагментом полипептида, который по меньшей мере на 99% гомологичен фрагменту последовательности SEQ ID № 2. Фрагмент p35 IL-12 может быть фрагментом описанных выше пептидов. Фрагмент p40 IL-12 может быть фрагментом последовательности SEQ ID № 4 или фрагментом полипептида, который по меньшей мере на 98% гомологичен фрагменту последовательности SEQ ID № 4. Фрагмент p40 IL-12 может быть фрагментом полипептида, который по меньшей мере на 99% гомологичен фрагменту последовательности SEQ ID № 4. Фрагмент p40 IL-12 может быть фрагментом описанных выше полипептидов.

"Функциональный фрагмент" по значению относится к фрагменту субъединицы IL-12, который меньше полной последовательности p35 и/или меньше полной последовательности p40, которые в основном могут функционировать подобно полноразмерным субъединицам p35 или p40. Такие в основном схожие функции включают взаимодействие с другими белками, субъединицами или рецепторами в значительной степени таким же образом, как и полноразмерные субъединицы p35 или p40 при доставке таким способом, что позволяет образовывать гетеродимеры, которые в результате приводят к в основном таким же эффектам, как и гетеродимер p35/p40 IL-12.

Генетическая конструкция.

Термин "генетическая конструкция" используется в настоящей заявке касательно ДНК- или РНК-молекул, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или обе субъединицы IL-12 или белок-мишень или другой (не IL-12) иммуномодулирующий белок. Эта кодирующая последовательность содержит сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, включающими промотор и сигнал полиаденирования, отвечающие за направление экспрессии в клетках пациентов, которым назначается эта молекула нуклеиновой кислоты.

Гиперпролиферативный.

Как используется в настоящей заявке, термин "гиперпролиферативные заболевания" означает отношение к тем заболеваниям и расстройствам, которые характеризуются гиперпролиферацией клеток, а термин "связанный с гиперпролиферативностью белок" означает отношение к белкам, связанным с гиперпролиферативными заболеваниями.

Идентичный.

"Идентичный" или "идентичность" в настоящей заявке используются в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей и обозначают то, что последовательности имеют определенное процентное содержание остатков, которые совпадают на определенном участке. Процентное содержание может рассчитываться путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнивая две производительности на определенном участке, определяя количество положений, в которых встречаются идентичные остатки в обеих последовательностях для получения количества совпавших положений, разделяя количество совпавших положений на общее количество положений на определенном участке и умножая результат на 100, получают процентное значение идентичности последовательности. В случаях, когда две последовательности являются различными по длине или при выравнивании получается один или более смещенных концов, а определенный участок для сравнения включает только одну последовательность, то остатки одной последовательности вносятся в знаменатель, но не в числитель этого уравнения. При сравнении ДНК и РНК основания тимин (Т) и урацил (У) могут считаться эквивалентными. Проверка на идентичность может выполняться вручную или с использованием компьютерного алгоритма сравнения последовательностей, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Импеданс.

"Импеданс", как используется в настоящей заявке, может применяться при обсуждении механизма обратной связи и может быть переведен в значение силы тока согласно закону Ома, таким образом, по-

лучают сравнение с предустановленным значением силы тока.

Иммунный ответ (иммунная реакция).

"Иммунный ответ", как используется в настоящей заявке, обозначает активацию иммунной системы организма-хозяина, например млекопитающего, в ответ на введение одного или более консенсусного антигена вируса саркомы Рауса (RSV) путем использования ДНК-плазмидных вакцин. Иммунный ответ может быть в виде клеточного или гуморального ответа или их обоих.

Внутриклеточный патоген.

"Внутриклеточный патоген", как используется в настоящей заявке, обозначает отношение к вирусу или патогенному организму, которые по меньшей мере в части своей репродукции или жизненного цикла обитают в клетке хозяина и там продуцируют или обуславливают продукцию патогенных белков.

Нуклеиновая кислота.

"Нуклеиновая кислота", или "олигонуклеотид", или "полинуклеотид", как используется в настоящей заявке, обозначает по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанные вместе. Описание одной цепи также определяет последовательность комплементарной цепи. Поэтому нуклеиновая кислота также включает комплементарную цепь описанной одной цепи. Много вариантов нуклеиновой кислоты могут использоваться с такой же целью, как и данная нуклеиновая кислота. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает в основном идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные последовательности. Одноцепочечные кислоты могут быть зондами для гибридизации с последовательностью-мишенью в строгих условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также включает зонд, который участвует в гибридизации в строгих условиях.

Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными или могут содержать участки двухцепочечных и одноцепочечных последовательностей. Нуклеиновые кислоты могут быть в виде ДНК, геномной и комплементарной (кДНК), РНК или гибридными, когда нуклеиновые кислоты содержат комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов и комбинации оснований, включая урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты могут быть получены методами химического синтеза или рекомбинантными методами.

Функционально связанный.

"Функционально связанный", как используется в настоящей заявке относительно гена, функционально присоединенного к промотору, и касается связывания двух компонентов так, чтобы происходила экспрессия этого гена под контролем промотора, с которым он пространственно соединен. Промотор может быть расположен на 5' (восходящем) или 3' (нисходящем) конце гена, находящегося под его контролем. Расстояние между промотором и геном приблизительно может быть таким же, как расстояние между тем промотором и подконтрольным ему геном в гене, из которого получен этот промотор. Как известно в данной области знаний, варьирование этого расстояния может происходить без потери функционирования промотора. Касательно сигнального пептида, функционально связанного с белком, этот термин относится к белку, несущему сигнальный пептид, составляющий часть этого белка таким образом, чтобы он мог функционировать как сигнальный пептид. В отношении кодирующей последовательности, которая кодирует сигнальный пептид, функционально связанный с кодирующей белок последовательностью, этот термин относится к кодирующей последовательности составленной так, что трансляция кодирующей последовательности приводит к синтезу белка, несущего сигнальный пептид, составляющий часть этого белка таким образом, чтобы он мог функционировать как сигнальный пептид.

Промотор.

"Промотор", как используется в настоящей заявке, обозначает синтетическую молекулу или молекулу природного происхождения, которая обладает свойствами передавать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может включать один или более специфических транскрипционных регуляторных последовательностей для дополнительного усиления экспрессии и/или для изменения пространственного характера экспрессии и/или временного характера экспрессии той же последовательности. Промотор также может включать дистальные энхансерные (усилительные) или репрессорные элементы, которые могут быть расположены на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от сайта инициации транскрипции. Промотор может быть получен из разных источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомые и животные. Промотор может регулировать экспрессию генных компонентов конститутивно или дифференциально в отношении клетки, ткани или органа, в которых происходит экспрессия, относительно стадии развития, в которой происходит экспрессия или в ответ на внешние воздействия, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие агенты. Репрезентативные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, лактозный (lac) оператор-промотор, составной (tac) промотор, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранний или поздний промотор SV40 и промотор CMV IE.

Строгие условия гибридизации.

"Строгие условия гибридизации", как используется в настоящей заявке, обозначают условия, в которых первая последовательность нуклеиновой кислоты (например, зонд) будет гибридизироваться со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, мишенью), такие условия как сложная



смесь нуклеиновых кислот. Строгие условия зависят от типа последовательности и будут отличаться в разных обстоятельствах. Строгие условия могут быть выбраны такими, когда температура примерно на 5-10°C ниже температуры точки плавления ( $T_m$ ) специфической последовательности при определенной ионной силе и pH раствора.  $T_m$  может быть температурой (при определенной ионной силе раствора, pH и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% оснований комплементарны мишени гибридизируемой с последовательностью-мишенью в условиях равновесия (так как последовательности-мишени присутствуют в избытке, при  $T_m$  50% зондов связаны в условиях равновесия). Строгие условия могут быть такими, при которых концентрация солей является менее чем примерно 1,0М раствор ионов натрия, такой как примерно 0,01-1,0М концентрация раствора ионов натрия (или других солей) при pH 7,0-8,3 и при температуре по меньшей мере около 30°C для коротких зондов (например, примерно 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере около 60°C для длинных зондов (например, более чем примерно 50 нуклеотидов). Строгих условий также можно достичь добавлением дестабилизирующего агента, такого как формальдегид. Для избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал может по меньшей мере превосходить в 2-10 раз фоновый сигнал при гибридизации. Примерные строгие условия гибридизации могут быть следующими: 50% формамид, 5-кратный (5×) раствор цитрата-хлорида натрия (SSC) и 1%-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS), инкубирование при 42°C или, 5×SSC, 1% SDS, инкубирование при 65°C, с промывкой в 0,2×растворе SSC и 0,1% SDS при 65°C.

В основном комплементарный.

"В основном комплементарный" используется в настоящей заявке для обозначения того, что первая последовательность по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентична по комплементарности второй последовательности на участке 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот или того, что две последовательности гибридизуют в строгих условиях гибридизации.

В основном идентичный.

"В основном идентичный" используется в настоящей заявке для обозначения того, что первая и вторая последовательности по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичны на участке 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более нуклеотидов или аминокислот или в отношении нуклеиновых кислот, если первая последовательность в основном дополняет по комплементарности вторую последовательность.

Белок-мишень.

"Белок-мишень" используется в настоящей заявке в значении, относящемуся к пептидам или белку, которые являются частью вакцин или которые кодируются генными конструкциями ДНК-вакцин, действующие как белки-мишени для иммунного ответа. Термины "белок-мишень" и "иммуноген" используются взаимозаменяемо и касаются белка, против которого может быть получен иммунный ответ. Белок-мишень является иммуногенным белком, который несет по меньшей мере эпитоп белка патогена или нежелательного типа клеток, таких как раковая клетка или клетка, вовлеченная в аутоиммунное заболевание, против которых требуется получить иммунный ответ. Иммунный ответ, направленный против белка-мишени, будет защищать пациента и/или лечить пациента от специфической инфекции или болезни, с которыми связан белок-мишень.

Вариант.

"Вариант", как используется в настоящей заявке в отношении нуклеиновой кислоты, может обозначать: (i) часть или фрагмент референсной нуклеотидной последовательности; (ii) комплементарную последовательность референсной нуклеотидной последовательности или ее части; (iii) нуклеиновую кислоту, которая в основном идентична референсной нуклеотидной последовательности или в основном комплементарна ей; или (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в строгих условиях с референсной нуклеиновой кислотой, комплементарной ей, или с последовательностями, в основном идентичными ей.

"Вариант" в отношении пептида или полипептида, которые отличаются аминокислотной последовательностью по инсерциям, делециям или заменам консервативных аминокислот, но, по крайней мере, сохраняют биологическую активность. Вариант может также обозначать белок с аминокислотной последовательностью, которая в основном идентична референсному белку с аминокислотной последовательностью, который, по крайней мере, сохраняет свою биологическую активность. Замена консервативной аминокислоты, например замещение аминокислоты другой аминокислотой со схожими свойствами (например, гидрофильностью, значением и распределением заряженных участков) в этой области знания, считается типичным получением минорного изменения. Эти минорные изменения могут быть идентифицированы, в частности, учитывая гидропатический индекс аминокислот, как это понимается в этой области знаний: Kyte et al., J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982). Гидропатический индекс аминокислот основан на анализе их гидрофобности и заряда. В этой области знаний известно, что аминокислоты с подобными гидропатическими индексами могут заменяться, и при этом сохраняется функционирование белка. В одном аспекте могут замещаться аминокислоты, обладающие гидропатическими индексами со значениями

$\pm 2$ . Гидрофильность аминокислот также может использоваться для выявления заместителей, которые в результате приведут к сохранению белками биологических функций. Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида допускает расчет наибольшей локальной средней гидрофильности этого пептида, это полезный показатель, о котором сообщалось, что он хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью (патент США № 4554101, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Замены аминокислот, обладающие подобными значениями гидрофильности, могут приводить к получению пептидов, сохраняющих биологическую активность, например иммуногенность, как это понимается в этой области знаний. Замены могут создаваться из аминокислот, обладающих значениями гидрофильности в пределах отклонения значений друг от друга  $\pm 2$ . Особенности боковой цепи таких аминокислот влияют и на индекс гидрофобности и на значение гидрофильности. В соответствии с этим наблюдением замены аминокислот, которые совместимы по биологическим функциям, как полагается, зависят от относительного подобия аминокислот и особенно боковых заместителей этих аминокислот, для которых определяются гидрофобность, гидрофильность, заряд, размер и другие свойства.

Вектор.

"Вектор", как используется в настоящей заявке, обозначает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектором может быть плазмида, бактериофаг, искусственная бактериальная хромосома или искусственная дрожжевая хромосома. Вектор может быть ДНК- или РНК-вектором. Вектор может быть самореплицирующимся внехромосомным вектором или вектором, который интегрируется в геном хозяина.

Интеолейкин-12 (IL-12).

Приводимый в настоящей заявке является синтетической конструкцией, которая кодирует р35 ( $\alpha$ -субъединица) и р40 ( $\beta$ -субъединица) IL-12 человека. Субъединица р35 IL-12 человека (последовательность SEQ ID № 2) представляет собой белок из 219 аминокислот, который включает сигнальный пептид из аминокислот 1-22 и зрелую белковую последовательность в положениях аминокислот 23-219. Субъединица р40 IL-12 человека (последовательность SEQ ID № 4) представляет собой белок из 328 аминокислот, который включает сигнальный пептид из аминокислот 1-22 и зрелую белковую последовательность в положениях аминокислот 23-328. Аминокислоты 40-90 субъединицы р40 IL-12 человека относятся к домену иммуноглобулинов, аминокислоты 125-217 субъединицы р40 IL-12 человека относятся к С-терминальному домену р40 цитокина интерлейкина-12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения субъединица р35 IL-12 кодируется конструкцией, содержащей кодирующую последовательность на одной плазмиде, а субъединица р40 IL-12 кодируется конструкцией, содержащей кодирующую последовательность на разных плаزمиде. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р35 IL-12 последовательность, и конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р40 IL-12 последовательность, находятся в одной и той же плазмиде, но каждая конструкция обладает своим собственным промотором. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р35 IL-12 последовательность, и конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р40 IL-12 последовательность, находятся в одной и той же плазмиде под контролем одного промотора и разделены последовательностью IRES. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р35 IL-12 последовательность, и конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р40 IL-12 последовательность, находятся в одной и той же плазмиде под контролем одного промотора и разделены кодирующей последовательностью сайта протеолитического расщепления. В некоторых вариантах осуществления изобретения конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р35 IL-12 последовательность, и конструкция, содержащая кодирующую субъединицу р40 IL-12 последовательность, находятся в одной и той же плазмиде под контролем одного промотора и субъединицы разделены линкером, который позволяет им быть активными в виде одной белковой цепи.

Последовательности HuIL12-opt - это оптимизированные последовательности, кодирующие субъединицы IL-12 человека. Такие последовательности обладают пониженной гомологичностью с геномом хозяина для того, чтобы изменить структуру РНК и избежать регуляции последовательностей при раскодировании. Эти последовательности обеспечивают улучшенную стабильность и экспрессию мРНК.

Последовательность HuIL12-opt является кодирующей последовательностью, которая кодирует субъединицу р35 IL-12, и описана как последовательность SEQ ID № 1. Последовательность HuIL12-opt является кодирующей последовательностью субъединицы р35 IL-12 из 219 аминокислот, тем самым описанной как последовательность SEQ ID № 2. Аминокислоты 1-22 соответствуют сигнальному пептиду. Аминокислоты 23-219 соответствуют участку зрелого белка.

Последовательность HuIL12-opt является кодирующей последовательностью, которая кодирует субъединицу р40 IL-12, описанную как последовательность SEQ ID № 3. Последовательность HuIL12-opt является кодирующей последовательностью субъединицы р40 IL-12 из 328 аминокислот, тем самым описанной как последовательность SEQ ID № 4. Аминокислоты 1-22 соответствуют сигнальному пептиду IL-12, а аминокислоты 23-328 составляют зрелый белок. Аналогичные последовательности IL-12 макаки

резус и являются последовательностями RhIL12-opt, которые представляют собой оптимизированные последовательности, кодирующие субъединицы IL-12 макаки резус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальный пептид IL-12 субъединиц p35 или p40 IL-12 или их обоих может быть замещен отличающимся сигнальным пептидом, таким как другой сигнальный пептид иммуноглобулинов, например IgG или IgE (SEQ ID № 5). Кодирующие последовательности, которые кодируют сигнальный пептид IL-12 субъединиц p35 или p40 IL-12 или их обоих может быть замещен кодирующими последовательностями, которые кодируют отличающийся сигнальный пептид, такой как другой сигнальный пептид иммуноглобулинов, например IgG или IgE (являются кодирующими последовательностями, которые кодируют последовательность SEQ ID № 5). В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальный пептид субъединицы p35 IL-12 может быть замещен отличающимся сигнальным пептидом, таким как другой сигнальный пептид иммуноглобулинов, например IgG или IgE (SEQ ID № 5). Функциональные фрагменты последовательности SEQ ID № 2 могут не содержать сигнальных пептидных последовательностей IL-12 p35. В некоторых вариантах осуществления изобретения кодирующая последовательность, которая кодирует сигнальный пептид p35 IL-12, может быть замещена кодирующей последовательностью отличающегося сигнального пептида, такой как кодирующая последовательность другого сигнального пептида иммуноглобулинов, например кодирующая последовательностью сигнального пептида IgG или IgE (т.е. кодирующей последовательностью, которая кодирует SEQ ID № 5). Последовательности нуклеиновых кислот, являющиеся фрагментами SEQ ID № 1, могут не содержать кодирующих последовательностей сигнального пептида p35 IL-12.

Функциональные фрагменты последовательности SEQ ID № 4 могут не содержать сигнальных пептидных последовательностей IL-12 p40. В некоторых вариантах осуществления изобретения кодирующая последовательность, которая кодирует сигнальный пептид p40 IL-12, может быть замещена кодирующей последовательностью отличающегося сигнального пептида, такого как кодирующая последовательность другого сигнального пептида иммуноглобулинов, например кодирующая последовательность сигнального пептида IgG или IgE (т.е. кодирующей последовательностью, которая кодирует SEQ ID № 5). Последовательности нуклеиновых кислот, являющиеся фрагментами последовательности SEQ ID № 3, могут не содержать кодирующих последовательностей сигнального пептида p40 IL-12. При расчете гомологии по отношению к последовательности SEQ ID № 1 или SEQ ID № 3 кодирующих последовательностей, которые не кодируют соответственно сигнальный пептид p35 IL-12 или сигнальный пептид p40 IL-12, расчет основывается на сравнении с последовательностью SEQ ID № 1 или SEQ ID № 3, за исключением части SEQ ID № 1, которая кодирует сигнальный пептид p35 IL-12, или части SEQ ID № 3, которая кодирует сигнальный пептид p40 IL-12.

#### Плаزمиды.

Приводимая в настоящей заявке является вектором, который способен экспрессировать конструкции IL-12 в клетках млекопитающих в количестве эффективном для модулирования иммунного ответа у млекопитающих. Каждый вектор может включать гетерологическую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или обе субъединицы. Этот вектор может быть плазмидой. Эта плаزمиды может быть использована для трансфекции клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей IL-12, которая трансформирует клетки хозяина в условиях культивирования и поддержания культуры, при которых происходит экспрессия IL-12.

Эта плазмиды может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более антигенов. Эта плазмиды может дополнительно содержать иницирующий кодон, который может находиться на восходящей кодирующей последовательности и стоп-кодон, который может находиться на нисходящей кодирующей последовательности. Кодон инициации и терминации могут находиться в рамках кодирующей последовательности.

Эта плазмиды может также содержать промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью. Этот промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью, может быть промотором обезьяньего вируса 40 (SV40), промотором вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотором вируса иммунодефицита человека (HIV), а также вируса бычьего иммунодефицита (BIV), промотором с длинным концевым повтором (LTR), промотором вируса Молони, промотором вируса лейкоза птиц (ALV), промотором цитомегаловируса (CMV), таким как непосредственный ранний промотор CMV, промотором вируса Эпштейн-Барр (EBV) или промотором вируса саркомы Рауса (RSV). Этот промотор также может быть промотором человеческого гена, такого как кодирующий человеческий актин, человеческий миозин, человеческий гемоглобин, человеческий мышечный креатин или человеческий металотионенин. Этот промотор также может быть тканеспецифическим промотором, таким как специфический промотор мышц или кожи, природным или синтетическим. Примерами таких промоторов описаны в публикации патентной заявки США № US 20040175727, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Эта плазмиды также может дополнительно содержать сигнал полиаденилирования, который может находиться на нисходящей кодирующей последовательности. Сигнал полиаденилирования может быть сигналом полиаденилирования SV40, сигналом полиаденилирования LTR, сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигналом полиаденилирования человеческого гормона роста (hGH)

или сигналом полиаденилирования человеческого  $\beta$ -глобина. Сигнал полиаденилирования SV40 может быть сигналом плазмиды pCER4 (Invitrogen, San Diego, CA).

Эта плазида может дополнительно содержать энхансер в восходящем направлении кодирующей последовательности. Энхансер может быть энхансером человеческого актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина или вирусным энхансером - одним из CMV, FMDV, RSV или EBV. Полинуклеотидные функционирующие энхансеры описаны в патентах США №№ 5593972, 5962428 и WO 94/016737, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок.

Эта плазида также может содержать точку начала репликации для того, чтобы поддерживать плазмиду внехромосомно и синтезировать множество копий плазмиды в клетке. Эта плазида может быть плазмидой pVAX1, pCER4 или pREP4 компании Invitrogen (San Diego, CA), которые могут содержать точку начала репликации вируса Эпштейна-Барр или кодирующий участок ядерного антигена EBNA-1, которые могут обеспечивать эписомальную репликацию многих копий без интеграции плазмиды. Основной последовательностью этой плазмиды может быть pAV0242. Эта плазида может быть плазмидой аденовируса типа 5 (Ad5), дефектной к репликации.

Эта плазида также может включать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для генной экспрессии в клетке, в которую вводится плазида. Кодирующая последовательность может содержать кодон, который позволит обеспечить более эффективную транскрипцию кодирующей последовательности в клетке хозяина.

Эта кодирующая последовательность также может содержать лидерную последовательность Ig. Лидерная последовательность может находиться на 5'-конце кодирующей последовательности. Консенсусные антигены, кодируемые этой последовательностью, могут содержать N-терминальную лидерную последовательность Ig перед белком консенсусного антигена. Эта N-терминальная лидерная последовательность Ig может быть последовательностью IgE или IgG.

Эта плазида может быть плазмидой pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая используется для получения белков в бактериях *Escherichia coli* (*E.coli*). Эта плазида также может быть плазмидой pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая используется для получения белков в штаммах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Эта плазида также может быть полной системой экспрессии бакуловируса MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), которая используется для получения белков в клетках насекомых. Эта плазида также может быть ДНК на основе промотора цитомегаловируса (pcDNA) pcDNA I или pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), которые используются для получения белков в клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

#### Вакцина.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения доставка последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует IL-12 или ее функциональные фрагменты, может происходить в комбинации с последовательностями нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуноген для усиления иммунного ответа против этого иммуногена. Когда молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют иммуногены и IL-12, поглощаются клетками пациента, то иммуноген и IL-12 экспрессируются в клетках, и белки, благодаря этому, поступают в организм пациента. Аспекты изобретения предоставляют способы доставки кодирующих последовательностей иммуногена и IL-12 на одной молекуле нуклеиновой кислоты, способы доставки кодирующих последовательностей иммуногена и IL-12 на разных молекулах нуклеиновых кислот и способы доставки кодирующих последовательностей иммуногена и IL-12 как часть рекомбинантных вакцин и как часть аттенуированных вакцин.

Согласно некоторым аспектам данного изобретения предлагаются составы и способы, иммунизирующие организм пациента с профилактической и/или терапевтической целью против аномальных или связанных с заболеваниями клеток. Эта вакцина может быть любым типом вакцины, таким как живая аттенуированная вакцина, рекомбинантная вакцина, вакцина с нуклеиновой кислотой или ДНК-вакцина. Иммунный ответ, индуцированный вакциной, может модулироваться путем доставки молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют иммуноген и IL-12, или их функциональные фрагменты. Конструкции IL-12 особенно эффективны при их введении в комбинации с молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуноген, такой как, например, часть плазмиды или геном рекомбинантного вектора или аттенуированный патоген или клетка. Конструкции IL-12 могут использоваться в вакцинах для профилактики для того, чтобы индуцировать защитный иммунный ответ у инфицированных пациентов или свободных от заболеваний людей. Конструкции IL-12 особенно эффективны, когда вводятся для индуцирования защитного иммунного ответа у людей. Конструкции IL-12 могут использоваться в вакцинах с терапевтической целью для того, чтобы индуцировать иммунный ответ у инфицированных или заболевших пациентов. Конструкции IL-12 особенно эффективны, когда вводятся для индуцирования терапевтического иммунного ответа у людей. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, содержащие конструкции IL-12, вводятся в виде композиции, не содержащей клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, содержащие конструкции IL-12, вводятся в виде композиции, не содержащей раковых клеток. В некоторых вариантах осу-

ществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, содержащие конструкции IL-12, назначаются в виде композиции, не содержащей какого-либо другого цитокина.

Предложенная в настоящей заявке вакцина способна генерировать у млекопитающих иммунный ответ против патогенов, иммуногенов, которые экспрессируются в клетках, связанных с заболеванием, или других иммуногенов, против которых требуется получить иммунный ответ. Эта вакцина может включать каждую из плазмид, описанных выше. Эта вакцина может включать множество плазмид или их комбинацию. Эта вакцина может обеспечивать индукцию терапевтического или профилактического иммунного ответа.

Генетические конструкции могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую белок-мишень или иммуномодулирующий белок, функционально связанный с регуляторными элементами, необходимыми для экспрессии генов. Согласно этому изобретению комбинация генных конструкций включает одну конструкцию, которая содержит экспрессируемую форму нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-мишень, и одну конструкцию, которая содержит экспрессируемую форму нуклеотидной последовательности, кодирующей представленный иммуномодулирующий белок. Доставка в живую клетку молекул(ы) ДНК или РНК, которые включают комбинацию генных конструкций, в результате обеспечивает экспрессию ДНК или РНК и продукцию белка-мишени и одного или более иммуномодулирующих белков. В результате усиливается иммунный ответ против этого белка-мишени.

Данное изобретение может использоваться для иммунизации людей против таких патогенов, как вирусы, прокариоты, и таких патогенных эукариотических организмов, как одноклеточные патогенные организмы и многоклеточные паразиты. Данное изобретение особенно эффективно для иммунизации людей против тех патогенов, которые инфицируют клетки и которые не инкапсулированы, такие как вирусы и прокариоты, такие как бактерии гонореи, листерии и шигеллы. Кроме того, данное изобретение также эффективно для иммунизации людей против протозойных патогенов, включающих стадию жизненного цикла, в которой они существуют в виде внутриклеточных патогенов. В табл. 1 представлен перечень некоторых семейств и видов вирусов, для которых согласно данному изобретению могут быть созданы вакцины. Для вакцин могут быть эффективны ДНК-конструкции, которые содержат последовательности ДНК, кодирующие пептиды, которые включают, по меньшей мере, эпитоп, идентичный или в основном сходный с эпитопом, представленным на патогенном антигене, таких как антигены, перечисленные в таблицах. Более того, данное изобретение также эффективно для иммунизации человека против других патогенов, включая прокариотические и эукариотические протозойные патогены, а также многоклеточных паразитов, таких как перечислены в табл. 2.

Таблица 1

#### Вирусы

Семейство пикорнавирусы (Picornavirus).

Виды.

Риновирусы (медицина): отвечают за 50% случаев простуд.

Энтеровирусы (медицина): включают полиовирусы, коксакивирусы, echo-вирусы и энтеровирусы человека, такие как вирус гепатита А.

Афтовирусы (ветеринария): это вирусы, вызывающие заболевания ящуром.

Антигены-мишени: VP1, VP2, VP3, VP4, VPG.

Семейство калицивирусов (Calicivirus).

Виды.

Группа норовирусов (медицина): эти вирусы являются важным агентом среди причин эпидемических заболеваний гастроэнтеритами.

Семейство тогавирусов (Togavirus).

Виды.

Альфовирусы (медицина и ветеринария): примеры включают синдбис-вирус, вирус реки Росс и вирусы венесуэльского, восточного и западного энцефалита лошадей.

Реовирус (медицина): вирус краснухи.

Семейство флавивирусов (Flaviviridae).

Примеры включают (медицина): вирусы денге, желтой лихорадки, японского энцефалита, энцефалита Сент-Луис и клещевого энцефалита. Вирус Западного Нила (Genbank NC001563, AF533540, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, M12294, AF317203, AF196835, AF260969, AF260968, AF260967, AF206518 и AF202541).

Представители антигенов-мишеней: E NS5 C.

Вирус гепатита С (медицина): эти вирусы еще не определены в семейство, но считаются относящимися к тога- или флавивирусам. Больше сходства с семейством тогавирусов.

Семейство коронавирусов (Coronavirus) (Медицина и ветеринария).

Вирус инфекционного бронхита (домашние птицы).

Вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (свиньи).

Вирус гематоглинирующего энцефаломиелита свиней (свиньи).

Вирус инфекционного перитонита кошек (кошки).

Брюшной коронавирус кошек (кошки).

Коронавирус собак (собаки).

Коронавирус, ассоциированный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS).

Респираторные коронавирусы человека вызывают около 40% случаев простуд. EX. 224E, OC43.

Примечание - коронавирусы могут вызывать не-А, В или С гепатиты.

Антигены-мишени: E1 - также называемый М или матричный белок E2, также называемый S, или белок шипа E3, также называемый BE, или гемагглютинин-эльтерозный гликопротеин (не представлен во всех коронавирусах), N - нуклеокапсид.

Семейство рабдовирусов (Rhabdovirus).

Виды.

Везикуловирус, лиссавирус (медицина и ветеринария): бешенство.

Антиген-мишень: G-белок, N-белок.

Семейство филмовирусов (Filoviridae) (медицина): вирусы геморрагической лихорадки, такие как вирус Марбурга и Эбола.

Семейство парамиксовирусов (Paramyxovirus).

Виды.

Парамиксовирусы (медицина и ветеринария): вирус эпидемического паротита, вирус болезни Нью-Касла (важный патоген кур).

Морбилливирус (медицина и ветеринария): корь, чума собачьих.

Пневмовирус (медицина и ветеринария): респираторно-синцитиальный вирус.

Семейство ортомиксовирусов (медицина): вирус гриппа.

Семейство буньявирусов (Bunyavirus).

Виды.

Буньявирус (медицина): калифорнийского энцефалита, энцефалита Ла-Кросс.

Флебовирус (медицина): лихорадка рифтовой долины.

Хантавирус: возбудителем заболевания пуремала (puredmala) является вирус лихорадки хемахагин.

Неиривирус (Veterinary): заболевание овец Найроби.

А также много неопределенных бунгавирусов.

Семейство аренавирусов (Arenavirus) (медицина): вирус лимфоцитарного менингита (LCM), вирус лихорадки Ласса.

Семейство реовирусов (Reovirus).

Виды.

Реовирус: вероятный патоген человека.

Ротавирус: острый гастроэнтерит детей.

Орбивирусы (медицина и ветеринария): клещевая лихорадка Колорадо, энцефалоз лошадей Лебомбо, катаральная лихорадка овец (синего языка).

Семейство ретровирусов (Retrovirus).

Подсемейство.

Онковирусы (ветеринария) (медицина): вирус лейкемии кошек, человеческий лимфотропный вирус Т-клеток I типа (HTLVI), человеческий лимфотропный вирус Т-клеток II типа (HTLVII).

Лентивирусы (медицина и ветеринария): ВИЧ, вирус иммунодефицита кошек, инфекции лошадей, вирус анемии.

Семейство спумавирусов-паповавирусов (Spumavirinal Papovavirus).

Подсемейство:

Полиомавирусы (медицина): вирусы БиКей и ДжейСи (BKU и JCU).

Подсемейство.

Папилломавирусы (медицина): много видов вирусов, связанных с раковыми заболеваниями или развитием злокачественных папиллом.

Аденовирус (медицина) EX AD7, OP3 (ARD.), O.B. - вызывают респираторные заболевания - некоторые аденовирусы, такие как 275, вызывают энтерит.

Семейство парвовирусов (Parvovirus) (ветеринария).

Кошачий парвовирус: вызывает энтерит кошек.

Панлейкопениявирус кошек.

Парвовирус собак.

Парвовирус свиней.

Семейство герпесвирусов (Herpesvirus).

Подсемейство.

Альфагерпесвирусы.

Виды.

Простой вирус герпеса (HSV) (медицина).

HSVI (Genbank X14112, NC001806), HSVII (NC001798).

Вирус ветряной оспы (медицина и ветеринария).

Псевдобешенство.  
 Ветряная оспа.  
 Подсемейство.  
 Бетагерпесвирусы.  
 Виды.  
 Цитомегаловирус (медицина).  
 Цитомегаловирус человека (HCMV).  
 Муромегаловирус.  
 Подсемейство.  
 Гаммагерпесвирусы.  
 Виды.  
 Лимфокриптовирус (медицина).  
 Вирус Эпштейна-Барр (EBV) - лимфома Беркитта.  
 Семейство поксвирусов (Poxvirus).  
 Подсемейство.  
 Хордопоксвирусы (медицина и ветеринария).  
 Виды.  
 Оспа (натуральная оспа).  
 Вирус осповакцины (коровья оспа).  
 Парапоксвирус (ветеринария).  
 Авипоксвирус (ветеринария).  
 Каприпоксвирус.  
 Лепорипоксвирус.  
 Свипоксвирус.  
 Подсемейство.  
 Энтемопоксвирусы.  
 Семейство гепаднавирусов (Hepadnavirus).  
 Вирус гепатита В.  
 Неклассифицированный вирус гепатита дельта.

Таблица 2

#### Бактериальные патогены

Патогенные грамположительные кокки, включая пневмококки, стафилококки и стрептококки.

Патогенные грамотрицательные кокки, включая менингококки и гонококки.

Патогенные кишечные грамотрицательные бациллы, включая энтеробактерии; псевдомонады, акцинебактерии и эйкенеллы, возбудители мелиоидоза; сальмонеллы; возбудители шигеллоза; гемофилии, венерической язвы, бруцеллеза, туляремии; иерсинии (пастереллы); *Streptobacillus Mortiliformis* и спиллы; *Listeria Monocytogenes*; *Erysipelothrix Rhusiopathiae*; возбудители дифтерии, холеры, сибирской язвы; возбудители донованоза (венерическая гранулема) и бартонеллеза.

Патогенные анаэробные бактерии, включая возбудителей столбняка, ботулизма; другие клостридии; возбудители туберкулеза, проказы и другие микобактерии.

Патогенные заболевания, вызванные спирохетами, включая сифилис, трепонематозы: тропическая фрамбезия, болезнь пинта, эндемический сифилис; лептоспироз.

Другие инфекции, вызванные высокопатогенными бактериями и патогенными грибами, включая возбудителей актиномикозов; нокардиозов; криптококкозов; бластомикозов, гистоплазмозов и кокцидиомикозов; кандидиазов, аспергиллезов и мукормикозов; споротрихозов; паракокцидиомикозов, петриеллидиозов, торулопсозов, мицетом, хромомикозов и дерматофитозов.

Риккетсиозные инфекции, включая риккетсиозные заболевания и риккетсиозы.

Примеры заболеваний, вызванных микоплазмами, и хламидийных инфекций включают *Mycoplasma Pneumoniae*, венерическая лимфогранулема, пситтакоз и перинатальные хламидийные инфекции.

Патогенные эукариоты.

Патогенные простейшие и гельминты и вызванные ими заболевания включают амебиаз, малярию, лейшманиоз, трипаносомиаз, токсоплазмоз, пневмоцистис карнии, бабезиоз, гиардиоз, трихиноз, филяриаз, шизостомиаз, заболевания, вызванные нематодами, трематодами и цестодами (ленточными червями).

Для того чтобы получить генетическую вакцину для защиты от патогенной инфекции, генетический материал, который кодирует иммуногенные белки, против которых может быть создан защитный иммунный ответ, должен быть включен в генетическую конструкцию как кодирующая последовательность для такой мишени. Из-за того, что обе молекулы ДНК и РНК относительно малы и могут быть получены относительно легко, настоящее изобретение обеспечивает дополнительное преимущество, позволяющее проводить вакцинацию множеством патогенных антигенов. Генетическая конструкция, используемая в этой генетической вакцине, может содержать генетический материал, который кодирует множество патогенных антигенов. Например, несколько вирусных генов могут быть включены в одну конструкцию,

тем самым обеспечивая наличие множества мишеней.

Табл. 1 и 2 содержат перечень некоторых из патогенных агентов и организмов, для защиты от вызываемых которыми инфекций могут быть приготовлены генетические вакцины.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с одной или более конструкций ДНК-вакцин, изложенных в следующих патентных документах, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакциной против ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), вакциной против ВГС (вирус гепатита С), вакциной против ВПЧ (вирус папилломы человека), вакциной против вируса гриппа или противораковых вакцин, направленных на подавление hTERT (теломераза-обратная транскриптаза человека), описанными в заявке согласно РСТ (Договор о патентной кооперации) № РСТ/US07/74769 и соответствующей патентной заявке США серийный номер 12/375518. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против вируса гриппа, описанными в заявке согласно РСТ № РСТ/US08/83281, соответствующей патентной заявке США серийный номер 12/269824 или в заявке согласно РСТ № РСТ/US11/22642 и соответствующей патентной заявке США серийный номер 12/694238. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против ВГС, описанными в заявке согласно РСТ № РСТ/US08/081627 и соответствующей патентной заявке США серийный номер 13/127008. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против ВПЧ, описанными в заявке согласно РСТ № РСТ/US10/21869 и соответствующей патентной заявке США серийный номер 12/691588 или в предварительной заявке США серийный номер 61/442162. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против натуральной оспы, описанными в заявке согласно РСТ № РСТ/US09/045420 и соответствующей патентной заявке США серийный номер 12/473634. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против лихорадки Чикунгунья, описанными в заявке согласно РСТ № РСТ/US09/039656 и соответствующей патентной заявке США серийный номер 12/936186. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против вирусных заболеваний ящуром (FMDV), описанными в заявке согласно РСТ № РСТ/US10/55187. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против малярии, описанными в предварительной заявке США серийный номер 61/386973. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против раковых заболеваний простаты, описанными в предварительной заявке США серийный номер 61/413176 или в предварительной заявке США серийный номер 61/417817. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против цитомегаловируса человека (CMV), описанными в предварительной заявке США серийный номер 61/438089. В некоторых вариантах осуществления изобретения вакцины содержат оптимизированную последовательность IL-12 в комбинации с вакцинами против устойчивого к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA), описанными в предварительной заявке США серийный номер 61/569727, поданной 12 декабря 2011 года, озаглавленной "PROTEINS COMPRISING MRSA PBP2A AND FRAGMENTS THEREOF, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME, AND COMPOSITIONS AND THEIR USE TO PREVENT AND TREAT MRSA INFECTIONS" и назначенным номером патентного реестра 133172.04000 (X5709) с соответствующей заявкой согласно РСТ на утверждение приоритета в США. Предварительная заявка США серийный номер 61/569727, поданная в тот же день, что и настоящая заявка, содержание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок. Все патенты и патентные заявки, приведенные в этой заявке, полностью включены их содержанием посредством ссылок.

Другой аспект данного изобретения обеспечивает способ получения защитного иммунного ответа к гиперпролиферирующим клеткам, которые являются характерными при гиперпролиферативных заболеваниях, и способ лечения пациентов, страдающих от гиперпролиферативных заболеваний. Примеры гиперпролиферативных заболеваний включают все формы рака и псориаз.

Обнаружено, что введение генетической конструкции, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую иммуногенный связанный с "гиперпролиферирующими клетками" белок, в клетки пациента приводит к синтезу таких белков в вакцинированных клетках пациента. Для иммунизации против гиперпролиферативных заболеваний пациенту назначают генетическую конструкцию, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую связанный с гиперпролиферативными заболеваниями белок.

Для того чтобы связанный с гиперпролиферативными заболеваниями белок был эффективной иммуногенной мишенью, он должен быть белком, который синтезируется исключительно или синтезируется в больших количествах в гиперпролиферирующих клетках по сравнению с нормальными клетками.



Антигены-мишени включают такие белки, их фрагменты и пептиды, которые содержат, по меньшей мере, эпитоп, найденный в таких белках. В некоторых случаях связанный с гиперпролиферативными заболеваниями белок является продуктом мутации гена, кодирующего белок. Мутировавшие гены кодируют белок, который практически идентичный нормальному белку, за исключением того, что он немного отличается по аминокислотной последовательности, что приводит к получению другого эпитопа, не найденного в нормальном белке. Такие белки-мишени включают те белки, которые кодируются онкогенами, такими как *myb*, *myc*, *fun* и генами транслокаций *t(abl)*, *ras*, *src*, *P53*, *neu*, *trk* и *EGFR*. В дополнение к продуктам онкогенов, таким как антигены-мишени, белки-мишени для схем лечения и защиты от раковых заболеваний, существуют переменные участки антител, синтезированных В-клеточными лимфомами, и переменные участки Т-клеточных рецепторов Т-клеточных лимф, которые в некоторых вариантах осуществления изобретения также используются как антигены-мишени при аутоиммунных заболеваниях. Как белки-мишени могут использоваться другие белки, ассоциированные с опухолями, такие как белки, найденные в высоких концентрациях в клетках новообразований, включая белок, распознаваемый моноклональным антителом 17-1А и фолат-связывающими белками или специфический антиген простаты (PSA).

В то же время данное изобретение может использоваться для иммунизации пациентов против одной или более форм рака, настоящее изобретение особенно эффективно для профилактической иммунизации индивида, который предрасположен к развитию особых видов раковых заболеваний или у которого есть раковое заболевание и, следовательно, он чувствителен к рецидиву заболевания. Развитие генетики и технологии, а также эпидемиологии, позволяют определить вероятность и оценку риска развития рака у пациента. Используя генетический скрининг и/или истории болезней членов семьи, становится возможным предсказать вероятность развития какого-либо одного или нескольких видов рака у отдельного пациента.

Аналогично, у тех пациентов, у которых уже развилась онкология и которые проходят лечение для удаления опухолей или иным образом проходят ремиссию, особенно чувствительны к рецидивам и повторному заболеванию. Такие пациенты могут быть иммунизированы против раковых заболеваний, которые были у них диагностированы, применяя иммунизацию как часть схемы лечения и получая лечение для борьбы с повторным развитием заболеваний. Таким образом, как только становится известным, что у пациента появился определенный вид онкозаболевания и есть риск его рецидива, то такие пациенты могут быть иммунизированы для подготовки их иммунной системы к противодействию будущему появлению рака.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения пациентов, страдающих от гиперпролиферативных заболеваний. При таких способах лечения введение генетических конструкций служит в качестве иммунотерапевтического средства, направленного и стимулирующего иммунную систему индивида на подавление гиперпролиферирующих клеток, производящих белки-мишени. При лечении или предотвращении возникновения рака, особенно эффективными являются воплощения изобретения, которые не содержат клеток.

Данное изобретение обеспечивает способ лечения пациентов, страдающих от аутоиммунных заболеваний и расстройств, предоставляя иммунный ответ широкого спектра против мишеней, которые связаны с рецепторами клеток, индуцирующих аутоиммунные сбои, и с клетками, продуцирующими "само"-направленные антитела.

Аутоиммунные заболевания, опосредованные Т-клетками, включают ревматоидный артрит (РА), множественный склероз (МС), синдром Шегрена, саркоидоз, инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), аутоиммунный тиреоидит, реактивный артрит, анкилозный спондилит, склеродерму, полимиозит, дерматомиозит, псориаз, васкулит, гранулематоз Вегнера, болезнь Крона и язвенный колит. Для каждого из этих заболеваний существуют характерные рецепторы Т-клеток, связывающиеся с эндогенными антигенами и инициирующие воспалительные каскады, ассоциированные с аутоиммунными заболеваниями. Вакцинация против переменного участка Т-клеток будет вызывать иммунный ответ, включая цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) для удаления таких Т-клеток.

В случае РА охарактеризовано несколько специфических переменных участков Т-клеточных рецепторов (TCR), вовлеченных в развитие этой болезни. Эти TCR включают  $V\beta$ -3,  $v\beta$ -14, 20 $V\beta$ -17 и  $V\alpha$ -17. Следовательно, вакцинация ДНК-конструкцией, кодирующей, по крайней мере, один из таких белков будет вызывать иммунный ответ, который направлен на Т-клетки, вовлеченные в развитие РА. Смотрите статьи: Howell M. D. et al., 1991 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:10921-10925; Piliard X. et al, 1991 Science 253:325-329; Williams W. V. et al., 1992 J Clin. Invest. 90:326-333. Каждая из которых приведена в этой заявке посредством ссылки. В случае МС охарактеризовано несколько специфических переменных участков TCR, вовлеченных в развитие этой болезни. Эти TCR включают  $v\beta$ -7 и  $V\alpha$ -10. Следовательно, вакцинация ДНК-конструкцией, кодирующей, по крайней мере, один из таких белков будет вызывать иммунный ответ, который направлен на Т-клетки, вовлеченные в развитие МС. Смотрите статьи: Wucherpfennig K. W. et al., 1990 Science 248:1016-1019; Oksenberg J. R. et al, 1990 Nature 345:344-346. Каждая из которых включена в эту заявку посредством ссылки.

В случае заболевания склеродермой охарактеризовано несколько специфических варибельных участков TCR, вовлеченных в развитие этой болезни. Эти TCR включают V $\beta$ -6, V $\beta$ -8, V $\beta$ -14 и V $\alpha$ -16, V $\alpha$ -3C, V $\alpha$ -7, V $\alpha$ -14, V $\alpha$ -15, V $\alpha$ -16, V $\alpha$ -28, V $\alpha$ -12. Следовательно, вакцинация ДНК-конструкцией, кодирующей по крайней мере один из таких белков будет вызывать иммунный ответ, который направлен на Т-клетки, вовлеченные в развитие склеродермы.

Для того чтобы лечить пациентов, страдающих от аутоиммунного заболевания, опосредованного Т-клетками, особенно тех, для которых варибельные участки TCR еще не были охарактеризованы, выполняется синовиальная биопсия. Могут быть отобраны образцы присутствующих Т-клеток и с помощью использования стандартных методик идентифицировать варибельные участки таких TCR. Генетические вакцины могут создаваться на основании этой информации.

Аутоиммунные заболевания, опосредованные В-клетками, включают волчанку (СКВ - системную красную волчанку), базедову болезнь (болезнь Грейвса), тяжелую миастению, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунную тромбоцитопению, астму, криоглобулемию, первичный склероз желчных путей и пернициозную анемию. Для каждого из этих заболеваний существуют характерные антитела, связывающиеся с эндогенными антигенами и инициирующие воспалительные каскады, ассоциированные с аутоиммунными заболеваниями. Вакцинация против варибельного участка антител будет вызывать иммунный ответ, вовлекая цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) для удаления тех В-клеток, которые продуцируют эти антитела.

Для того чтобы лечить пациентов, страдающих от аутоиммунного заболевания, опосредованного В-клетками, должны быть идентифицированы варибельные участки антител, задействованных в аутоиммунную активность. Может проводиться биопсия, и могут отбираться образцы антител, присутствующие в зоне воспаления. Варибельные участки таких антител могут быть идентифицированы с помощью стандартных методик. Генетические вакцины могут создаваться на основании этой информации.

В случае заболевания СКВ, один антиген, полагают, является ДНК. Следовательно, у пациентов, которых необходимо иммунизировать от СКВ, образцы их сыворотки крови могут быть проверены на присутствие антител против ДНК, и может быть приготовлена вакцина, которая содержит ДНК-конструкции, кодирующие варибельный участок таких найденных в сыворотке антител против ДНК.

Общие структурные характеристики между варибельными участками и TCR и антител хорошо известны. ДНК последовательность, кодирующая особый TCR или антитело, обычно может быть найдена следующими хорошо известными методами, такими как описано в издании Kabat et al. 1987. Последовательность важных для иммунологии белков. Министерство здравоохранения и социального обеспечения США, г. Бетесда, штат Мэриленд, которая включена в эту заявку посредством ссылки. Кроме того, общий метод клонирования функциональных варибельных участков антител может быть найден в публикации Chaudhary V. K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:1066, которая включена в эту заявку посредством ссылки.

В дополнение к использованию способных к экспрессии форм последовательностей, кодирующих иммуномодулирующие белки, для улучшения генетических вакцин настоящее изобретение относится к улучшенным аттенуированным живым вакцинам и улучшенным вакцинам, которые используют рекомбинантные векторы для доставки чужеродных генов, кодирующих антигены. Примеры аттенуированных живых вакцин и вакцин с рекомбинантными векторами для доставки чужеродных генов описаны в патентах США №№: 4722848; 5017487; 5077044; 5110587; 5112749; 5174993; 5223424; 5225336; 5240703; 5242829; 5294441; 5294548; 5310668; 5387744; 5389368; 5424065; 5451499; 5453364; 5462734; 5470734 и 5482713, которые включены в эту заявку посредством ссылки. Приведенные генные конструкции включают нуклеотидную последовательность конструкции IL-12 или ее функциональные фрагменты, в которых нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторными последовательностями, способными функционировать в вакцине для управления экспрессией. Эти генные конструкции вводятся в аттенуированные живые вакцины и рекомбинантные вакцины для получения улучшенных вакцин согласно этому изобретению.

Эти вакцины могут дополнительно содержать фармацевтическиприемлемые вспомогательные вещества. Фармацевтическиприемлемые вспомогательные вещества могут быть функциональными молекулами, такими как транспортирующие молекулы, адъюванты, носители или растворители. Фармацевтическиприемлемое вспомогательное вещество может быть облегчающим трансфекцию агентом, который может содержать поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИС-КОМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог липополисахарида (ЛПС), включая монофосфорил-липид А, мураминовые пептиды, аналоги хинонов, транспортирующие молекулы, такие как сквален, гиалуроновую кислоту, липиды, липосомы, кальциевые ионы, вирусные белки, полианионы, поликатионы, наночастицы или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию.

Облегчающими трансфекцию агентами являются полианионы, поликатионы, включая поли-L-глютамат (LGS), или липиды. Облегчающий трансфекцию агент - поли-L-глютамат предпочтительнее поли-L-глютамат вводится в вакцины в концентрации менее 6 мг/мл. Облегчающий трансфекцию агент также может содержать поверхностно-активные вещества, такие как иммуностимулирующие комплексы (ИС-

КОМ), неполный адъювант Фрейнда, аналог ЛПС, включая монофосфорил-липид А, мураминовые пептиды, аналоги хинонов и транспортирующие молекулы, такие как сквален и гиалуроновую кислоту, которые также могут назначаться в сочетании с генетической конструкцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения ДНК-плазмидные вакцины также могут включать такие облегчающие трансфекцию агенты как липиды, липосомы, включая лецитиновые липосомы или другие липосомы, известные в этой области знания как ДНК-липосомные смеси (см. например WO 9324640), кальциевые ионы, вирусные белки, полианионы, поликатионы, наночастицы или другие известные агенты, облегчающие трансфекцию. Предпочтительными облегчающими трансфекцию агентами являются полианионы, поликатионы, включая поли-L- глютамат (LGS), или липиды. Концентрация агента для трансфекции в составе вакцины может быть менее 4, менее 2, менее 1, менее 0,750, менее 0,500, менее 0,250, менее 0,100, менее 0,050 или менее 0,010 мг/мл.

Фармацевтическиприемлемым вспомогательным веществом может быть один или более дополнительных адъювантов. Адъюванты могут обеспечиваться другими генами, которые экспрессируются на этой же или на другой плазмиде, или вводятся в виде белков в комбинации с вышеупомянутой плазмидой в вакцине. Одним или большим количеством адъювантов могут быть белки и/или молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют белки, выбранные из групп состоящих из  $\alpha$ -интерферона (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -интерферона (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -интерферона, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), факторов некроза опухолей (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ), гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующего фактора (GM-CSF), эпидермального фактора роста (EGF), хемокина кожи, привлекающего Т-клетки (STACK), экспрессируемого тимусом эпителиального хемокина (TECK), эпителиального хемокина, связанного со слизистыми (MEC), интерлейкина-15 (IL-15), включая IL-15, обладающий сигнальной или кодирующей последовательностью, которые кодируют последовательность с изъятой сигнальной последовательностью или дополнительно включающую разные сигнальные пептиды, такие как из IgE, или кодирующие последовательности разных сигнальных пептидов, таких как IgE, IL-28, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, L-селектина, P-селектина, E-селектина, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, мутантных форм IL-18, CD40, CD40L, фактора роста сосудов, фактора роста фибробластов, IL-7, фактора роста нервов, фактора роста эндотелия сосудов, Fas, рецептора TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазы ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, инактивированного NIK, SAP K, SAP-1, JNK, генов, отвечающих на интерфероны, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\chi$ 40, O $\chi$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональных фрагментов или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительным адъювантом может быть один или более белков и/или молекул нуклеиновых кислот, кодирующих выбранные из групп, состоящих из: IL-15, IL-28, STACK, TECK, MEC или хемокина, выделяемого Т-клетками при активации (RANTES). Примеры конструкций и последовательностей IL-15 приведены в заявке согласно РСТ № PCT/US04/18962 и соответствующей заявке на патент США серийный № 10/560650 и в заявке согласно РСТ № PCT/US07/00886 и соответствующей заявке на патент США. серийный №12/160766 и в заявке согласно РСТ № PCT/US10/048827. Примеры конструкций и последовательностей IL-28 приведены в заявке согласно РСТ № PCT/US09/039648 и соответствующей заявке на патент США серийный № 12/936192. Примеры конструкций и последовательностей RANTES и других хемокинов приведены в заявке согласно РСТ № PCT/US1999/004332 и соответствующей заявке на патент США серийный № 09/622452. Другие примеры конструкций и последовательностей RANTES приведены в заявке на РСТ № PCT/US11/024098. Примеры конструкций и последовательностей RANTES и других хемокинов приведены в заявке согласно РСТ № PCT/US1999/004332 и соответствующей заявке на патент США серийный № 09/622452. Другие примеры конструкций и последовательностей RANTES приведены в заявке на РСТ № PCT/US11/024098. Примеры конструкций и последовательностей хемокинов STACK, TECK и MEC приведены в заявке согласно РСТ № PCT/US2005/042231 и соответствующей заявке на патент США серийный № 11/719646. Примеры OX40 и других иммуномодуляторов приведены в заявке на патент США серийный № 10/560653. Примеры DR5 и других иммуномодуляторов приведены в заявке на патент США серийный № 09/622452.

Вакцина может дополнительно содержать агент содействия генетической вакцине, как описано в заявке на патент США серийный № 021579, поданной 1 апреля 1994 года, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Эта вакцина может включать консенсусные антигены и плазмиды в количествах от около 1 до 100 мг, от около 1 мкг и до около 10 мг или предпочтительно от около 0,1 мкг и до около 10 мг или более предпочтительно от около 1 и до около 2 мг. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы согласно данному изобретению включают от около 5 нг до около 1000 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы содержат от около 10 нг до около 800 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы содержат от около 0,1 до около 500 мкг ДНК. В

некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы содержат от около 1 до около 350 мкг ДНК. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы содержат от около 25 до около 250 мкг, от около 100 до около 200 мкг, от около 1 нг до около 100 мкг, от около 1 мкг до около 10 мкг, от около 0,1 мкг до около 10 мкг, от около 1 и до около 2 мкг, от около 5 нг до около 1000 мкг, от около 10 нг до около 800 мкг, от около 0,1 до около 500 мкг, от около 1 до около 350 мкг, от около 25 до около 250 мкг, от около 100 до около 200 мкг консенсусного антигена или кодирующей его плазмиды.

Вакцина может быть составлена согласно способу ее применения. Инъекционные фармацевтические составы вакцин должны быть стерильными, не содержать пирогенов и механических частиц. Следует использовать изотоническую рецептуру или раствор. Добавки для обеспечения изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, манит, сорбит или лактозу. Эта вакцина может включать агент, отвечающий за сужение сосудов. Такие изотонические растворы могут содержать фосфатно-солевой буферный раствор. Состав вакцины дополнительно может содержать стабилизаторы, включая желатин и альбумин. Стабилизаторы, такие как LGS, поликатионы или полианионы, введенные в состав вакцины, должны обеспечивать стабильность рецептуры при комнатной температуре или температуре окружающей среды в течение длительных периодов времени.

Способы доставки вакцины.

Приводимый в настоящей заявке способ доставки вакцины, содержащей конструкции с IL-12, необходим для создания иммунных ответов, эффективных против иммуногенов вакцины. Этот способ доставки вакцины или проведения вакцинации может обеспечивать индуцирование терапевтического или профилактического иммунного ответа. Процесс вакцинации может генерировать у млекопитающих иммунный ответ против иммуногенов. Вакцина может вводиться реципиентам для модулирования активности иммунной системы млекопитающих и усиливать иммунный ответ. Введение вакцин может выполняться трансфекцией последовательностей, кодирующих иммуноген и конструкции IL-12, расположенных на одной или более молекул нуклеиновых кислот. Кодирующие последовательности, экспрессирующиеся в клетках, доставляются до поверхности клеток, с помощью которых иммунная система распознает и индуцирует клеточный, гуморальный или клеточный и гуморальный ответы. Доставка вакцин может применяться для индуцирования и получения иммунного ответа у млекопитающих против иммуногена путем введения им описанной выше вакцины. Включение в состав вакцин конструкций IL-12 ведет к более эффективному иммунному ответу.

После доставки вакцин и плазмид в клетки млекопитающих трансфицированные клетки будут экспрессировать и секретировать иммуногены и IL-12, которые кодируются плазмидами, введенными с вакциной. Эти иммуногены будут распознаваться иммунной системой как чужеродные белки, и против них будут вырабатываться антитела. Эти антитела будут распознаваться иммунной системой, что обеспечит эффективный ответ при последующих инфицированиях. Присутствие IL-12, кодируемого конструкциями IL-12, приведет к более выраженному иммунному ответу.

Эта вакцина может назначаться млекопитающим для обеспечения формирования у них иммунного ответа. Млекопитающими могут быть люди, приматы, нечеловекообразные обезьяны, коровы, рогатый скот, овцы, козы, антилопы, бизоны, азиатские буйволы, жвачные животные, олени, ежи, слоны, ламы, альпаки, мыши, крысы и куры.

Комбинированные схемы лечения.

Конструкции IL-12 могут назначаться в комбинации с другими белками или генами, которые кодируют один или более продуктов:

$\alpha$ -интерферон (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -интерферон (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -интерферон, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), факторы некроза опухолей (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ), гранулоцито-макрофаго-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), эпидермальный фактор роста (EGF), хемокин кожи, привлекающий Т-клетки (СТACK), экспрессируемый тимусом эпителиальный хемокин (TECK), эпителиальный хемокин, связанный со слизистыми (MEC), IL-15, включая IL-15, с изъятой сигнальной последовательностью или обладающий дополнительной последовательностью, включающей сигнальный пептид IgE, MHC, CD80, CD86, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-28, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-8, RANTES, L-селектина, P-селектина, E-селектина, 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-14, мутантных форм IL-18, CD40, CD40L, фактора роста сосудов, фактора роста фибробластов, IL-7, фактора роста нервов, фактора роста эндотелия сосудов, Fas, рецептора TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, каспазы ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, инактивированного NIK, SAP K, SAP-1, JNK, генов, отвечающих на интерфероны, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\times$ 40, O $\times$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 и их функциональных фрагментов или их комбинаций.

Вакцина может вводиться разными путями, включая оральный, парентеральный, сублингвальный, трансдермальный, ректальный, трансмукозальный, местный, через ингаляции, путем буккального вве-

дения, интраплевральный, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, назальный, интратекальный и внутрисуставный или их сочетаниями. При ветеринарном применении этот состав может вводиться с помощью подходящей приемлемой рецептуры в соответствии с нормальной ветеринарной практикой. Ветеринары без труда могут определить режим дозирования и путь введения, которые являются наиболее подходящими для данного вида животных. Вакцина может вводиться обычными шприцами, устройствами для проведения безыгольных инъекций, "пушками для микропроецированной бомбардировки генами" или другими физическими методами, такими как электропорация (ЭП), "гидродинамическим методом" или с помощью ультразвука.

Плазмида вакцины может быть доставлена в организм млекопитающего несколькими хорошо известными техниками, включающими инъекцию ДНК (также именуемая как ДНК-вакцинация) с или без применения электропорации *in vivo*, с помощью липосом, с участием наночастиц, рекомбинантными векторами, такими как рекомбинантные аденовирусы, рекомбинантными вирусами, связанными с аденовирусом и рекомбинантной осповакциной. Консensusный антиген может доставляться через ДНК-инъекцию равно как и электропорацией *in vivo*.

#### Электропорация.

Введение вакцины с помощью электропорации плазмид вакцины может выполняться с использованием устройств для электропорации, которые могут быть настроены для доставки в требуемые ткани животных под действием импульса энергии, эффективного для образования двусторонних пор, формируемых в клеточных мембранах. Предпочтительным является импульс энергии постоянного тока сходного с предустановленной пользователем исходной силой тока. Устройство для электропорации может состоять из компонента для электропорации и набора электродов или ручного устройства. Компонент для электропорации может включать и состоять из одного или более элементов устройства для электропорации, включая контроллер, генератор формы кривой тока, измеритель импеданса, регистратор формы кривой тока, входной элемент, элемент фиксирующий состояние прибора, коммуникационный порт, элемент памяти, источник питания и выключатель питания. Электропорация может проводиться в условиях *in vivo* с использованием устройства для электропорации, например системы для ЭП CELLECTRA (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA) или электропоратор Elgen (Genetronics, San Diego, CA) для облегчения проведения трансфекции клеток плазмидами.

Компонент для электропорации может функционировать как единственный элемент устройств для электропорации, а другие элементы являться отдельными элементами (или компонентами), соединенными с компонентом для электропорации. Компонент для электропорации может функционировать в виде более чем одного элемента устройств для электропорации, которые могут соединяться с оставшимися другими элементами устройств для электропорации, отделенных от компонента для электропорации. Элементы устройств для электропорации, существующие как составляющие части электромеханического или механического устройства не следует функционально ограничивать, так как элементы могут функционировать как одно устройство или как отдельные элементы, связанные один с другим. Компонент для электропорации может обеспечивать подачу импульса энергии, который создается при постоянной силе тока в требуемой ткани и с участием механизма обратной связи. Набор электродов может включать решетку электродов, несущую множество электродов, расположенных в пространстве упорядочено, в котором набор электродов получает импульс энергии из компонента для электропорации и передает его в неизменном виде через электроды до требуемых тканей. По крайней мере один из множества электродов является нейтральным и в момент передачи импульса энергии измеряет импеданс нужной ткани и передает значение импеданса компоненту для электропорации. Механизм обратной связи может получить измеренный импеданс и скорректировать импульс энергии, полученный от компонента для электропорации для поддержания постоянного тока.

Множество электродов может передавать импульс энергии в виде децентрализованного набора. Множество электродов могут передавать импульс энергии в виде децентрализованного набора благодаря контролю электродов в запрограммированной последовательности. Запрограммированная последовательность вводится пользователем посредством компонента для электропорации. Запрограммированная последовательность может состоять из множества импульсов, подаваемых последовательно, причем каждый импульс из этого множества импульсов подается через по меньшей мере два активных электрода с использованием одного нейтрального электрода, измеряющего импеданс. При этом последующий импульс из множества импульсов подается другим из по крайней мере двух активных электродов с использованием одного нейтрального электрода, измеряющего импеданс.

Механизм обратной связи может быть выполнен в виде аппаратного или программного обеспечения. Механизм обратной связи может быть выполнен в виде петли с аналоговым закрытым контуром. Обратная связь срабатывает каждые 50, 20, 10 или 1 мкс, но предпочтительно работает в режиме реального времени или незамедлительно (т.е. практически мгновенно, как определяет доступная техника по определению времени отклика). Нейтральный электрод может измерять импеданс в требуемой ткани и передавать значение импеданса механизму обратной связи. И механизм обратной связи отвечает на значение импеданса и регулирует импульс энергии для поддержания постоянного тока в значении, аналогичном предустановленной силе тока. Механизм обратной связи может постоянно и немедленно под-

держивать постоянный ток во время подачи импульса энергии.

Примеры устройств для электропорации и методов проведения электропорации, которые могут способствовать доставке ДНК-вакцин настоящего изобретения, включают те устройства и способы, описанные в патенте США № 7245963 авторов Draghia-Akli et al., публикации патента США 2005/0052630, поданного авторами Smith et al., содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Другие устройства для электропорации и методы проведения электропорации, которые могут быть использованы для облегчения доставки ДНК-вакцин, включают те устройства и способы, приведенные в рассматриваемой совместно и в соавторстве заявке на патент США серийный № 11/874072, поданной 17 октября 2007 года, которая заявляет приоритет согласно ст. 119(e) 35 Свода законов США (USC) по отношению к предварительным заявкам сер. № 60/852149, поданной 17 октября 2006 г. и № 60/978982, поданной 10 октября 2007 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок.

Патент США № 7245963 авторов Draghia-Akli et al. описывает модульные электродные системы и их использование для облегчения введения биомолекул в клетки требуемой ткани организма человека, животных или растений. Модульные электродные системы могут включать множество игольчатых электродов, подкожную иглу, электрический соединитель, обеспечивающий проводное соединение с программируемым контроллером импульсов постоянного тока для множества игольчатых электродов, и источник питания. Оператор может использовать множество игольчатых электродов, собранных в поддерживающую конструкцию, и прочно вставлять их в выбранную ткань организма или растения. Потом через подкожную иглу необходимые биомолекулы вводятся в выбранную ткань. Активируется программируемый контроллер импульсов постоянного тока, и на множество игольчатых электродов подается электрический импульс постоянного тока. Поданный электрический импульс постоянного тока способствует введению биомолекул в клетки, расположенные между множеством игольчатых электродов. Полное содержание патента США № 7245963 включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Публикация патента США 2005/0052630, поданного авторами Smith et al., описывает устройство для электропорации, которое может использоваться для эффективного облегчения введения биомолекул в клетки выбранной ткани организма или растения. Устройство для электропорации включает электрокинетическое устройство (ЭКУ), режим работы которого определяется программным или аппаратным обеспечением. ЭКУ под контролем пользователя и на основе введенных параметров импульса создает серии наборов программируемых импульсов постоянного тока между электродами решетки и позволяет хранить и накапливать данные о форме кривой тока. Устройство для электропорации также содержит заменяемый диск с электродами, несущий решетку игольчатых электродов, центральный канал для введения для инъекционной иглы и съемную установочную шайбу. Полное содержание публикации патента США 2005/0052630 включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Решетки электродов и способы их использования, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/0052630, могут быть приспособлены к глубокому проникновению не только в ткани, такие как мышцы, но также и в другие ткани или органы. Благодаря конфигурации электродной решетки инъекционная игла (для доставки выбранного типа биомолекул) также целиком вводится в орган-мишень, а инъекция проводится перпендикулярно органу-мишени в область, которая предварительно разграничена электродами. Электроды, описанные в патенте США № 7245963 и публикации патента США 2005/005263, преимущественно имеют размеры 20 мм длиной и диаметром калибра 21.

Дополнительно в некоторых вариантах осуществления изобретения, которые включают устройства для электропорации и их использование, предусмотрены такие устройства для электропорации, которые описаны в следующих патентах: патент США 5273525 выдан 28 декабря 1993 г., патенты США 6110161 выдан 29 августа 2000 г., 6261281 выдан 17 июля 2001 г., 6958060 выдан 25 октября 2005 г. и 6939862 выдан 6 сентября 2005 г. Помимо этого патенты, охватывающие объект изобретения, представлены в патенте США 6697669, выданном 24 февраля 2004 года, который касается доставки ДНК с использованием какого-либо из множества устройств, и в патенте США 7328064, выданном 5 февраля 2008 года, который описывает способ введения ДНК как предусмотрено в данной заявке. Все вышеуказанные патенты в их полном содержании включены в настоящую заявку посредством ссылок.

Способ приготовления ДНК-плазмид.

Представленные в настоящей заявке методы приготовления ДНК-плазмид, которые содержат ДНК-конструкции и вакцины, обсуждаются в этой заявке. ДНК-плазмиды, после стадии последнего субклонирования в системе экспрессии плазмид млекопитающих, могут быть использованы для инокуляции клеточной культуры в реакторе для крупномасштабной ферментации, применяя известные в этой области знания способы.

ДНК-плазмиды для использования в устройствах для ЭП настоящего изобретения могут быть созданы или получены с применением комбинации известных устройств и технологий, но преимущественно их получают, применяя оптимизированную технологию получения плазмид, которая описана в совместно-рассматриваемой предварительной заявке патента США, составляющего предмет лицензии, серийный № 60/939792, поданной 23 мая 2007 г. В некоторых примерах ДНК-плазмиды, применяемые в этих исследованиях, могут быть составлены в концентрациях более или равных 10 мг/мл. Такие технологии по-

лучения также содержат или включают различные устройства и протоколы, широко известные тем лицам, которые обладают обычными знаниями в этой области техники. Дополнительно технологии описаны в патенте США серийный № 60/939792, включая описанные в патенте, составляющем предмет лицензии, патенте США № 7238522, выданном 3 июля 2007 г. Указанные выше заявка и патент США серийный № 60/939792 и 7238522 соответственно в их полном содержании включены в настоящую заявку посредством ссылок.

Иммуномодулирующие составы и способы их применения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих субъединицы IL-12, доставляются без добавления последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих иммуноген. В таких способах применения последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих субъединицы IL-12, используются как иммунотерапевтические препараты, которые при экспрессии синтезируют функциональный IL-12, вызывающий у пациента желаемый иммуномодулирующий эффект. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих субъединицы IL-12, применяются и доставляются, как описано выше, за исключением последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих иммуноген. В таких способах применения последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих субъединицы IL-12, могут использоваться сами как иммунотерапевтические препараты по себе или в сочетании с другими иммуномодулирующими белками, такими как описаны выше в разделе озаглавленном "комбинированные схемы лечения".

### Примеры

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами. Следует понимать, что эти примеры при указании предпочтительных вариантов осуществления изобретения даются таким образом, чтобы служить только иллюстрацией. Из вышеприведенного описания и этих примеров опытный в этой сфере техники человек может установить значимые характеристики этого изобретения и, не отходя от сущности и сферы этого изобретения, может создать разные изменения и модификации этого изобретения для того, чтобы приспособить его к различным видам применения и условий использования. Поэтому разные модификации этого изобретения, дополнительно показанным и описанным в настоящей заявке, будут очевидны из вышеизложенного описания тем лицам, которые обладают опытом в этой сфере знаний. Такие модификации также подразумеваются как такие, которые попадают под прилагаемую формулу изобретения.

Пример 1. Сравнение уровней экспрессии последовательностей *phuIL12-opt* и *phuIL12-nonopt*.

Сравнение уровней экспрессии последовательностей *phuIL12-opt* и *phuIL12-nonopt* было выполнено для того, чтобы показать, что важные подходы оптимизации кодонов/PHK способны усилить уровни экспрессии/адьювантное действие созданного синтетического IL-12.

Клетки 293T ( $7,5 \times 10^5$ ), которые подвергли трансфекции с помощью 2 или 4 мкг последовательностей соответственно *huIL12-opt* и *huIL12-nonopt* в 6-луночных планшетах, используя реагент для трансфекции FuGene6 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) согласно инструкции производителя. ДНК и реагент для трансфекции FuGene6 добавляли последовательно к среде без сыворотки в соотношении ДНК:FuGene6 1 мг ДНК на 3 мкг реагента FuGene6. Объем среды без сыворотки определяли по количеству, необходимому для получения общего объема всей смеси, равного 200 мкл. Эту смесь добавляли к каждой лунке с клетками и инкубировали планшет в течение 48 ч при температуре 37°C и атмосфере CO<sub>2</sub> 5%. После завершения инкубации были отобраны образцы супернатанта для анализа с помощью иммуноферментного анализа (ELISA).

Планшеты с высокой способностью связывания белков (Nunc, Rochester, NY) были покрыты моноклональными антителами MT86/221 по 100 мкл/лунка из набора для определения IL-12 человека методом ELISA (Mabtech, Mariemont, OH) и инкубировались в течение ночи при температуре 4°C. После такой инкубации планшеты промывали дважды фосфатно-солевым буфером с Твином (Tween) - PBST (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко - DPBS с 0,1% Твин 20) и заблокированы выдержкой в течение 1 ч после добавления по 200 мкл/лунка раствора DPBS с 0,05% Твин 20 и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). В дальнейшем планшеты промывали раствором PBST. С использованием белка hIL-12 p70 был приготовлен положительный стандарт согласно инструкциям производителя (Mabtech, Mariemont, OH). Образцы положительного стандарта и супернатанта были добавлены в объеме 100 мкл/лунка в лунки в двух повторностях при разведениях 1:50, 1:150, 1:450, 1:1350 и 1:4050. Эти образцы и положительные стандарты были разбавлены с использованием вышеупомянутого блокирующего раствора. Далее планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 4°C. Затем планшеты промывали раствором PBST и инкубировали в течение 1 ч с 100 мкл/лунка моноклональных антител MT618, меченных биотином (mAB MT618-biotin) (Mabtech, Mariemont, OH). После инкубации планшеты снова промывали и инкубировали в течение 1 ч с 100 мкл/лунка с пероксидазой хрена, меченной стрептавидином (Streptavidin-HRP), разбавленной до концентрации 1:1000 блокирующим буферным раствором. Потом планшеты снова промывали раствором PBST и определяли связывание с помощью тетраметилбензидина (TMB) и 2N раствора H<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O. Планшеты считывали на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Как показано на фиг. 1А и 1В, плазида с последовательностью *huIL12-opt* проявила более высокие уровни экспрессии IL-12 по сравнению с плазмидой с последовательностью *huIL12-nonopt*. Очевидно,

что стратегия по оптимизации кодонов/ РНК повышает экспрессию IL-12.

Пример 2. Усиление специфических клеточных иммунных ответов на антигены PSA (специфический антиген простаты) и PSMA (простатический специфический мембранный антиген), вызванных вакцинацией плазмидой pMacIL12-opt.

Макак резусов иммунизировали 1 мг PSA и PSMA в комбинации с 0,04 мг плазмиды pMacIL12-opt внутримышечно с последующей электропорацией с помощью устройства Celectra компании Inovio Pharmaceuticals. Через две недели после каждой иммунизации у макак резусов отбирали кровь и изолировали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) для количественного определения PSA- и PSMA методом иммуноферментных пятен (ELISpot) со специфическим IFN-γ. Для группы животных, получивших плазмиду pMacIL12-opt, показано 3-кратное увеличение пикового ответа по сравнению с группой животных, не получивших плазмиду pMacIL12-opt (фиг. 2).

Пример 3. Усиление специфических клеточных иммунных ответов на коровый и поверхностный антигены вируса гепатита В (ВГВ), вызванных вакцинацией плазмидой pMacIL12-opt.

Макак резусов иммунизировали 1 мг корового и поверхностного антигена в комбинации с 0,04 мг плазмиды pMacIL12-opt внутримышечно с последующей электропорацией с помощью устройства Celectra компании Inovio Pharmaceuticals. Через две недели после каждой иммунизации у макак резусов отбирали кровь и изолировали PBMC для количественного определения корового и поверхностного антигена методом ELISpot со специфическим IFN-γ. Для группы животных, получивших плазмиду pMacIL12-opt, показано увеличение размера и охвата клеточного ответа по сравнению с группой животных, не получивших плазмиду pMacIL12-opt (фиг. 3).

Перечень последовательностей.

```

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
      Yan, Jian
      Weiner, David B.
      Morrow, Matthew P.
<120> КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ УЛУЧШЕННЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ IL-12,
      ВАКЦИНЫ, ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
<130> 133172.4102
<150> US 61/569,600
<151> 2011-12-12
<160> 5
<170> Патент версии 3.5
<210> 1
<211> 660
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Оптим.нуклеиновая кислота субъединицы р35 IL-12
<400> 1
atgtgccccg ctctggtccct gctgctggtc gctaccctgg tcctgttgga tcacctgtca      60
ctggctcgaa atctgctctgt cgctaccccc gatcctggca tgttccccctg cctgcacat      120
agccagaacc tgctgcgggc cgtgtccaat atgctgcaga aagctagaca gacctggag      180
ttttaccctt gtactttctga ggaatcgac cagcaggata ttactaagga caaaccttc      240
acagtcgaag cctgcctgcc actggagctg accaagaacg aatcatgtct gaatagcagg      300
gagacttcct tcatcaccaa cgggtcttgc ctggctagtc gcaagaccag cttcatgatg      360
gcaactgtgc tgagctccat ctacgaggat ctgaagatgt atcagggtgga attcaaaacc      420
atgaacgcta agctgctgat ggaccctaaa cgacagatct ttctggatca gaatagctg      480
gcagtgattg acgagctgat gcaggccctg aacttcaata gcgaaaccgt cccacagaag      540
tctagtctgg aggaaccgga cttttataag acaaaaatca agctgtgcat tctgctgcat      600
gcctttcggg ttctgggctgt cactattgat cgggtcatgt catacctgaa cgcttcctaa      660

<210> 2
<211> 219
<212> ПРОТЕИН
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Оптим.нуклеиновая кислота субъединицы р35 IL-12
<400> 2
Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu      1
1 5 10 15
Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro      20
20 25 30

```



Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val  
 35 40 45  
 Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys  
 50 55 60  
 Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys  
 85 90 95  
 Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala  
 100 105 110  
 Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr  
 115 120 125  
 Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys  
 130 135 140  
 Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu  
 145 150 155 160  
 Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr  
 165 170 175  
 Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys  
 180 185 190  
 Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr  
 195 200 205  
 Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser  
 210 215

<210> 3  
 <211> 987  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> ОПТИМ. нуклеиновая кислота субъединицы р40 IL-12  
 <400> 3  
 atgtgccatc agcagctggt catctcttgg tttagtctgg tgtttctggc ttctccactg 60  
 gtcgctatct gggaactgaa aaaggatgtg tacgtggtcg agctggactg gtatccagat 120  
 gcacccggag aaatggtggt cctgacctgc gacacacccg aggaagatgg catcacttgg 180  
 accctggacc agagctccga ggtgctggga tctggcaaga cactgactat tcaggtcaaa 240  
 gaattcgggg atgccggaca gtacacatgt cacaaggcg gggaggtgct gagtactca 300  
 ctgctgctgc tgcataagaa agaagacggc atctggtcta ctgacattct gaaggatcag 360  
 aaagagccta agaacaaaac cttcctgaga tgcgaagcta agaattatag tgggaggttt 420  
 acctgttggg ggcctgaccac aatctcaact gacctgacct ttagcgtgaa atctagttag 480  
 gggtaacgag atccacaggg agtgacctgc ggagcagcta cactgagcgc cgagcgggtg 540  
 agaggagaca acaaggagta cgaatatagt gtcgagtgcc aggaagattc agcctgtccc 600  
 cgagccgagg aatccctgcc tatcgaagtg atggtggacg ctgtgcacaa gctgaaatac 660  
 gaaaactaca catctctttt ctttattcgc gacatcatta agccagatcc ccctaaaaac 720  
 ctgcagctga agccccgtaa aaattccga caggtggagg tctcttggga ataccctgat 780  
 acatggagca ctccacattc ttatttcagt ctgacttttt gcgtgcaggg ccagggcaag 840  
 agcaaaaggg agaagaaga cgcgtgttc accgataaga catccgctac tgtcatctgt 900  
 cgaaaaaacg caagcatttc cgtcgggca caggataggt attattccag cagttggtct 960  
 gagtgggctt ccgtcccttg tagttga 987

<210> 4  
 <211> 328  
 <212> ПРОТЕИН  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> ОПТИМ. нуклеиновая кислота субъединицы р40 IL-12  
 <400> 4  
 Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val  
 20 25 30  
 Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu  
 35 40 45  
 Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln  
 50 55 60  
 Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Val  
 85 90 95  
 Leu Ser His Ser Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp  
 100 105 110  
 Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe  
 115 120 125  
 Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp

130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg  
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser  
165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu  
180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile  
195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr  
210 215 220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn  
225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp  
245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr  
260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg  
275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala  
290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser  
305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser  
325

<210> 5  
<211> 18  
<212> ПРОТЕИН  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> лидерная последовательность IgE

<400> 5

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val  
1 5 10 15

His Ser

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу р35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу р40 IL-12 или ее функциональный фрагмент, при этом

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу р35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 1 и кодирующий белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 2, или кодирующая функциональный фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 1 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту с последовательностью SEQ ID № 2, и

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу р40 IL-12 или ее функциональный фрагмент, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 3 и кодирующий белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 4, или кодирующая функциональный фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 3 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту с последовательностью SEQ ID № 4.

2. Композиция по п.1, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р35 IL-12, по меньшей мере на 98% гомологичную последовательности SEQ ID № 1, и которая кодирует белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 2, и

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р40 IL-12, по меньшей мере на 98% гомологичную последовательности SEQ ID № 3, и которая кодирует белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности SEQ ID № 4.

3. Композиция по п.2, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу р35 IL-12, по меньшей мере на 98% гомологичную последовательности SEQ ID № 1, и которая кодирует белок, по меньшей мере

ре на 99% гомологичный последовательности SEQ ID № 2, и

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p40 IL-12, по меньшей мере на 98% гомологичную последовательности SEQ ID № 3, и которая кодирует белок, по меньшей мере на 99% гомологичный последовательности SEQ ID № 4.

4. Композиция по п.3, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p35 IL-12, по меньшей мере на 98% гомологичную последовательности SEQ ID № 1, и кодирует последовательность SEQ ID № 2, и

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p40 IL-12, по меньшей мере на 98% гомологичную последовательности SEQ ID № 3, и кодирует последовательность SEQ ID № 4.

5. Композиция по п.2, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p35 IL-12, по меньшей мере на 99% гомологичную последовательности SEQ ID № 1, и кодирует белок, по меньшей мере на 99% гомологичный последовательности SEQ ID № 2, и

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p40 IL-12, по меньшей мере на 99% гомологичную последовательности SEQ ID № 3, и кодирует белок, по меньшей мере на 99% гомологичный последовательности SEQ ID № 4.

6. Композиция по п.2, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p35 IL-12, по меньшей мере на 99% гомологичную последовательности SEQ ID № 1, и кодирует последовательность SEQ ID № 2, и

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p40 IL-12, по меньшей мере на 99% гомологичную последовательности SEQ ID № 3, и кодирует последовательность SEQ ID № 4.

7. Композиция по п.2, содержащая

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p35 IL-12 и является последовательностью SEQ ID № 1, и

последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует субъединицу p40 IL-12 и является последовательностью SEQ ID № 3.

8. Композиция по п.2, пригодная для доставки пациентам с применением электропорации.

9. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, находится в разных молекулах нуклеиновой кислоты в отличие от последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу p40 IL-12.

10. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, находится в одной плазмиде, а последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, находится в другой плазмиде.

11. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, находятся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты.

12. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, находятся в одной и той же плазмиде.

13. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, находятся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты и функционально связаны с разными промоторами.

14. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, находятся в одной и той же плазмиде и функционально связаны с разными промоторами.

15. Композиция по любому из пп.2-8, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген.

16. Композиция по любому из пп.2-8, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген патогена, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, ВПЧ, ВГС, вирусов гриппа, натуральной оспы, лихорадки Чикунгунья, ящура, возбудителя малярии, вируса цитомегаловируса человека, респираторно-синцитиального вируса человека и MRSA.

17. Композиция по любому из пп.2-8, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12, включены в вирусную частицу.

18. Композиция по любому из пп.2-8, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из интерлейкинов IL-15



30. Композиция по п.19, содержащая а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный фрагмент p35 IL-12, который является последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 1 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту последовательности SEQ ID № 2, не несущей кодирующую последовательность сигнального пептида субъединицы p35 IL-12; и/или б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный фрагмент p40 IL-12, который является последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 3 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности функционального фрагмента последовательности SEQ ID № 4, не несущей кодирующую последовательность сигнального пептида субъединицы p40 IL-12.

31. Композиция по п.30, содержащая а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный фрагмент p35 IL-12, который является последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 1 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту последовательности SEQ ID № 2, функционально связанной с кодирующей последовательностью, которая кодирует сигнальный пептид, и/или б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент p40 IL-12, который является последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 3 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности функционального фрагмента SEQ ID № 4, функционально связанной с кодирующей последовательностью, которая кодирует сигнальный пептид.

32. Композиция по п.30, содержащая а) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент p35 IL-12, который является последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 1 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный функциональному фрагменту последовательности SEQ ID № 2, функционально связанной с кодирующей последовательностью, которая кодирует последовательность SEQ ID № 5, и/или б) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую функциональный фрагмент p40 IL-12, который является последовательностью нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 98% гомологичной последовательности SEQ ID № 3 и кодирующей белок, по меньшей мере на 98% гомологичный последовательности функционального фрагмента SEQ ID № 4, функционально связанной с кодирующей последовательностью, которая кодирует последовательность SEQ ID № 5.

33. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, находится в разных молекулах нуклеиновой кислоты в отличие от последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент.

34. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, находится в разных плаزمиде в отличие от последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент.

35. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, находится в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, как и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент.

36. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, находится в одной и той же плазмиде, как и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент.

37. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент, находятся в одной и той же плазмиде и функционально связаны с разными промоторами.

38. Композиция по п.1, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген.

39. Композиция по п.1, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген патогена, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, ВПЧ, ВГС, вирусов гриппа, натуральной оспы, лихорадки Чикунгунья, ящура, возбудителя малярии, вируса цитомегаловируса человека, респираторно-синцитиального вируса человека и MRSA.

40. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p35 IL-12 или ее функциональный фрагмент, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая субъединицу p40 IL-12 или ее функциональный фрагмент, включены в вирусную частицу.

41. Композиция по п.1, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков, выбранных из группы, состоящей из интерлейкинов IL-15 и IL-28.



55. Молекула нуклеиновой кислоты по п.46, состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, является последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей собой фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, который по меньшей мере на 98% гомологичен последовательности SEQ ID № 1 и кодирует последовательность SEQ ID № 2; и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, является последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей собой фрагмент нуклеиновой кислоты, который по меньшей мере на 98% гомологичен последовательности SEQ ID № 3 и кодирует последовательность SEQ ID № 4.

57. Молекула нуклеиновой кислоты по п.46, состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, является последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей собой фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 99% гомологичный последовательности SEQ ID № 1, и кодирует последовательность SEQ ID № 2; и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, является последовательностью нуклеиновой кислоты, представляющей собой фрагмент нуклеиновой кислоты, который по меньшей мере на 99% гомологичен последовательности SEQ ID № 3 и кодирует последовательность SEQ ID № 4.

59. Молекула нуклеиновой кислоты по п.46, состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, не несет кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислоты 1-22 последовательности SEQ ID NO: 1.

ID № 2; и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, не несет кодирующую последовательность, которая кодирует аминокислоты 1-22 последовательности SEQ ID № 4.

60. Молекула нуклеиновой кислоты по п.59, состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, дополнительно содержит кодирующую последовательность, кодирующую сигнальный пептид; и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, дополнительно содержит кодирующую последовательность, кодирующую сигнальный пептид.

61. Молекула нуклеиновой кислоты по п.59, состоящая из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р35 IL-12, дополнительно содержит кодирующую последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID № 5; и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая функциональный фрагмент субъединицы р40 IL-12, дополнительно содержит кодирующую последовательность, кодирующую последовательность SEQ ID № 5.

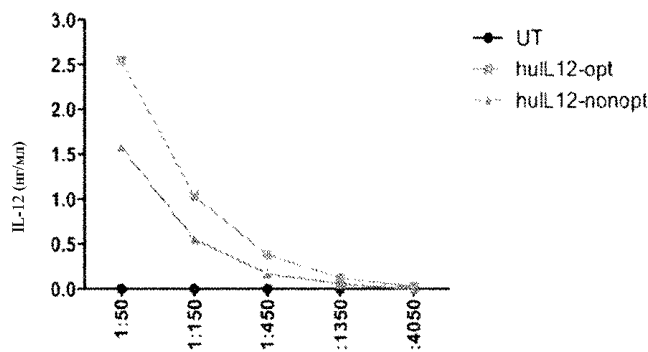
62. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.46-61, пригодная для доставки пациентам с применением электропорации.

63. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.46-61, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты является плазмидой.

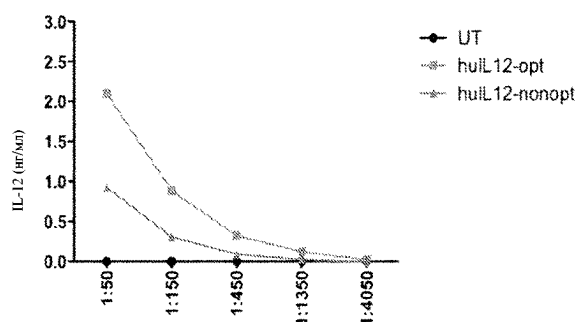
64. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.46-61, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген.

65. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.46-61, дополнительно содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуноген патогена, выбранного из группы, состоящей из ВИЧ, ВПЧ, ВГС, вирусов гриппа, натуральной оспы, лихорадки Чикунгунья, ящура, возбудителя малярии, вируса цитомегаловируса человека, респираторно-синцитиального вируса человека и MRSA.

66. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.46-61, отличающаяся тем, что включена в вирусную частицу.



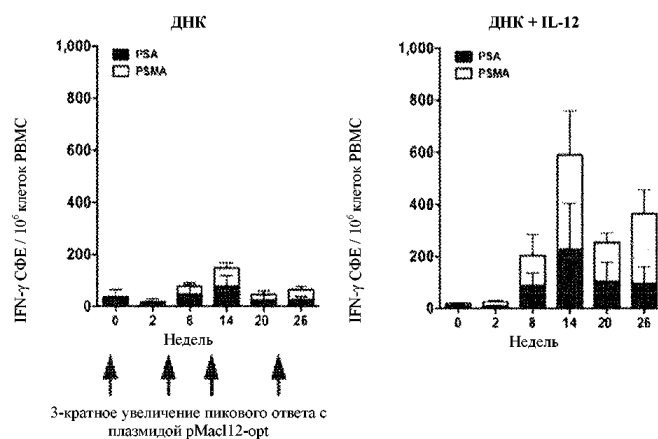
Фиг. 1А. 2 мкг ДНК IL-12.



Фиг. 1В. 4 мкг ДНК IL-12.

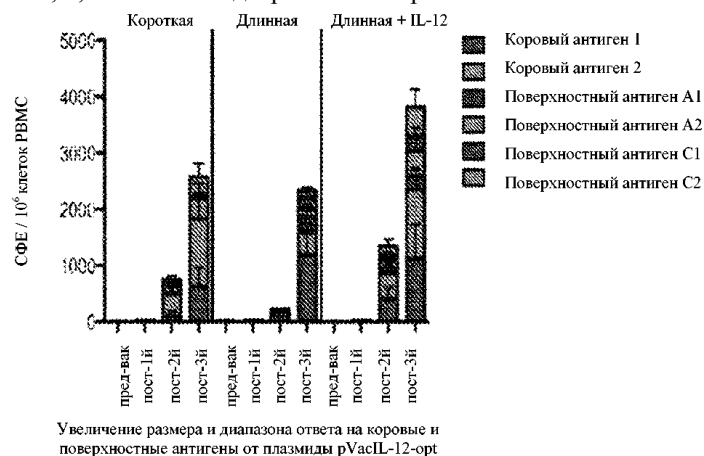


Результаты определения PSA- и PSMA через специфический IFN- $\gamma$  методом ELISpot у нечеловекообразных приматов, иммунизированных 1 мг PSA, 1мг PSMA, получивших внутримышечно 0,04 мг плазмиды pMacIL-12-opt.



Фиг. 2

Т-клеточные ответы против антигенов вируса гепатита В (ВГВ) (определенные методом ELISpot), по 1 мг каждого антигена, 0,04 мг плазмиды pVacIL-12-opt.



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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