

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390460 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.30

(51) Int. Cl. C07K 14/18 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.30

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ЧИКУНГУНЯ И ВИРУСЫ СИНДБИС И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/059,777

(32) 2020.07.31

(33) US

(86) PCT/US2021/043991

(87) WO 2022/026885 2022.02.03

(88) 2022.04.07

(71) Заявитель:

РЕПЛИКЕЙТ БАЙОСАЙЕНС, ИНК.
(US)

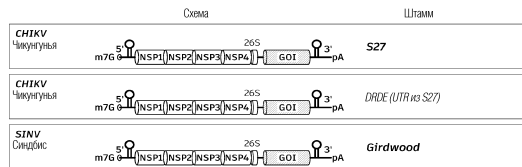
(72) Изобретатель:

Ван Натаниэль Стефен, Мияке-
Стоунер Сигеки Джозеф (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к области молекулярной вирусологии, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие модифицированные вирусные геномы или репликоны, фармацевтические композиции, содержащие их, и применение таких молекул и композиций нуклеиновой кислоты для получения желаемых продуктов в клеточных культурах или в живом организме. Также настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, а также к способам профилактики и/или лечения различных патологических состояний.



A1

202390460

202390460

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577195EA/061

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИРУСЫ ЧИКУНГУНЬЯ И ВИРУСЫ СИНДБИС И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Область изобретения

[0001] Настоящее раскрытие относится к области молекулярной вирусологии и иммунологии, и в частности, относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим модифицированные вирусные геномы и репликоны, фармацевтическим композициям, содержащим их, и к применению таких молекул нуклеиновой кислоты и композиций для получения желаемых продуктов в клеточных культурах или в живом организме. Также настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, а также к способам профилактики и/или лечения различных заболеваний.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0002] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США с серийным номером 63/059777, поданной 31 июля 2020 г., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки, включая все чертежи.

Включение перечня последовательностей

[0003] Эта заявка содержит перечень последовательностей, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки. Прилагаемый текстовый файл Список последовательностей под названием «058462-501001WO_Sequence Listing_ST25.txt» был создан 15 июля 2021 г. и имеет размер 58 Кб.

Уровень техники

[0004] В последние годы несколько различных групп вирусов животных подверглись генетической манипуляции либо путем гомологичной рекомбинации, либо путем прямого конструирования их геномов. Наличие систем обратной генетики как для ДНК-, так и для РНК-вирусов открыло новые перспективы для применения рекомбинантных вирусов, например, в качестве вакцин, экспрессионных векторов, противоопухолевых средств, векторов для генной терапии и средств доставки лекарственных средств.

[0005] Например, для экспрессии гетерологичных белков в культивируемых рекомбинантных клетках используется множество экспрессионных векторов на основе вирусов. Например, применение модифицированных вирусных векторов для экспрессии генов в клетках-хозяевах продолжает расширяться. Недавние достижения в этом отношении включают дальнейшую разработку способов и систем для получения мультисубъединичных белковых комплексов и коэкспрессию белок-модифицирующих ферментов для улучшения продукции гетерологичных белков. Другие недавние достижения в области технологий вирусных экспрессионных векторов включают множество усовершенствованных применений геномной инженерии для контроля экспрессии генов, получения вирусных векторов, применения генной терапии *in vivo* и

создания векторов для доставки вакцин.

[0006] Однако сообщалось, что в клетках-хозяевах могут развиваться сложные и мощные механизмы для обнаружения и противодействия инвазии патогенов. Кроме того, сообщалось, что вирусы, в частности, патогенные вирусы, эволюционировали вместе с клетками-хозяевами для противодействия механизмам этой клеточной защиты от инфекции и репликации. В результате инфекции многие клетки-хозяева «отключают» механизм трансляции клеточных белков, чтобы контролировать репликацию вируса и/или продукцию потомства вируса, которое потенциально может распространиться на другие клетки. Это явление обычно называют «врожденным иммунным ответом». Инфицированные клетки также посылают сигналы опасности другим клеткам, локально и системно, для генерации противовирусного состояния и контроля инфекции. Хотя эти клеточные противовирусные системы приносят пользу клеткам-хозяевам, они также могут оказывать негативное влияние на самоамплифицирующиеся РНК (называемые репликонами), предназначенные для экспрессии полезных вакцинных антигенов или терапевтических агентов. Например, если клетка обнаруживает РНК-репликон, экспрессирующий полезный белок, и активирует свои механизмы врожденной иммунной защиты, то это может повлиять на экспрессию полезного белка в такой клетке и эффективность репликона может быть поставлена под угрозу.

[0007] Следовательно, по-прежнему существует потребность в более эффективных методах и системах для экспрессии представляющих интерес продуктов на платформах экспрессии на основе РНК-репликонов.

Сущность изобретения

[0008] Настоящее раскрытие, в общем, относится к разработке иммунотерапевтических средств, таких как конструкции рекомбинантных нуклеиновых кислот, и фармацевтическим композициям, включающим их, для применения в профилактике и лечении различных патологических состояний, таких как пролиферативные заболевания и микробные инфекции. В частности, как более подробно описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям нуклеиновой кислоты, содержащим последовательности, кодирующие альфавирусный модифицированный геном или репликон вируса Чикунгунья (СНКV) или вируса Синдбис (SINV), который не имеет по меньшей мере участка последовательности вирусной нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков вируса. Также раскрываются рекомбинантные клетки и трансгенные животные, которые были сконструированы для включения одной или более конструкций нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем документе, способы получения представляющей интерес молекулы, фармацевтические композиции, включающие одно или более из следующего: (a) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, (b) полипептид по настоящему изобретению, (c) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению. Кроме того, в конкретных аспектах настоящее изобретение относится к композициям и способам для индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, и/или для

профилактики и/или лечения различных патологических состояний, включая пролиферативные заболевания (например, рак) и хронические инфекции.

[0009] В одном аспекте настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или РНК-репликон вируса Чикунгунья (CHIKV), где модифицированный геном или РНК-репликон CHIKV не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

[0010] В одном аспекте настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или РНК-репликон вируса Синдбис (SINV), где модифицированный геном или РНК-репликон SINV не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

[0011] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет значительного участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки.

[0012] В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают одну или более экспрессионных кассет, где каждая из экспрессионных кассет включает промотор, функционально связанный с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из экспрессионных кассет включает субгеномный (sg) промотор, функционально связанный с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления промотор sg представляет собой субгеномный промотор 26S. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают одну или более нетранслируемых областей (UTR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из UTR представляет собой гетерологичную UTR.

[0013] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из экспрессионных кассет включает кодирующую последовательность представляющего интерес гена (GOI). В некоторых вариантах осуществления GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из терапевтического полипептида, профилактического полипептида, диагностического полипептида, нутрицевтического полипептида, промышленного фермента и репортерного полипептида. В некоторых вариантах осуществления GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антитела,

антигена, иммуномодулятора, фермента, сигнального белка и цитокина. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована для экспрессии на более высоком уровне, чем уровень экспрессии референсной кодирующей последовательности.

[0014] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

[0015] В одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления животная клетка представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления животная клетка представляет собой клетку насекомого. В некоторых вариантах осуществления клетка насекомого представляет собой клетку комара. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки CV1 обезьяны, трансформированной SV40 (COS-7), клетки почки эмбриона человека (например, НЕК 293 или клетка НЕК 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), мышинной клетки Сертоли (например, клетки ТМ4), клетки почки обезьяны (CV1), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки печени человека (Нер G2), клетки рака молочной железы мыши (ММТ 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки CHME5 человека, клетки PER.C6 человека, клетки мышинной миеломы NS0, клетки плоскоклеточной карциномы гортани человека, фибробласта человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, эндотелиальной клетки человека, астроцитарной клетки человека, макрофагальной клетки человека, клетки RAW 264.7 человека, клетки 3T3 мыши, клетки L929 мыши, клетки соединительной ткани мыши, мышечной клетки мыши и клетки почки кролика. Также в родственном аспекте изобретение относится к клеточным культурам, которые включают по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, раскрытую в настоящем изобретении, и культуральную среду.

[0016] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к трансгенным животным, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем

изобретении. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления трансгенное млекопитающее представляет собой млекопитающее, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления трансгенное насекомое представляет собой трансгенного комара.

[0017] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения полипептида, кодированного представляющим интерес геном (GOI), где способы включают (i) разведение животного, раскрытого в настоящем изобретении, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении, в условиях, когда рекомбинантная клетка продуцирует полипептид, кодированный GOI.

[0018] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида у субъекта, где способы включают введение субъекту конструкции нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека. В еще одном аспекте в настоящем изобретении обеспечиваются рекомбинантные полипептиды, полученные способом по настоящему изобретению.

[0019] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим фармацевтически приемлемый эксципиент и: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; b) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; и/или c) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению.

[0020] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, включающим рекомбинантную клетку, конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления композиции включают рекомбинантный полипептид, раскрытый в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, формулированным в липосоме, наночастице на основе липидов (LNP) или полимерной

наночастице. В некоторых вариантах осуществления композиции представляют собой иммуногенные композиции. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции составляют в виде вакцины. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции являются по существу неиммуногенными для субъекта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют в виде адьюванта. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют для одного или более из интраназального введения, интранодального введения, чрескожного введения, внутривентриального введения, внутримышечного введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, интраокулярного, перорального и ректального введения.

[0021] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

[0022] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам профилактики и/или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию по любому пункту раскрытия.

[0023] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов по изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние представляет собой пролиферативное заболевание или микробную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или имеет подозрение на наличие патологического состояния, ассоциированного с пролиферативным заболеванием или микробной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления введенная композиция приводит к увеличению продукции интерферона у субъекта. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят субъекту индивидуально в виде единственной терапии (монотерапии) или в виде первой терапии в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной терапией. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургического вмешательства.

[0024] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к наборам для индукции иммунного ответа, для профилактики и/или лечения патологического состояния или микробной инфекции, где набор включает: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по

настоящему изобретению; b) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; c) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

[0025] Каждый из аспектов и вариантов осуществления, описанных в настоящем изобретении, можно использовать вместе, если они не исключаются явным или ясным образом из контекста варианта осуществления или аспекта.

[0026] Приведенная выше сущность изобретения носит исключительно иллюстративный характер и никоим образом не предназначена для ограничения. В дополнение к иллюстративным вариантам осуществления и признакам, описанным здесь, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки раскрытия станут полностью очевидными из чертежей, подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

[0027] На фиг. 1 приведено графическое представление трех неограничивающих примеров модифицированных конструкций альфавирусного генома в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, в которых последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вирусные структурные белки исходного вируса, была полностью делецирована. Показаны неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. Неограничивающий пример модифицированной конструкции СHКV основан на штамме S27 СHКV и, кроме того, может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного промотора 26S. Неограничивающий пример модифицированной конструкции СHКV также может быть основан на штамме СHКV DRDE-06, содержит 3'-UTR, полученную из штамма СHКV S27, и, кроме того, может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного гена 26S. Неограничивающий пример модифицированной конструкции SINV может быть основан на штамме SINV Girdwood и, кроме того, может содержать гетерологичный ген (GOI), помещенный под контроль субгеномного промотора 26S.

[0028] На фиг. 2A приведена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса pRB_008 Alpha-VEE-LAMP-HPV16 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, в которой последовательности, кодирующие модифицированный VEEV, включены в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, онкобелков E6/E7 вируса папилломы человека (HPV).

[0029] На фиг. 2B представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса pRB_009 Alpha-СHКV-S27-LAMP-HPV16 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, в которой последовательности, кодирующие модифицированный СHКV S27, включены в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, онкобелков E6/E7 вируса папилломы человека (HPV).

[0030] На фиг. 2C представлена графическая иллюстрация примерной конструкции

на основе РНК-репликона альфавируса рRB_017 Alpha-CHIKV-DRDE-S27-LAMP-HPV16 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательности, кодирующие модифицированный CHIKV DRDE, включены в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, онкобелков E6/E7 вируса папилломы человека (HPV).

[0031] На фиг. 2D представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса рRB_017 Alpha-SIND-G-DLP-LAMP-HPV16 в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательности, кодирующие модифицированный геном SINV Girdwood, включены в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, онкобелков E6/E7 вируса папилломы человека (HPV).

[0032] На фиг. 3A представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса VEE-NA в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном VEEV, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, предшественника гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А H5N1.

[0033] На фиг. 3B представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса CHIKV-S27-NA в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном CHIKV S27, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, предшественника гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А H5N1.

[0034] На фиг. 3C представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса CHIKV-DRDE-NA в соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном CHIKV DRDE, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности типичного представляющего интерес гена (GOI), например, предшественника гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А H5N1.

[0035] На фиг. 3D представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса SIND-GW-NA в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном SINV Girdwood, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, предшественника гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А H5N1.

[0036] На фиг. 3E представлена графическая иллюстрация примерной конструкции

на основе РНК-репликона альфавируса VEE-Онкология в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном VEEV, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например последовательности синтетической кассеты, кодирующей гены или участки генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (ESR1, HER2 и HER3).

[0037] На фиг. 3F представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса CHIKV-S27-Онкология в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном CHIKV S27, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, последовательности синтетической кассеты, кодирующей гены или участки генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (ESR1, HER2 и HER3).

[0038] На фиг. 3G представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса CHIKV-DRDE-Онкология в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном CHIKV DRDE, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, последовательности синтетической кассеты, кодирующей гены или участки генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (ESR1, HER2 и HER3).

[0039] На фиг. 3H представлена графическая иллюстрация примерной конструкции на основе РНК-репликона альфавируса SIND-GW-Онкология в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которой последовательность, кодирующая модифицированный геном SINV Girdwood, включена в экспрессионные векторы, которые также включают кодирующие последовательности примерного представляющего интерес гена (GOI), например, последовательности синтетической кассеты, кодирующей гены или участки генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями (ESR1, HER2 и HER3).

[0040] На фиг. 4 представлен график, показывающий активность примерного экспрессированного трансгена из векторов, полученных из CHIKV или SINV, кодирующих люциферазу светлячков с красным свечением, демонстрируя, что данные векторы способны к репликации РНК и последующей экспрессии трансгенов, которые проявляют биологическую функцию. Векторы, описанные в примерах 1 и 2, используют для получения РНК-репликона с помощью IVT и трансформируют в клетки ВНК-21 в двух повторностях. Через 18-20 ч после трансфекции ферментативную активность люциферазы светлячков с красным свечением, генерированную трансформированными клетками, количественно анализируют с использованием протокола системы анализа

люциферазы (Promega). RLU: относительные световые единицы.

[0041] На фиг. 5А графически показано, что на антиген-специфические Т-клеточные ответы по-разному влияют остовы векторов (день 14 после праймирования для каждого вектора). Введение *in vivo* полученных из CHIKV и SINV векторов, кодирующих антиген HA из H5N1, мышам BALB/c индуцирует антигенспецифические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы и ответную выработку функциональных антител. CHIKV- и SINV-векторы могут иметь преимущества или недостатки в отношении генерации Т-клеточного ответа по сравнению с векторами, полученными из VEE, что демонстрирует их пригодность в качестве векторов для вакцин или биотерапевтических средств. Среднее геометрическое значение с геометрическим SD. Однофакторный ANOVA.

[0042] На фиг. 5В графически показана ответная выработка нейтрализующих антител после иммунизации каждым вектором. Титры HAI определяли на день 14 после прайм-инъекции (левая панель) или после буст-инъекции (правая панель) для каждого вектора. Введение *in vivo* векторов, полученных из CHIKV и SINV, кодирующих антиген HA из H5N1, мышам BALB/c индуцирует антигенспецифические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы и ответную выработку функциональных антител. CHIKV- и SINV-векторы могут иметь преимущества или недостатки в отношении генерации Т-клеточного ответа по сравнению с векторами, полученными из VEE, что демонстрирует их пригодность в качестве векторов для вакцин или биотерапевтических средств. SFU: пятнообразующие единицы. Среднее геометрическое значение с геометрическим SD. Однофакторный ANOVA.

[0043] На фиг. 6 представлен график, показывающий вектор-зависимые дифференциальные Т-клеточные ответы (день 14 после буст-иммунизации каждым вектором), индуцированные некоторыми, но не всеми антигенами. Введение *in vivo* векторов, полученных из CHIKV и SINV, кодирующих активирующие мутации из ESR1 и PI3K, наряду с усеченным белком HER2 и белком HER3 с подавленной киназной активностью, у мышей BALB/c индуцирует устойчивые Т-клеточные ответы. Ответы варьировались в зависимости от определенного антигена, а также от каждого вектора и, таким образом, преимущества или недостатки в генерации Т-клеточных ответов по сравнению с векторами, полученными из VEE, свидетельствуют об их пригодности в качестве векторов для вакцин или биотерапевтических средств. Среднее геометрическое значение с геометрическим SD. Однофакторный ANOVA.

Подробное описание изобретения

[0044] В настоящем изобретении раскрыты, среди прочего, вирусные экспрессионные системы с улучшенным потенциалом экспрессии, которые подходят для экспрессии гетерологичных молекул, например, таких как вакцины и терапевтические полипептиды, в рекомбинантных клетках. Например, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям нуклеиновой кислоты, например, таким как экспрессионные конструкции и векторы, содержащие модифицированный геном или РНК-репликон вируса Чикунгунья (CHIKV) или вируса Синдбис (SINV), в

которых был делецирован по меньшей мере участок исходной вирусной последовательности, кодирующей структурные белки. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к экспрессионным векторам на вирусной основе, включающим одну или более экспрессионных кассет, кодирующих гетерологичный полипептид. Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, которые генетически сконструированы для включения одной или более молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем изобретении. Биоматериалы и рекомбинантные продукты, полученные из таких рекомбинантных клеток, также входят в объем настоящего изобретения. Также настоящее изобретение относится к композициям и способам, пригодным для индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, а также к способам профилактики и/или лечения различных заболеваний.

[0045] Самоамплифицирующиеся РНК (репликоны) на основе РНК-вирусов (например, альфавирусов) можно использовать в качестве надежных систем экспрессии. Например, сообщалось, что преимущество использования альфавирусов, таких как СНКV и SINV, в качестве вирусных экспрессионных векторов заключается в том, что они могут направлять синтез больших количеств гетерологичных белков в рекомбинантных клетках-хозяевах. Среди других преимуществ полипептиды, такие как терапевтические одноцепочечные антитела, могут быть наиболее эффективными, если экспрессируются на высоких уровнях *in vivo*. Кроме того, для получения рекомбинантных антител, выделенных из клеток в культуре (*ex vivo*), высокая экспрессия белка из РНК-репликона может увеличить общий выход продукта-антитела. Кроме того, если экспрессируемый белок представляет собой вакцинный антиген, то высокий уровень экспрессии может индуцировать наиболее сильный иммунный ответ *in vivo*.

[0046] Альфавирусы используют мотивы, находящиеся в их UTR, структурных и неструктурных областях, чтобы оказывать влияние на их репликацию в клетках-хозяевах. Эти области также имеют механизм уклонения от врожденного иммунитета клетки-хозяина. Однако сообщалось о значительных различиях между видами альфавирусов. Например, в альфавирусах Нового Света и Старого Света развились разные компоненты для использования стрессовых гранул, сигнального пути JAK-STAT, белков FXR и G3BP в клетках для сборки комплексов репликации вируса. Какая часть генома содержит эти компоненты, также различается у альфавирусов. Например, обход активации PKR и последующее фосфорилирование EIF2-альфа осуществляется через даунстрим петлю в некоторых альфавирусах Старого Света, таких как Синдбис, но полагается, что обход этого пути осуществляется через NSP4 в вирусе Чикунгунья, у которого отсутствует узнаваемый DLP. Кроме того, помимо различий между отдельными альфавирусами, часто имеются различия внутри штаммов альфавирусов, которые могут объяснять изменения таких характеристик, как вирулентность. Например, различия в последовательности между североамериканскими и южноамериканскими штаммами вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV) приводят к изменению способности модулировать путь

STAT1, что приводит к дифференциальной индукции интерферонов типа I и, как следствие, к изменениям вирулентности.

[0047] Учитывая различное присутствие аттенуирующих факторов клетки-хозяина в неструктурных и структурных областях альфавирусов, делеция структурных генов для обеспечения экспрессии гетерологичных генов в синтетических векторах будет иметь различные последствия для отдельных векторов. Синтетические репликоны с различными аттенуирующими факторами хозяина в неструктурных областях будут по-разному индуцировать иммунные ответы на экспрессированные гетерологичные гены. Способность вируса Чикунгунья обходить активацию PKR и последующее фосфорилирование EIF2-альфа за счет мотивов, сохраненных в областях NSP, надежная активация интерферонов типа I и способность использовать стрессовые гранулы, передачу сигналов JAK-STAT и белки G3BP делают его предпочтительным для применения в качестве вакцинного вектора. И наоборот, неспособность авирулентных штаммов Синдбис Girdwood ингибировать STAT1 делает его предпочтительным вектором для экспрессии гетерологичных белков без формирования устойчивого иммунного ответа против кодированного белка. В качестве дополнительного примера, штамм SINV S.A.AR86 (AR86) быстро и устойчиво ингибирует фосфорилирование тирозина в STAT1 и STAT2 в ответ на IFN- γ и/или IFN- β . Уникальный треонин в положении 538 в AR86 nsP1 приводит к более медленному процессингу неструктурных белков и задержке синтеза субгеномной РНК из родственного штамма SINV Girdwood, что способствует развитию фенотипа нейровирулентности у взрослых мышей, и может быть преимущественным для кинетики и выхода экспрессии гетерологичного белка и способствуют более сильному иммунному ответу на вакцинный антиген, экспрессированный из репликона векторов на основе AR86. Преимущества, которые дают эти отдельные векторы, до сих пор были полностью не изучены и непредсказуемы.

[0048] Как более подробно описано ниже, первоначальное наблюдение показало, что общедоступные геномные данные по альфавирусам не всегда содержат нуклеотидные последовательности, способные к прямой замене последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих структурные белки, на представляющий интерес ген (GOI), что приводит к получению самореплицирующейся РНК и трансген-экспрессирующих репликонов. Например, оказалось возможным заменить ген структурного полипротеина в штамме CHIKV S27 (Genbank AF369024) на синтетический ген HPV E6/E7 (ген E6/E7 вируса папилломы человека) (см., например, фиг. 2B) или ген предшественника гемагглютинина (HA) H5N1 вируса гриппа А (см., например, фиг. 3B) или ген люциферазы светлячков с красным свечением с получением репликона, способного к репликации РНК и экспрессии трансгена в трансфектированных клетках ВНК-21, однако последовательности генов, использованные для аналогичной замены гена структурного полипротеина в штамме CHIKV DRDE-06 (Genbank EF210157) были не способны подвергаться репликации РНК или экспрессировать трансген. Таким образом, простой замены структурных белков CHIKV гетерологичными генами с использованием

доступных опубликованных последовательностей не обязательно должно быть достаточно для создания функциональных репликонов. Иными словами, для создания репликонных систем, подходящих для применения в вакцинах и терапевтических средствах, требуется дополнительное конструирование, такое как использование гетерологичных последовательностей 5'- и/или 3'-UTR.

[0049] Примечательно, что, несмотря на многочисленные эволюционные расхождения в последовательности, обнаруженные в геномах штаммов CHIKV S27 и DRDE-06, представленные здесь экспериментальные данные показали, что функциональный репликон штамма CHIKV DRDE может быть получен путем замены 3'-UTR DRDE на 3'-UTR штамма CHIKV S27 (см., например, фиг. 2C). Кроме того, было установлено, что платформы репликонных систем CHIKV и SINV, описанные здесь, способны экспрессировать высокие уровни представляющих интерес гетерологичных полипептидов.

Определения

[0050] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях, термины с общепринятыми значениями определены здесь для ясности и/или для справочной информации, и включение таких определений здесь не обязательно должно истолковываться как существенное различие в определении термина с тем, как обычно понимается в данной области. Многие из методов и процедур, описанных или упомянутых в настоящем изобретении, хорошо понятны и обычно используются специалистами в данной области с использованием традиционной методологии.

[0051] Формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если в контексте ясно не указано иное. Например, термин «клетка» включает одну или более клеток, включая их смеси. «А и/или В» используется здесь для включения всех следующих альтернатив: «А», «В», «А или В» и «А и В».

[0052] Термин «введение», используемый в настоящем изобретении, относится к доставке биологически активной композиции или состава путем введения, включающим, помимо прочего, интраназальное, чрескожное, внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, интранодальное, интратуморальное, внутрисуставное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, пероральное, ректальное, интравагинальное, интраокулярное и местное введение или их комбинации. Термин включает, не ограничиваясь этим, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

[0053] Термины «клетка», «клеточная культура» и «клеточная линия» относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, клеточной культуре или клеточной линии, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки, клеточной культуры, или клеточной линии, независимо от количества трансфекций или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомство в точности идентично родительской клетке. Это

связано с тем, что определенные модификации могут возникнуть в последующих поколениях в результате мутации (например, преднамеренных или непреднамеренных мутаций) или влияния окружающей среды (например, метилирования или других эпигенетических модификаций), так что потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему включается в объем термина, используемого в настоящем изобретении, при условии, что потомство сохраняет ту же функциональность, что и исходная клетка, клеточная культура или клеточная линия.

[0054] Термин «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» композиции по настоящему изобретению, например, конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, в общем, относится к количеству, достаточному для того, чтобы композиция достигла заявленной цели по сравнению с отсутствием композиции (например, для достижения эффекта, ради которого ее вводят, стимуляции иммунного ответа, профилактики или лечения заболевания, или ослабления одного или более симптомов заболевания, расстройства, инфекции или патологического состояния). Примером «эффективного количества» является количество, достаточное для лечения, профилактики или ослабления симптома или симптомов заболевания, которое также можно назвать «терапевтически эффективным количеством». «Ослабление» симптома означает уменьшение тяжести или частоты проявления симптома(ов) или устранение симптома(ов). Точное количество композиции, включая «терапевтически эффективное количество», будет зависеть от цели лечения и будет определяться специалистом в данной области с использованием известных методов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vol. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0055] Когда приводится диапазон значений, то подразумевается, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятой доли нижнего предела, если контекст явно не предписывает иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне, находится в пределах настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охватываться настоящим изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает одно или оба из пределов, то диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включаются в настоящее изобретение.

[0056] Определенные диапазоны представлены здесь с числовыми значениями, которым предшествует термин «примерно», который, как он используется в настоящем описании, имеет свое обычное значение приблизительно. Термин «приблизительно» используется в настоящем описании для обеспечения буквенной поддержки точного

числа, которому он предшествует, а также числа, которое близко к числу или приблизительно представляет собой число, которому термин предшествует. Для определения того, является ли число близким к числу или приблизительно конкретно указанным числом, близкое или приблизительно неуказанное число может представлять собой число, которое в контексте, в котором оно представлено, предусматривает фактический эквивалент конкретно указанного числа. Если степень приближения неясна из контекста, то «приблизительно» означает либо в пределах плюс-минус 10% от предоставленного значения, либо округленное до ближайшего значащего числа, во всех случаях, включая предоставленное значение.

[0057] Термин «конструкция» относится к рекомбинантной молекуле, включающей одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, выделенных из гетерологичных источников. Например, конструкции нуклеиновой кислоты могут представлять собой химерные молекулы нуклеиновой кислоты, в которых две или более последовательностей нуклеиновой кислоты различного происхождения собраны в одну молекулу нуклеиновой кислоты. Таким образом, репрезентативные конструкции нуклеиновой кислоты включают любые конструкции, которые содержат (1) последовательности нуклеиновой кислоты, в том числе регуляторные и кодирующие последовательности, которые не встречаются в природе рядом друг с другом (например, по меньшей мере одна из нуклеотидных последовательностей является гетерологичной по отношению по меньшей мере к одной из других нуклеотидных последовательностей), или (2) последовательности, кодирующие участки функциональных молекул РНК или белков, не смежных в природе, или (3) участки промоторов, которые не являются смежными в природе. Репрезентативные конструкции нуклеиновой кислоты могут включать любые молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, линейные или кольцевые, одноцепочечные или двухцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты ДНК или РНК, полученные из любого источника, такого как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся полинуклеотидная молекула, фаг, способный к геномной интеграции или автономной репликации, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, в которой одна или более последовательностей нуклеиновой кислоты функционально связаны. Конструкции по настоящему изобретению могут включать необходимые элементы для прямой экспрессии представляющей интерес последовательности нуклеиновой кислоты, которая также находится в конструкции. Такие элементы могут включать контрольные элементы, такие как промотор, который функционально связан с представляющей интерес последовательностью нуклеиновой кислоты (чтобы направлять транскрипцию) и необязательно включает последовательность полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция нуклеиновой кислоты может быть включена в вектор. В дополнение к компонентам конструкции вектор может включать, например, один или более селективируемых маркеров, один или более ориджинов репликации, таких как прокариотические и эукариотические ориджины, по меньшей мере один сайт множественного клонирования и/или элементы для облегчения стабильной

интеграции конструкции в геном клетки. Две или более конструкций могут быть включены в одну молекулу нуклеиновой кислоты, такую как один вектор, или могут находиться в двух или более отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, таких как два или более отдельных вектора. «Экспрессионная конструкция» обычно включает по меньшей мере контрольную последовательность, функционально связанную с представляющей интерес нуклеотидной последовательностью. Таким образом, например, промоторы, находящиеся в функциональной связи с экспрессируемыми нуклеотидными последовательностями, обеспечиваются в экспрессионных конструкциях для экспрессии в клетке. Композиции и способы получения и применения конструкций и клеток для практического применения настоящего изобретения известны специалистам в данной области.

[0058] Термин «функционально связанный», используемый в настоящем изобретении, обозначает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, которая позволяет им функционировать предполагаемым образом. Например, термин «функционально связанный» при использовании в контексте молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем изобретении, или кодирующих последовательностей и промоторных последовательностей в молекуле нуклеиновой кислоты, означает, что кодирующие последовательности и промоторные последовательности находятся в рамке считывания и находятся в правильном пространственном и дистанционном расстоянии, для обеспечения влияния соответствующего связывания факторов транскрипции или РНК-полимеразы на транскрипцию. Следует понимать, что функционально связанные элементы могут быть смежными или несмежными (например, связанными друг с другом через линкер). В контексте полипептидных конструкций термин «функционально связанный» относится к физической связи (например, прямой или опосредованной связи) между аминокислотными последовательностями (например, различными сегментами, участками, областями или доменами) для обеспечения описанной активности конструкций. Функционально связанные сегменты, участки, области и домены полипептидов или молекул нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем изобретении, могут быть смежными или несмежными (например, связанными друг с другом через линкер).

[0059] В рамках настоящего изобретения, термин «участок» относится к фрагменту. В отношении конкретной структуры, такой как полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность, или белок, то термин «участок» может обозначать непрерывный или прерывистый фрагмент указанной структуры. Например, участок аминокислотной последовательности содержит, по меньшей мере, 1%, по меньшей мере, 5%, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% и по меньшей мере 90% аминокислот указанной аминокислотной последовательности. В дополнение или альтернативно, если

участок представляет собой прерывистый фрагмент, то указанный прерывистый фрагмент состоит из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более фрагментов структуры (например, доменов белка), где каждый фрагмент является непрерывным элементом конструкции. Например, прерывистый фрагмент аминокислотной последовательности может состоять из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более, например, не более 4 фрагментов указанной аминокислотной последовательности, где каждый фрагмент содержит, по меньшей мере, 1, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5 непрерывных аминокислот, по меньшей мере, 10 непрерывных аминокислот, по меньшей мере, 20 непрерывных аминокислот или по меньшей мере, 30 непрерывных аминокислот аминокислотной последовательности.

[0060] Когда приводится диапазон значений, то подразумевается, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятой доли нижнего предела, если контекст явно не предписывает иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне, находится в пределах настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охватываться настоящим изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает одно или оба из пределов, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включаются в настоящее изобретение.

[0061] Термин «процент идентичности», используемый здесь в контексте двух или более нуклеиновых кислот или белков, относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислот, которые являются одинаковыми (например, приблизительно 60% идентичность последовательностей, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокая идентичность в указанной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или в обозначенной области) при измерении с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или путем ручного выравнивания и визуального осмотра. См., например, веб-сайт NCBI по адресу ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Такие последовательности затем называются «по существу идентичными». Данное определение также относится или может быть применено к комплементу последовательности. Данное определение также включает последовательности с делециями и/или добавлениями, а также последовательности с заменами. Идентичность последовательности можно рассчитать с использованием опубликованных методов и широко доступных компьютерных программ, таких как пакет программного обеспечения GCS (Devereux et al., *Nucleic Acids Res.* 12:387, 1984), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403, 1990). Идентичность последовательности может быть измерена с использованием программного обеспечения для анализа последовательности, такого как пакет программного

обеспечения для анализа последовательностей Компьютерной группы по генетике в Центре биотехнологии Университета Висконсина (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), с его параметрами по умолчанию.

[0062] Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент», используемый в настоящем изобретении, относится к любому подходящему веществу, которое представляет собой фармацевтически приемлемый носитель, добавку или разбавитель для введения представляющего(их) интерес соединения(й) субъекту. Таким образом, «фармацевтически приемлемый эксципиент» может включать вещества, называемые фармацевтически приемлемыми разбавителями, фармацевтически приемлемыми добавками и фармацевтически приемлемыми носителями. В рамках настоящего изобретения, термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает, помимо прочего, физиологический раствор, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие всасывание, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Дополнительные активные соединения (например, антибиотики и дополнительные терапевтические агенты) также могут быть включены в композиции.

[0063] В рамках настоящего изобретения, термин «субъект» или «индивидуум» включает животных, таких как человек (например, людей) и животных, отличных от человека. В некоторых вариантах осуществления «субъект» или «индивидуум» представляет собой пациента, находящегося под наблюдением врача. Таким образом, субъект может быть пациентом-человеком или индивидуумом, который имеет, подвергается риску развития или подозревается в наличии представляющего интерес заболевания (например, рака или инфекции) и/или одного или более симптомов заболевания. Субъектом также может быть человек, у которого диагностирован риск развития представляющего интерес заболевания на время постановки диагноза или позднее. Термин «животные, отличные от человека», включает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, приматов, отличных от человека, и других млекопитающих, например, таких как овцы, собаки, коровы, куры, и немлекопитающих, например амфибий, рептилий и т.

[0064] Понятно, что аспекты и варианты осуществления раскрытия, описанные в настоящем изобретении, включают «содержащие», «состоящие» и «по существу состоящие из» аспектов и вариантов осуществления. В рамках настоящего изобретения, термин «содержащий», который является синонимом слова «включающий», «состоящий» или «характеризующийся», является инклюзивным или открытым понятием, не исключающим дополнительных, подразумеваемых элементов и/или стадий осуществления способа. Используемый здесь термин «состоящий из» исключает любые элементы, стадии или ингредиенты, не указанные в заявленной композиции или способе. Используемый здесь термин «по существу состоящий из» не исключает веществ или стадий, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленной композиции или способа. Подразумевается, что любое упоминание в настоящем

изобретении термина «содержащий», в частности, в описании компонентов композиции или в описании стадий способа, охватывает те композиции и способы, которые по существу состоят из или состоят из указанных компонентов или стадий.

[0065] Следует понимать, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны выше и далее в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. Наоборот, различные признаки изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой субкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, конкретно охватываются настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта отдельно и явным образом. Кроме того, все субкомбинации различных вариантов осуществления и их элементы также конкретно охватываются настоящим изобретением и раскрыты здесь точно так же, как если бы каждая такая субкомбинация была раскрыта отдельно и явным образом.

Вирус Чикунгунья (CHIKV) и вирус Синдбис (SINV)

[0066] Вирус Чикунгунья (CHIKV) и вирус Синдбис (SINV) являются членами рода *Alphavirus*, который включает группу генетически, структурно и серологически родственных вирусов группы IV семейства *Togaviridae*. В настоящее время род *Alphavirus* включает, среди прочего, вирус Синдбис (SINV), вирус леса Семлики (SFV), вирус реки Росс (RRV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) и вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), которые все тесно связаны между собой и способны инфицировать различных позвоночных, таких как млекопитающие, грызуны, рыбы, виды птиц, и более крупных млекопитающих, таких как люди и лошади, а также беспозвоночных, таких как насекомые. В частности, хорошо изучены вирус Синдбис (SINV) и вирус леса Семлики (SFV), и цикл развития, способ репликации и т. д. этих вирусов хорошо охарактеризованы. SINV является членом вирусного комплекса Западного энцефалита лошадей, тогда как CHIKV является членом вирусного комплекса леса Семлики и тесно связан с вирусом реки Росс, вирусом О'ньонг-ньонг и вирусом леса Семлики. В частности, было показано, что альфавирусы очень эффективно реплицируются в клетках животных, что делает их ценными в качестве векторов для продукции белка и нуклеиновых кислот в таких клетках. Передача возбудителей между видами и отдельными особями происходит в основном через комаров, что дает основание отнести альфавирусы к арбовирусам или вирусам, переносимым членистоногими.

[0067] Каждый из этих альфавирусов имеет геном, представленный одноцепочечной РНК положительной полярности, заключенный в нуклеокапсид, окруженный оболочкой, содержащей белки вирусных «шипов». Частицы альфавируса имеют оболочку, имеют тенденцию быть сферическими (хотя и немного плеоморфными) и имеют изометрический нуклеокапсид. Геном альфавируса представляет собой одноцепочечную РНК положительной полярности длиной приблизительно 11-12 т.п.н., содержащую 5'-кэп, 3'-поли-А-хвост и две открытые рамки считывания, первая из которых

кодирует неструктурные белки с ферментативной функцией, и вторая рамка считывания кодирует вирусные структурные белки (например, капсидный белок СР, гликопротеин Е1, гликопротеин Е2, белок Е3 и белок 6К).

[0068] 5'-две трети генома альфавируса кодирует ряд неструктурных белков, необходимых для транскрипции и репликации вирусной РНК. Эти белки транслируются непосредственно из РНК и вместе с клеточными белками образуют РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для репликации вирусного генома и транскрипции субгеномной РНК. Четыре неструктурных белка (nsP1-4) продуцируются в виде одного полипротеина, обеспечивающего механизм репликации вируса. Процессинг полипротеина происходит строго регулируемым образом, при этом расщепление в месте соединения Р2/3 влияет на использование матрицы РНК во время репликации генома. Данный участок расположен у основания узкой расщелины и труднодоступен. После расщепления nsP3 создает кольцевую структуру, окружающую nsP2. Эти два белка имеют обширную поверхность раздела. Мутации в nsP2, которые продуцируют нецитопатические вирусы или фенотипы, чувствительные к температуре, кластеризуются в области поверхности раздела Р2/Р3. Мутации Р3, расположенные напротив нецитопатических мутаций nsP2, предотвращают эффективное расщепление Р2/3. Это, в свою очередь, может повлиять на инфекционность РНК, изменяя уровни продукции вирусной РНК.

[0069] 3'-треть генома включает субгеномную РНК, которая служит матрицей для трансляции всех структурных белков, необходимых для формирования вирусных частиц: корового нуклеокапсидного белка С и оболочечных белков Р62 и Е1, которые связываются в виде гетеродимера. Поверхностные гликопротеины вируса, «заякоренные» на мембране, ответственны за распознавание рецепторов и проникновение в клетки-мишени посредством слияния мембран. Субгеномная РНК транскрибируется с субгеномного промотора р26S, находящегося на 3'-конце последовательности РНК, кодирующей белок nsP4. Протеолитическое созревание Р62 в Е2 и Е3 вызывает изменение поверхности вируса. Вместе Е1, Е2 и иногда Е3 гликопротеиновые «шпильки» образуют димер Е1/Е2 или тример Е1/Е2/Е3, где Е2 простирается от центра к вершинам, Е1 заполняет пространство между вершинами, и Е3 может присутствовать на дистальном конце «шпильки». При воздействии на вирус кислым содержимым эндосомы Е1 отделяется от Е2 с образованием гомотримера Е1, который необходим для стадии слияния, чтобы свести вместе клеточные и вирусные мембраны. Альфавирусный гликопротеин Е1 представляет собой слитый белок вируса класса II, который структурно отличается от слитых белков класса I, обнаруженных в вирусе гриппа и ВИЧ. Гликопротеин Е2 функционирует, взаимодействуя с нуклеокапсидом через свой цитоплазматический домен, в то время как его эктодомен ответственен за связывание с клеточным рецептором. Большинство альфавирусов теряют периферический белок Е3, в то время как у вирусов леса Семлики он остается связанным с вирусной поверхностью.

[0070] Сообщалось, что репликация альфавируса происходит на мембранных поверхностях внутри клетки-хозяина. На первой стадии инфекционного цикла 5'-конец

геномной РНК транслируется в полипротеин (nsP1-4) с активностью РНК-полимеразы, который продуцирует отрицательную цепь, комплементарную геномной РНК. На второй стадии отрицательная цепь используется в качестве матрицы для продукции двух РНК соответственно: (1) положительной геномной РНК, соответствующей геному вторичных вирусов, продуцирующей посредством трансляции другие белки nsP и функционирующих в качестве генома для вируса; и (2) субгеномной РНК, кодирующей структурные белки вируса, образующего инфекционные частицы. Соотношение положительной геномной РНК/субгеномной РНК регулируется протеолитическим ауторасщеплением полипротеина до nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. На практике экспрессия вирусного гена происходит в две фазы. В первой фазе происходит основной синтез положительных геномных цепей и отрицательных цепей. Во время второй фазы синтез субгеномной РНК является практически исключительным, что приводит к продукции большого количества структурного белка.

Композиции по изобретению

[0071] Как более подробно описано ниже, один аспект настоящего изобретения относится к конструкциям нуклеиновой кислоты, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный вирусный геном или РНК-репликон, где модифицированный геном или РНК-репликон не имеет (например, не включает) по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков соответствующего немодифицированного вирусного генома или РНК-репликона. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к модифицированному геному или РНК-репликону альфавируса, в котором присутствует последовательность, кодирующая неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, однако по меньшей мере участок или вся последовательность, кодирующая один или более структурных белков, отсутствует. Также настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам и клеточным культурам, которые были сконструированы таким образом, чтобы включать конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении.

А. Конструкции нуклеиновой кислоты

[0072] Как более подробно описано ниже, один аспект настоящего изобретения относится к новым конструкциям нуклеиновой кислоты, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или РНК-репликон альфавируса, такого как вирус Чикунгунья (CHIKV) или вирус Синдбис (SINV). Например, модифицированный геном альфавируса может включать делецию (делеции), замену (замены) и/или инсерцию (инсерции) в одной или более геномных областях исходного генома альфавируса.

[0073] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

модифицированный геном или РНК-репликон СНИКV, где модифицированный геном или РНК-репликон СНИКV не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков немодифицированного генома или РНК-репликона СНИКV, например, модифицированный геном или РНК-репликон СНИКV не имеет по меньшей мере участка кодирующей последовательности одного или более структурных белков СНИКV СР, Е1, Е2, Е3 и 6К. Как вирулентные, так и авирулентные штаммы СНИКV являются подходящими. Неограничивающие примеры штаммов СНИКV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают СНИКV S27, СНИКV LR2006-OPY-1, СНИКV YO123223, СНИКV DRDE, СНИКV 37997, СНИКV 99653, СНИКV Ag41855 и штамм Nagpur (Индия) 653496. Дополнительные примеры штаммов СНИКV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь этим, штаммы, описанные в публикациях Afreen et al., *Microbiol. Immunol.*, 2014, 58:688-696, Lanciotti and Lambert *ASTMH* 2016, 94(4):800-803 и Langsjoen et al., *mBio*. 2018, 9(2): e02449-17. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или РНК-репликон СНИКV происходит из штамма S27 штамма СНИКV. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или РНК-репликон СНИКV происходит из штамма DRDE СНИКV. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном СНИКV или РНК-репликон происходит из штамма СНИКV DRDE-06. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном СНИКV или РНК-репликон происходит из штамма СНИКV DRDE-07.

[0074] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или РНК-репликон SINV, где модифицированный геном или РНК-репликон SINV не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков немодифицированного генома или РНК-репликон SINV, например, модифицированный геном или РНК-репликон SINV не содержит по меньшей мере участка кодирующей последовательности одного или более структурных белков SINV СР, Е1, Е2, Е3 и 6К. Как вирулентные, так и авирулентные штаммы SINV являются подходящими. Неограничивающие примеры штаммов SINV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают штамм AR339 SINV и Girdwood. Дополнительные примеры штаммов SINV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь ими, штаммы, описанные в публикациях Sammels et al., *J. Gen. Virol.*, 1999, 80(3):739-748, Lundström and Pfeffer, *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2010, 10(9):889-907, Sigei et al., *Arch. Virol.*, 2018, 163:2465-2469 и Ling et al., *J. Virol.*, 2019, 93:e00620-19. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или РНК-репликон SINV происходит из штамма Girdwood SINV. В некоторых вариантах осуществления модифицированный геном или РНК-репликон SINV происходит из штамма AR86 SINV.

[0075] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций

нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков СР, Е1, Е2, Е3 и 6К немодифицированного вирусного генома или РНК-репликона. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет участка или всей последовательности, кодирующей СР. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет участка или всей последовательности, кодирующей Е1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет участка или всей последовательности, кодирующей Е2. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет участка или всей последовательности, кодирующей Е3. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет участка или всей последовательности, кодирующей 6К. В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет участка или всей последовательности, кодирующей комбинацию СР, Е1, Е2, Е3 и 6К. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный геном или РНК-репликон СНКV, в котором присутствует кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 немодифицированного генома или РНК-репликона СНКV, однако по меньшей мере участок или вся последовательность, кодирующая один или более структурных белков (например, СР, Е1, Е2, Е3 и 6К) генома или РНК-репликона СНКV, отсутствует. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают модифицированный геном или РНК-репликон SINV, в котором присутствует кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 немодифицированного генома или РНК-репликона SINV, однако по меньшей мере участок или вся последовательность, кодирующая один или более структурных белков (например, СР, Е1, Е2, Е3 и 6К) генома или РНК-репликона SINV, отсутствует.

[0076] В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет значительного участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков вируса. Специалисту в данной области будет понятно, что значительный участок последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей структурный полипептид вируса, может включать достаточную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую структурный полипептид вируса, чтобы обеспечить предполагаемую идентификацию этого полипептида либо путем ручной оценки последовательности специалистом в данной области, или с помощью компьютерного автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, в «Basic Local Alignment Search Tool»; Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1993). Следовательно, значительный участок нуклеотидной последовательности включает достаточную

последовательность, чтобы обеспечить специфическую идентификацию и/или выделение фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего последовательность. Например, значительный участок последовательности нуклеиновой кислоты может включать по меньшей мере приблизительно 20%, например, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% от полной последовательности нуклеиновой кислоты. Как описано выше, настоящее изобретение относится к молекулам и конструкциям нуклеиновой кислоты, которые не имеют частичных или полных последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих один или более вирусных структурных белков. Специалист в данной области, пользуясь преимуществами последовательностей, раскрытых здесь, может легко использовать всю или значительный участок раскрытых последовательностей для композиций и способов по настоящему изобретению. Следовательно, настоящая заявка включает полные последовательности, раскрытые в настоящем изобретении, например, приведенные в прилагаемом списке последовательностей, а также значительные участки этих последовательностей, как определено выше.

[0077] В некоторых вариантах осуществления модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет всей последовательности, кодирующей структурные белки вируса, например, модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей структурные белки вирусного немодифицированного генома или РНК-репликона.

[0078] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают одну или более экспрессионных кассет. В принципе, конструкции нуклеиновой кислоты, описанные здесь, обычно могут включать любое количество экспрессионных кассет. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты, описанные здесь, могут включать по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть экспрессионных кассет. Специалисту в данной области техники будет понятно, что термин «экспрессионная кассета» относится к конструкции генетического материала, которая содержит кодирующие последовательности и достаточную регуляторную информацию для направления правильной транскрипции и/или трансляции кодирующих последовательностей в клетке, *in vivo* и/или *ex vivo*. Экспрессионная кассета может быть встроена в вектор для нацеливания на желаемую клетку-хозяина и/или в организм субъекта. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления термин «экспрессионная кассета» может использоваться взаимозаменяемо с термином «экспрессионная конструкция». В некоторых вариантах осуществления термин «экспрессионная кассета» относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает ген, кодирующий белок или функциональную РНК, функционально связанную с регуляторными элементами, например, такими как промотор и/или сигнал терминации, и необязательно любой или комбинацией других последовательностей нуклеиновой

кислоты, влияющих на транскрипцию или трансляцию гена.

[0079] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из экспрессионных кассет включает промотор, функционально связанный с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты. Следовательно, конструкции нуклеиновой кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут найти применение, например, в качестве экспрессионного вектора, который при включении регуляторного элемента (например, промотора), функционально связанного с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, может влиять на экспрессию последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна экспрессионная кассета включает субгеномный (sg) промотор, функционально связанный с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления промотор sg представляет собой субгеномный промотор 26S. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению дополнительно включают одну или более нетранслируемых областей (UTR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из UTR представляет собой гетерологичную UTR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из гетерологичных UTR включает последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из гетерологичных UTR включает последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

[0080] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из экспрессионных кассет включает кодирующую последовательность представляющего интерес гена (GOI). В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована в отношении желаемого свойства. Например, в некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована для экспрессии на более высоком уровне, чем уровень экспрессии референсной кодирующей последовательности. В отношении последовательность-оптимизации нуклеотидных последовательностей, то вырожденность генетического кода дает возможность заменить по меньшей мере одно основание в кодирующей белок последовательности гена другим основанием без изменения аминокислотной последовательности полипептида, продуцированного из гена. Следовательно, конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также могут иметь любую последовательность оснований, которая была изменена по сравнению с любой полинуклеотидной последовательностью, раскрытой в настоящем изобретении,

посредством замены в соответствии с вырожденностью генетического кода. Ссылки, описывающие использование кодонов, общедоступны. В некоторых вариантах осуществления варианты полинуклеотидной последовательности могут быть получены по целому ряду причин, например, для оптимизации экспрессии для конкретного хозяина (например, изменение использования кодонов в мРНК альфавируса на кодоны, предпочтительные для других организмов, таких как человек, приматы, отличные от человека, хомяк, мышь или обезьяна). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована для экспрессии в целевой клетке-хозяине за счет использования кодонов, оптимизированных для экспрессии. Методы конструирования синтетических последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих GOI, с использованием предпочтительных кодонов, оптимальных для экспрессии в клетке-хозяине, могут быть определены с помощью вычислительных методов, анализирующих общность использования кодонов для кодирования нативных белков генома клетки-хозяина и их относительную распространенность методами, хорошо известными в искусстве. Базу данных об использовании кодонов (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) можно использовать для создания кодон-оптимизированных последовательностей в клеточных средах млекопитающих. Кроме того, доступно множество программных инструментов для преобразования последовательностей одного организма в оптимальное использование кодонов для другого организма-хозяина, например, инструмент кодон-оптимизации JCat (www.jcat.de), инструмент кодон-оптимизации Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) или онлайн-инструмент кодон-оптимизации Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>). Такие синтетические последовательности можно сконструировать методами, известными в данной области техники для конструирования молекул синтетических нуклеиновых кислот, и могут быть получены от различных коммерческих поставщиков.

[0081] В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность GOI оптимизирована для повышения стабильности и/или экспрессии РНК. Стабильность РНК обычно связана с «периодом полураспада» РНК. «Период полураспада» относится к периоду времени, необходимому для элиминации половины активности, количества или числа молекул. В контексте настоящего описания период полураспада РНК указывает на стабильность указанной РНК. Период полураспада РНК может влиять на «длительность экспрессии» РНК. Дополнительную информацию о принципах, стратегиях и методах повышения стабильности РНК можно найти, например, в Leppek K. et al., *Combinatorial optimization of mRNA structure, stability and translation for RNA-based therapeutics*. bioRxiv. (Preprint). Mar 30, 2021. doi: 10.1101/2021.03.29.437587.

[0082] Полипептид, закодированный GOI, обычно может представлять собой любой полипептид и может представлять собой, например, терапевтический полипептид, профилактический полипептид, диагностический полипептид, нутрицевтический полипептид, промышленный фермент и репортерный полипептид. В некоторых вариантах

осуществления GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антитела, антигена, иммуномодулятора, фермента, сигнального белка и цитокина.

[0083] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный СНКV или модифицированный SINV, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный СНКV или модифицированный SINV, имеющий по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный СНКV или модифицированный SINV, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный СНКV или модифицированный SINV, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный СНКV или модифицированный SINV, имеющий, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4.

[0084] Последовательности нуклеиновой кислоты, имеющие высокую степень идентичности последовательности (например, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность последовательности с представляющим интерес модифицированным СНКV или модифицированным SINV, могут быть идентифицированы и/или выделены с

использованием последовательностей, идентифицированных в настоящем изобретении (например, SEQ ID NO: 1-4) или любых других, известных в данной области посредством анализа последовательности генома, гибридизации и/или ПЦР с вырожденными праймерами или ген-специфическими праймерами из последовательностей, идентифицированных в соответствующем геноме CHIKV или SINV.

В. Рекомбинантные клетки

[0085] Конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть введены в клетку-хозяин для получения рекомбинантной клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты. Соответственно, прокариотические или эукариотические клетки, которые содержат конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном CHIKV или SINV, как описано в настоящем изобретении, также являются признаками настоящего изобретения. В родственном аспекте некоторые варианты осуществления, раскрытые в настоящем изобретении, относятся к способам трансформации клетки, которые включают введение в клетку-хозяин, такую как клетка животного, конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем изобретении, и затем селекцию или скрининг трансформированной клетки. Введение конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в клетки может быть достигнуто способами, известными специалистам в данной области, например, такими как вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, осаждение фосфатом кальция, полиэтиленимин (PEI)-опосредованная трансфекция, DEAE-декстран-опосредованная трансфекция, липосомно-опосредованная трансфекция, технология генной пушки, прямая микроинъекция, опосредованная наночастицами доставка нуклеиновой кислоты и т.п.

[0086] В одном аспекте некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к рекомбинантным клеткам, например, к рекомбинантным клеткам животных, которые включают конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении. Конструкция нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина, или может реплицироваться эписомально или находиться в рекомбинантной клетке-хозяине в виде экспрессионного вектора мини-кольца для стабильной или транзientной экспрессии. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция нуклеиновой кислоты сохраняется и реплицируется в рекомбинантной клетке-хозяине в виде эписомальной единицы. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты стабильно интегрирована в геном рекомбинантной клетки. Стабильная интеграция может быть выполнена с использованием классических методов произвольной геномной рекомбинации или более точных методов редактирования генома, таких как использование CRISPR/Cas9 или TALEN направленного редактирования генома с направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты находится в рекомбинантной клетке-хозяине в виде экспрессионного вектора мини-кольца для стабильной или транзientной экспрессии.

[0087] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку, такую как бактерия *E. coli*, или эукариотическую клетку, такую как клетка насекомого (например, клетка комара или клетка Sf21), или клетки млекопитающего (например, клетки COS, клетки NIH 3T3 или клетки HeLa). В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vivo*, например, является рекомбинантной клеткой в живом организме, например, является клеткой трансгенного субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления животная клетка представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки CV1 обезьяны, трансформированной SV40 (COS-7), клетки почки эмбриона человека (например, НЕК 293 или клетка НЕК 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), мышинной клетки Сертоли (например, клетки TM4), клетки почки обезьяны (CV1), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), клетки рака молочной железы мыши (MMT 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки CHME5 человека, клетки PER.C6 человека, клетки мышинной миеломы NS0, клетки плоскоклеточной карциномы гортани человека, фибробласта человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, эндотелиальной клетки человека, астроцитарной клетки человека, макрофагальной клетки человека, клетки RAW 264.7 человека, клетки 3T3 мыши, клетки L929 мыши, клетки соединительной ткани мыши, мышечной клетки мыши и клетки почки кролика.

[0088] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого, например, клетку клеточной линии насекомых. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку Sf21. Дополнительные подходящие клеточные линии насекомых включают, не ограничиваясь этим, клеточные линии, полученные от отрядов двукрылых, чешуекрылых и полужесткокрылых, и могут быть получены из различных тканевых источников тканей. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку

клеточной линии чешуекрылых насекомых. За последние несколько десятилетий доступность клеточных линий чешуекрылых насекомых увеличилась приблизительно на 50 линий за десятилетие. Дополнительную информацию о доступных клеточных линиях чешуекрылых насекомых можно найти, например, в публикации Lynn D.E., Available lepidopteran insect cell lines. *Methods Mol. Biol.*, 2007;388:117-38, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку комара, например, клетку видов комаров из родов *Anopheles* (An.), *Culex* (Cx.) и *Aedes* (*Stegomyia*) (Ae.). Иллюстративные клеточные линии комаров, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении, включают клеточные линии следующих видов комаров: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes pseudoscutellaris*, *Aedes triseriatus*, *Aedes vexans*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex theileri*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex bitaeniorhynchus* и *Toxorhynchites amboinensis*. Подходящие клеточные линии комаров включают, не ограничиваясь этим, CCL-125, Aag-2, RML-12, C6/26, C6/36, C7-10, AP-61, A.t. GRIP-1, A.t. GRIP-2, UM-AVE1, Mos.55, Sua1B, 4a-3B, Mos.43, MSQ43 и LSB-AA695BB. В некоторых вариантах осуществления клетка комара представляет собой клетку клеточной линии C6/26.

[0089] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клеточным культурам, включающим по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, раскрытую в настоящем изобретении, и культуральную среду. Как правило, культуральная среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования клеток, описанных здесь. Способы трансформации широкого спектра вышеуказанных клеток-хозяев и видов известны в данной области техники и описаны в технической и научной литературе. Следовательно, клеточные культуры, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, раскрытую в настоящем изобретении, также входят в объем настоящей заявки. Способы и системы, подходящие для создания и поддержания клеточных культур, известны в данной области.

С. Трансгенные животные

[0090] Также в еще одном аспекте настоящее изобретение относится к трансгенным животным, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления насекомое представляет собой комара. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления трансгенное млекопитающее представляет собой отличное от человека млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления трансгенное животное продуцирует представляющий интерес белок, описанный в настоящем изобретении.

[0091] Трансгенных животных-хозяев, отличных от человека, по настоящему

изобретению получают с использованием стандартных способов, известных в данной области техники, для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в геном животного, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления животными, отличными от человека, по настоящему изобретению являются приматы, отличные от человека. Другие виды животных, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают животных, которые (i) подходят для трансгенеза и (ii) способны реаранжировать сегменты гена иммуноглобулина для генерации гуморального ответа. Примеры таких видов включают, не ограничиваясь этим, мышей, крыс, хомяков, кроликов, кур, коз, свиней, овец и коров. Подходы и способы получения трансгенных животных, отличных от человека, известны в данной области. Примерные способы включают пронуклеарную микроинъекцию, микроинъекцию ДНК, лентивирусный вектор-опосредованный перенос ДНК в ранние эмбрионы и опосредованный спермой трансгенез, опосредованное аденовирусом введение ДНК в сперму животных (например, свиней), ретровирусные векторы (например, виды птиц), перенос ядер соматических клеток (например, у коз). Обзор уровня техники в получении трансгенных домашних сельскохозяйственных животных представлен в публикации Niemann H. et al. (2005) *Rev. Sci. Tech.*, 24:285-298.

[0092] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансгенное животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой насекомое. В некоторых вариантах осуществления насекомое представляет собой комара. В некоторых вариантах осуществления животное представляет собой субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является животным, отличным от человека. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные по настоящему изобретению могут быть получены с использованием классических методов произвольной геномной рекомбинации или более точных методов, таких как CRISPR/Cas9 или TALEN направленное редактирование генома с направляющей РНК или редактирование генома ДНК-направленной эндонуклеазой NgAgo (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute) или TALEN-редактирование генома (эффektorные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции). В некоторых вариантах осуществления трансгенные животные по настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии трансгенных микроинъекций и не требуют использования технологии гомологичной рекомбинации, и таким образом полагается, что их легче получить и отобрать, чем подходы, использующие гомологичную рекомбинацию. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида, где способы включают (i) разведение трансгенного животного, раскрытого в настоящем изобретении; или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении, в условиях, при которых трансгенное животное или рекомбинантная клетка продуцируют

полипептид, кодированный GOI.

[0093] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида, где способы включают: (i) разведение трансгенного животного, раскрытого в настоящем изобретении; или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении, в условиях, при которых трансгенное животное или рекомбинантная клетка продуцируют полипептид, кодированный GOI. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида в организме субъекта, где способы включают введение субъекту конструкции нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления субъект-млекопитающее представляет собой человека. Соответственно, рекомбинантные полипептиды, полученные описанным здесь способом, также входят в объем настоящего изобретения.

[0094] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления раскрытых способов продукции рекомбинантного полипептида могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления способы продукции рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению дополнительно включают выделение и/или очистку продуцированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления способы продукции полипептида по настоящему изобретению дополнительно включают структурную модификацию продуцированного полипептида для увеличения времени полураспада.

D. Фармацевтические композиции

[0095] Конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению могут быть включены в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции обычно включают одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды, описанные и представленные в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент, например, носитель. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют для профилактики, лечения или контролирования заболевания, такого как иммунное заболевание или микробная инфекция. Например, композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде профилактической композиции, терапевтической композиции или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент или их смесь. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящей заявке составляют для применения в качестве адьюванта.

[0096] Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим фармацевтически приемлемый эксципиент и: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; b) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; и/или c) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению.

[0097] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, включающим рекомбинантную клетку, раскрытую в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления композиции включают рекомбинантный полипептид, описанный в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0098] В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют в липосоме. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют в наночастице на основе липидов (LNP). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению составляют в полимерной наночастице. В некоторых вариантах осуществления композиции представляют собой иммуногенные композиции, например композиции, которые могут стимулировать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции приготовлены в виде вакцины. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют в виде адъюванта.

[0099] В некоторых вариантах осуществления иммуногенные композиции являются по существу неиммуногенными для субъекта, например композиции, которые минимально стимулируют иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления неиммуногенные или минимально иммуногенные композиции готовят в виде биотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, интраокулярного, ректального и перорального введения.

[0100] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного введения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций для немедленного введения. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). В этих случаях композиция

должна быть стерильной и должна быть текучей в той степени, чтобы ее можно было легко набрать в шприц. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена против загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и им подобные) и их подходящие смеси. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ, например, додецилсульфата натрия. Предотвращение действия микроорганизмов можно достичь различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и им подобными. Во многих случаях будет предпочтительно включить в композицию изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций можно достичь включением в композицию агента, который задерживает всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

[0101] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить включением активного соединения в требуемом количестве в соответствующем растворителе при необходимости с одним или комбинацией перечисленных выше ингредиентов с последующей стерилизацией фильтрацией. В целом, дисперсии получают включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше.

[0102] В некоторых вариантах осуществления композиция составлена для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутримышечного введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, внутрибрюшинного введения, перорального введения, интравагинального, интраокулярного, ректального или внутричерепного введения. В некоторых вариантах осуществления введенная композиция приводит к увеличению продукции интерферона у субъекта.

Способы по изобретению

[0103] Введение любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем изобретении, например конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, можно использовать для лечения соответствующих патологических состояний, таких как пролиферативные заболевания (например, рак) и хронические инфекции (например, вирусные инфекции). В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, могут быть включены в

терапевтические средства для применения в способах лечения субъекта, у которого имеет место, у которого имеется подозрение на наличие или у которого имеется высокий риск развития одного или более соответствующих патологических состояний или заболеваний. Иллюстративные патологические состояния или заболевания могут включать, без ограничения, рак, иммунные заболевания, генную терапию, замену дефектного гена, сердечно-сосудистые заболевания, возрастные патологии, острую инфекцию и хроническую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом, находящимся под наблюдением врача.

[0104] Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

[0105] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способам профилактики и/или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, включающей: а) конструкцию нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению ; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению; и/или d) фармацевтическую композицию по любому пункту раскрытия.

[0106] В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние представляет собой пролиферативное заболевание или микробную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или имеет подозрение на наличие состояния, ассоциированного с пролиферативным заболеванием или микробной инфекцией.

[0107] В некоторых вариантах осуществления раскрытая композиция составлена таким образом, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым путем введения. Например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально или ингаляцией, но более вероятно, что они будут вводиться парентеральным путем. Примеры парентеральных путей введения включают, например, внутривенное, интранодальное, внутрикожное, подкожное, чрескожное (местное), трансмукозальное, интравагинальное, интраокулярное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как

этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. рН можно регулировать кислотами или основаниями, такими как одно- и/или двухосновный фосфат натрия, соляная кислота или гидроксид натрия (например, до рН приблизительно 7,2-7,8, например, 7,5). Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или мультидозовые флаконы из стекла или пластика.

[0108] Дозировка, токсичность и терапевтическая эффективность таких рассматриваемых конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, и может быть выражено как отношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, которые проявляют высокие терапевтические индексы, обычно являются подходящими. Хотя можно использовать соединения, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани, чтобы свести к минимуму потенциальное повреждение неинфицированных клеток и, таким образом, уменьшить побочные эффекты.

[0109] Например, данные, полученные в анализах на клеточных культурах и в исследованиях на животных, можно использовать для определения диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка таких соединений, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED₅₀ с проявлением небольшой токсичности или без токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективную дозу изначально можно определить на основании клеточных анализов. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме крови, который включает IC₅₀ (например, концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено на клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения пригодных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0110] Терапевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, например конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, можно вводить от одного или более раз в день до одного или более раз в неделю; в том числе один раз через день.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и временную схему, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, помимо прочего, тяжесть заболевания, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, а также другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством поливалентных полипептидов и поливалентных антител по настоящему изобретению может включать однократное лечение или серию лечебных мероприятий. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят каждые 8 ч в течение пяти дней с последующим периодом отдыха продолжительностью от 2 до 14 дней, например, 9 дней, после чего следуют дополнительные пять дней введения каждые 8 ч. В отношении конструкций нуклеиновой кислоты и рекомбинантных полипептидов, то терапевтически эффективное количество конструкции нуклеиновой кислоты или рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению (например, эффективная доза) зависит от выбранной конструкции нуклеиновой кислоты или рекомбинантного полипептида. Например, можно вводить разовые дозы в диапазоне приблизительно от 0,001 до 0,1 мг/кг массы тела пациента. В некоторых вариантах осуществления можно вводить приблизительно 0,005, 0,01, 0,05 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления можно вводить разовые дозы в диапазоне приблизительно от 0,03 мкг до 300 мкг/кг массы тела пациента. В некоторых вариантах осуществления можно вводить разовые дозы в диапазоне приблизительно от 0,3 мг до 3 мг/кг массы тела пациента.

[0111] Как обсуждалось выше, терапевтически эффективное количество включает количество терапевтической композиции, достаточное для обеспечения определенного эффекта при введении субъекту, например, субъекту, который имеет, имеет подозрение на наличие или имеет риск развития патологического состояния, например, заболевания или инфекции. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество включает количество, достаточное для профилактики или задержки развития симптома заболевания или инфекции, изменения течения симптома заболевания или инфекции (например, не ограничиваясь этим, замедления прогрессирования симптома заболевания или инфекции), или обратного развития симптома заболевания или инфекции. Понятно, что для любого конкретного случая подходящее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области техники с помощью рутинного экспериментирования.

[0112] Эффективность лечения, включающего раскрытую терапевтическую композицию для лечения заболевания или инфекции, может определить опытный клиницист. Однако лечение считается эффективным, если по меньшей мере один или все признаки или симптомы заболевания или инфекции ослабляются или подавляются. Эффективность также можно определить по отсутствию ухудшения состояния пациента при оценке необходимости в госпитализации или в медицинских вмешательствах (например, прогрессирование заболевания или инфекции останавливается или, по меньшей мере, замедляется). Способы определения этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в настоящем изобретении. Лечение

включает любое лечение заболевания или инфекции у субъекта или животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающее) и включает: (1) подавление заболевания или инфекции, например остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания или инфекции, например, вызывая обратное развитие симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

[0113] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в составе композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, и в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа. Как правило, субъект может быть иммунизирован посредством первоначальной серии инъекций (или введения одним из других путей, описанных ниже), а затем может быть введена буст-инъекция для усиления протективного эффекта, обеспечиваемого исходной серией введений. Первоначальную серию инъекций и последующие буст-инъекции вводят в таких дозах и в течение такого периода времени, которые необходимы для стимуляции иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введенная композиция приводит к повышению продукции интерферона у субъекта. В некоторых вариантах осуществления раскрытых способов субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

[0114] Как описано выше, фармацевтически приемлемые носители, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (где активные вещества являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций для немедленного введения. В этих случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей в той степени, чтобы ее можно было легко набрать в шприц. Композиция должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена против загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.д.) и их подходящие смеси, и растительные масла. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно достичь различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и им подобными.

[0115] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить включением конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов в необходимом количестве в соответствующем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей

стерилизацией фильтрованием.

[0116] Когда конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции надлежащим образом защищены, как описано выше, их можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или усваиваемым съедобным носителем. Конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции и другие ингредиенты также могут быть заключены в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, спрессованы в таблетки или включены непосредственно в рацион субъекта. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть объединено с эксципиентами и использоваться в форме таблеток для приема внутрь, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и т.п.

[0117] В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты и рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетку или в организм субъекта с использованием наночастиц на основе липидов (LNP). LNP обычно являются менее иммуногенными, чем вирусные частицы. В то время как у многих людей уже есть иммунитет к вирусным частицам, иммунитет к LNP отсутствует. Кроме того, маловероятно появление адаптивного иммунного ответа против LNP, что делает возможным повторное введение LNP.

[0118] Несколько различных ионизируемых катионных липидов были разработаны для использования в LNP. Они включают C12-200, MC3, LN16 и MD1. Например, в одном типе LNP группа GalNAc присоединена к внешней стороне LNP и функционирует в качестве лиганда для поглощения печенью через асиалилогликопротеиновый рецептор. Любой из этих катионных липидов можно использовать для формуляции в LNP для доставки конструкций нуклеиновой кислоты и рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению в печень.

[0119] В некоторых вариантах осуществления LNP относится к любой частице, имеющей диаметр ниже 1000 нм, 500 нм, 250 нм, 200 нм, 150 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм или 25 нм. Альтернативно, наночастица может иметь размер от 1 до 1000 нм, от 1 до 500 нм, от 1 до 250 нм, от 25 до 200 нм, от 25 до 100 нм, от 35 до 75 нм или от 25 до 60 нм.

[0120] LNP могут быть получены из катионных, анионных или нейтральных липидов. Нейтральные липиды, такие как фузогенный фосфолипид DOPE или холестерин, компонент мембран, могут быть включены в LNP в качестве «вспомогательных липидов» для повышения активности трансфекции и стабильности наночастиц. Ограничения катионных липидов включают низкую эффективность за счет плохой стабильности и быстрого клиренса, а также развитие воспалительных или противовоспалительных реакций. LNP также могут содержать гидрофобные липиды, гидрофильные липиды или как гидрофобные, так и гидрофильные липиды.

[0121] Любой липид или комбинацию липидов, известные в данной области, можно использовать для получения LNP. Примерами липидов, используемых для

получения LNP, являются: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DP₉PE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Примерами катионных липидов являются: 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. Примерами нейтральных липидов являются: DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Примерами липидов, модифицированных ПЭГ, являются: ПЭГ-ДМГ, ПЭГ-CerC14 и ПЭГ-CerC20.

[0122] В некоторых вариантах осуществления липиды можно комбинировать в любом ряду молярных соотношений для получения LNP. Кроме того, полинуклеотид(ы) можно комбинировать с липидом(ами) в широком диапазоне молярных соотношений для получения LNP.

[0123] В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, включают в терапевтические композиции для применения в способах профилактики или лечения субъекта, у которого имеет место, имеется подозрение на наличие или имеется высокий риск развития рака, аутоиммунного заболевания и/или инфекции.

[0124] В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, например, конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантные клетки, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, включают в терапевтические композиции для применения в способах профилактики или лечения субъекта, у которого имеет место, имеется подозрение на наличие или имеется высокий риск развития микробной инфекции. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой грибковую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой вирусную инфекцию.

Дополнительные методы лечения

[0125] В некоторых вариантах осуществления композицию в соответствии с настоящим изобретением вводят субъекту индивидуально в виде единственной терапии (монотерапии) или в виде первой терапии в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной терапией (например, второй терапией). В некоторых вариантах осуществления вторую терапию выбирают из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления вторую терапию выбирают из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной терапии, токсинотерапии или хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления первую терапию и вторую терапию проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления первую терапию проводят одновременно со второй терапией. В некоторых вариантах осуществления

первую терапию и вторую терапию проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления первая терапия проводится перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления первую терапию проводят после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первую терапию проводят до и/или после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления первую терапию и вторую терапию вводят попеременно. В некоторых вариантах осуществления средства для первой и второй терапии вводят вместе в одном составе.

Наборы

[0126] Также настоящее изобретение относится к различным наборам для практического применения способа, описанного здесь. В частности, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам для индукции иммунного ответа у субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для профилактики заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для способов лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к наборам, которые включают одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, представленных и описанных в настоящем изобретении, а также письменные инструкции по их изготовлению и применению.

[0127] В некоторых вариантах осуществления наборы по настоящему изобретению дополнительно включают одно или более средств, пригодных для введения любой из представленных конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления наборы по настоящему изобретению дополнительно включают один или более шприцев (включая предварительно заполненные шприцы) и/или катетеров (включая предварительно заполненные шприцы), используемые для введения любой из предоставленных конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций субъекту. В некоторых вариантах осуществления набор может содержать одно или более дополнительных терапевтических средств, которые можно вводить одновременно или последовательно с другими компонентами набора для достижения желаемой цели, например, для диагностики, профилактики или лечения состояния у субъекта, нуждающегося в этом.

[0128] Любой из вышеописанных наборов может дополнительно включать один или более дополнительных реагентов, где такие дополнительные реагенты могут быть выбраны из: буферов для разбавления; растворов для восстановления, буферов для промывания, контрольных реагентов, контрольных экспрессионных векторов, отрицательных контролей, положительных контролей, реагентов, подходящих для получения *in vitro* предложенных конструкций нуклеиновой кислоты, рекомбинантных

клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[0129] В некоторых вариантах осуществления компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах. В некоторых других вариантах компоненты набора могут быть объединены в одном контейнере.

[0130] В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно включать инструкции по использованию компонентов набора для практического применения способов, описанных здесь. Инструкции по применению способов обычно записываются на подходящем носителе информации. Например, инструкция может быть напечатана на основе, такой как бумага или пластик и т. д. Инструкции могут находиться в наборе в виде листка-вкладыша, на этикетке на контейнере набора или его компонентах (например, связанных с упаковкой или субупаковкой) и т. д. Инструкции могут быть представлены в виде файла данных на электронном носителе информации, находящемся на подходящем считываемом компьютером носителе данных, например, CD-ROM, дискете, флэш-накопителе и т. д. В некоторых случаях в наборе отсутствуют реальные инструкции, но могут быть предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через Интернет). Примером такого варианта осуществления является набор, который включает веб-адрес, по которому можно ознакомиться с инструкциями и/или с которого инструкции можно загрузить. Как и в случае с инструкциями, это средство получения инструкций может быть записано на подходящем носителе.

[0131] Все публикации и заявки на патент, цитированные в настоящем описании, включены посредством ссылки во всей их полноте в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент были конкретно и отдельно включены посредством ссылки.

[0132] Не делается допущений, что любая ссылка представляет собой предшествующий уровень техники. В описании ссылок говорится, что утверждают их авторы, и заявители оставляют за собой право опротестовать точность и актуальность цитируемых документов. Понятно, что, хотя здесь упоминается ряд источников информации, включая статьи из научных журналов, патентные документы и учебники; эта ссылка не является признанием того, что любой из этих документов составляет часть общих знаний в данной области техники.

[0133] Обсуждение общих методов, приведенных здесь, предназначено только для иллюстративных целей. Другие альтернативные способы и альтернативы будут очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с настоящим описанием и должны быть включены в сущность и объем настоящей заявки.

[0134] Дополнительные варианты осуществления более подробно раскрыты в следующих примерах, которые представлены в качестве иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия или формулы изобретения.

Примеры

[0135] В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы в полном объеме описаны в литературе, например Sambrook J. & Russell D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory и Sambrook J. & Russel D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (совместно именуемые в настоящем изобретении «Sambrook»); Ausubel F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (включая дополнения до 2014 г.); Bollag D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis K. B., Ferré F. & Gibbs R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (включая дополнения до 2014 г.); и Makrides S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V., описание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

[0136] Дополнительные варианты осуществления раскрыты более подробно в следующих примерах, которые представлены в качестве иллюстрации и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия или формулы изобретения.

Пример 1. Конструирование векторов СНИКV

[0137] В данном примере описаны результаты экспериментов, выполненных для конструирования ряда базовых векторов СНИКV (например, без гетерологичного гена), которые затем использовались для экспрессии представляющего интерес гена, например, (i) предшественника гемагглютинаина (НА) вируса гриппа А H5N1 или (ii) последовательности синтетической кассеты, кодирующей гены или участки генов, ассоциированные с онкологическими заболеваниями, такие как гены рецептора эстрогена альфа (ESR1), рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (HER2) и рецептора эпидермального фактора роста 3 человека (HER3), или репортерные гены, такие как люцифераза светлячков с красным свечением, или цитокины, такие как антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или интерлейкин-12 (IL12). В качестве альтернативы также можно использовать ген Е6/Е7 вируса папилломы человека (ВПЧ).

[0138] Было сделано первоначальное наблюдение, что общедоступные геномные

данные по альфавирусам не всегда содержат нуклеотидные последовательности, способные к прямой замене последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих структурные белки, на представляющий интерес ген (GOI), для получения самореплицирующейся РНК и трансген-экспрессирующих репликонов. Как более подробно описано ниже, несмотря на то, что в штамме CHIKV S27 (Genbank AF369024) удалось заменить ген структурного полипротеина синтетическим геном Е6/Е7 HPV (ген Е6/Е7 вируса папилломы человека) (см., например, фиг. 2С), ген гемагглютинирина (НА) из вируса гриппа А H5N1 (см., например, фиг. 3В) или ген люциферазы светлячков с красным свечением также можно использовать для получения репликона, способного к репликации РНК и экспрессии трансгена в трансфектированных клетках ВНК-21, та же синтетическая последовательность, которая использовалась для аналогичной замены гена структурного полипротеина в штамме CHIKV DRDE-06 (Genbank EF210157), не могла подвергаться репликации РНК или экспрессировать трансген. Таким образом, простой замены структурных белков CHIKV гетерологичными генами с использованием доступных опубликованных последовательностей недостаточно для создания функциональных репликонов. Иными словами, для конструирования репликонных систем, подходящих для использования в вакцинах и терапевтических средствах, требуется дополнительное конструирование, такое как использование гетерологичных последовательностей 5'- и/или 3'-UTR.

[0139] Как более подробно описано ниже, несмотря на многочисленные эволюционные расхождения в последовательности, обнаруженные в геномах штаммов CHIKV S27 и DRDE-06, представленные здесь экспериментальные данные показали, что функциональный репликон штамма CHIKV DRDE может быть получен заменой 3'-UTR DRDE на 3'-UTR из штамма CHIKV S27 (см., например, фиг. 2С).

[0140] В этих экспериментах базовые векторы CHIKV (S27 и DRDE-06) синтезировали de novo из четырех фрагментов размером приблизительно 4 т.п.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) из референсных последовательностей (Genbank AF369024 и EF210157 для штаммов S27 и DRDE-06 соответственно) с использованием уникального сайта рестрикции для рестриктазы (SpeI, 5'-A'CTAG, T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов CHIKV (где 5'-А соответствует расположению старт-кодона АТГ структурного полипротеина, и 3'-Т соответствует расположению стоп-кодона структурного полипротеина ТАА). Промотор РНК-полимеразы бактериофага Т7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) был включен астрим от геномной последовательности CHIKV, и даунстрим находилась последовательность (37-А) полиА, за которой следовала последовательность терминатора транскрипции Т7 (5'-ААССССТСТСТАААСГГАГГГГТТТТТТТТТТ-3'; SEQ ID NO: 8), за которым следует уникальный сайт рестрикции для рестриктазы (NotI, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Фрагменты соединяли с использованием сборки Гибсона для пяти фрагментов: линейаризованный остов pYL и четыре синтезированных фрагмента с получением базовых векторов CHIKV. Полученные в результате базовые векторы CHIKV S27 и CHIKV DRDE

имеют последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно. SEQ ID NO: 1 соответствует базовому вектору CHIKV S27, содержащему последовательности 5'-UTR S27 и 3'-UTR S27. SEQ ID NO: 2 соответствует базовому вектору CHIKV DRDE, содержащему последовательности 5'-UTR DRDE и 3'-UTR DRDE. Было установлено, что данный базовый вектор CHIKV DRDE неспособен к репликации.

[0141] Модифицированный базовый вектор CHIKV DRDE конструировали следующим образом. Вектор CHIKV DRDE (фиг. 3С) конструировали рестрикционным расщеплением с использованием SpeI и NotI базового вектора DRDE-06 и фрагменты соединяли в сборке Гибсона для двух фрагментов с линейаризованным остовом и продуктом ПЦР из вектора CHIKV S27, содержащего 3'-UTR (SEQ ID NO: 6), полиА и последовательность терминатора транскрипции T7 (SEQ ID NO: 8). Полученный базовый вектор CHIKV DRDE представляет собой SEQ ID NO: 3. Данный базовый вектор CHIKV DRDE содержал последовательности 5'-UTR DRDE и 3'-UTR S27, и было установлено, что он способен подвергаться репликации.

[0142] Векторы CHIKV, кодирующие экспрессию репортерного гена, конструировали следующим образом. Синтезировали репортерный ген люциферазы светлячков с красным свечением (rFF) и вставляли в базовые векторы CHIKV, описанные выше, рестрикционным расщеплением эндонуклеазой SpeI и фрагменты соединяли в сборке Гибсона для двух фрагментов с продуктом ПЦР, содержащим ген rFF с концами, гомологичными линейаризованным базовым векторам.

[0143] Вектор CHIKV S27 (фиг. 2В) конструировали рестрикционным расщеплением с использованием SpeI базового вектора S27 и фрагменты соединяли в сборке Гибсона для двух фрагментов с линейаризованным остовом и продуктом ПЦР, содержащим синтетический ген HPV E6/E7.

[0144] Вектор CHIKV DRDE (фиг. 2С) конструировали рестрикционным расщеплением с использованием SpeI и NotI базового вектора DRDE и фрагменты соединяли в сборке Гибсона для трех фрагментов с (i) линейаризованным остовом, (ii) продуктом ПЦР, содержащим синтетический ген HPV E6/E7, и (iii) продуктом ПЦР из вектора CHIKV S27, содержащим 3'-UTR (SEQ ID NO: 6), полиА и последовательность терминатора транскрипции T7 (SEQ ID NO: 8).

[0145] Векторы CHIKV, экспрессирующие HA, конструировали следующим образом. Ген гемагглютинина (HA) вируса гриппа (Genbank AY651334) подвергали кодон-оптимизации/рефакторингу для экспрессии у человека *in silico* и синтезировали *de novo* (IDT) и вставляли в базовые векторы CHIKV, описанные выше, с помощью рестрикционного расщепления эндонуклеазой SpeI и соединением сборкой Гибсона с продуктом ПЦР, содержащим ген HA с концами, гомологичными линейаризованным базовым векторам. Полученные векторы CHIKV S27 и CHIKV DRDE показаны на фиг. 3В и фиг. 3С соответственно.

[0146] Векторы CHIKV, кодирующие экспрессионную кассету для человеческих IL-1RA и IL-12, были сконструированы аналогичным образом инсерцией синтетической

кассеты в базовые векторы СНИКV, описанные выше, с использованием рестрикционного расщепления эндонуклеазой SpeI и сборкой Гибсона для двух фрагментов с продуктом ПЦР, содержащим синтетическую кассету с концами, гомологичными линейаризованным базовым векторам.

[0147] Векторы СНИКV, экспрессирующие полипептиды, ассоциированные с онкологическими заболеваниями, конструировали аналогичным образом с помощью сборки Гибсона для двух фрагментов (Gibson et al., Nat. Methods, 6, 343-345, 2009) продукта ПЦР, содержащего последовательности из ESR1, HER2, и HER3 с концами, гомологичными SpeI-линейаризованным базовым векторам СНИКV. Полученные векторы СНИКV S27 и СНИКV DRDE показаны на фиг. 3F и 3G соответственно.

[0148] Контрольные векторы VEE, показанные на фиг. 2A, фиг. 3A, фиг. 3E, репортер rFF и кассеты IL-1RA и IL-12 человека конструировали аналогично тому, как описано выше для базовых векторов СНИКV. Контрольный вектор VEE синтезировали de novo из референсной последовательности (Genbank L01443).

Пример 2. Конструирование векторов SINV

[0149] В данном примере описан дизайн и конструирование ряда базовых векторов SINV (например, без гетерологичного гена), которые затем использовали для экспрессии представляющего интерес гена (например, предшественника гемагглютинирина (HA) вируса гриппа А H5N1 или последовательности синтетической кассеты, кодирующей гены или участки генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями, такими как ESR1, HER2 и HER3, или люциферазы светлячков с красным свечением, или цитокинов, таких как IL-1RA или IL12). Альтернативно также можно использовать ген E6/E7 вируса папилломы человека (ВПЧ).

[0150] Базовый вектор SINV Girdwood синтезировали de novo из четырех фрагментов размером приблизительно 4 т.п.н. (Twist Bioscience, Thermo Fisher GeneArt) из референсной последовательности штамма Girdwood (Genbank MF459683) с использованием уникального сайта рестрикции для рестриктазы (SpeI, 5'-A'CTAG, T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов SINV (где 5'-A представляет собой следующий нуклеотид после последовательности P2A, следующей за нуклеотидом 93 гена структурного полипротеина, и 3'-T соответствует расположению стоп-кодона структурного полипротеина TGA). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'; SEQ ID NO: 7) вставляли апстрим от геномной последовательности SINV, и даунстрим находилась последовательность (37-A) полиА, за которой следовала последовательность терминатора транскрипции T7 (5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 8), за которым следует уникальный сайт рестрикции для рестриктазы (NotI, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Фрагменты соединяли в сборке Гибсона для пяти фрагментов (например, линейаризованный остов pYL и четыре синтезированных фрагмента) с получением базового вектора SINV Girdwood (SEQ ID NO: 4).

[0151] Базовый вектор SINV AR86 синтезировали de novo из четырех фрагментов

размером приблизительно 4 т.п.н. (Twist Bioscience) из референсной последовательности AR86 (Genbank U38305) с использованием уникального сайта рестрикции для рестриктазы (SpeI, 5'-A'CTAG, T-3') вместо кодирующей последовательности структурных генов SINV (где 5'-A представляет собой следующий нуклеотид после последовательности P2A, следующей за нуклеотидом 93 гена структурного полипротеина, и 3'-T соответствует стоп-кодону структурного полипротеина TGA). Промотор РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 7) вставляли апстрим от геномной последовательности SINV, и даунстрим находилась последовательность (37-A) полиА, за которой следовала последовательность терминатора транскрипции T7 (5'-ААССССТСТСТАААСГГАГГГГТТТТТТТТТТ-3'; SEQ ID NO: 8), за которой следует уникальный сайт рестрикции для рестриктазы (NotI, 5'-GC'GGCC, GC-3'). Фрагменты соединяли в сборке Гибсона для пяти фрагментов (например, линейаризованный остов pYL и четыре синтезированных фрагмента), с получением базового вектора SINV AR86, который также содержал дополнительные модификации для повышения функциональности.

[0152] Векторы SINV, кодирующие экспрессию репортерного гена, конструировали следующим образом. Репортерный ген люциферазы светлячков с красным свечением (rFF) синтезировали и встраивали в базовые векторы SINV, описанные выше, рестрикционным расщеплением эндонуклеазой SpeI и сборкой Гибсона с продуктом ПЦР, содержащим ген rFF с концами, гомологичными линейаризованному базовому вектору.

[0153] Вектор SINV, показанный на фиг. 3D, конструировали следующим образом. Ген гемагглютинаина (HA) гриппа (Genbank AY651334) подвергали кодон-оптимизации/рефакторингу для экспрессии у человека *in silico* и синтезирован *de novo* (IDT) и встраивали в базовый вектор SINV Girdwood, описанный выше, с использованием рестрикционного расщепления SpeI и сборки Гибсона для двух фрагментов с продуктом ПЦР, содержащим ген HA с концами, гомологичными базовому вектору, с получением конечного вектора. В другом эксперименте вектор SINV AR86, содержащий кодон-оптимизированный ген HA, конструировали аналогичным образом с использованием базового вектора SINV AR86, описанного выше в примере 2 (данные не приводятся).

[0154] Векторы SINV, кодирующие экспрессионную кассету для человеческих IL-1RA и IL-12, конструировали аналогичным образом вставкой синтетической кассеты в базовые векторы SINV, описанные выше, рестрикционным расщеплением эндонуклеазой SpeI и сборкой Гибсона для двух фрагментов с продуктом ПЦР, содержащим синтетическую кассету с концами, гомологичными линейаризованному базовому вектору.

[0155] Векторы SINV, экспрессирующие полипептиды, ассоциированные с онкологическими заболеваниями, конструировали аналогичным образом с использованием сборки Гибсона для двух фрагментов с продуктом ПЦР, содержащим последовательности из ESR1, HER2 и HER3 с концами, гомологичными SpeI-линейаризованным остовам SINV-векторов. Схематическое представление вектора SINV

Girwood представлено на фиг. 3I.

Пример 3. Оценка *in vitro* модифицированных векторов CHIKV и SINV

[0156] В данном примере приведены результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки уровней экспрессии синтетических репликонных конструкций CHIKV и SINV, описанных в примерах 1 и 2 выше, и для исследования любого их дифференциального поведения (например, репликация и экспрессия белка).

[0157] В данных экспериментах конструировали и затем оценивали синтетические репликонные конструкции, полученные из следующих альфавирусов: VEE, CHIKV S27, CHIKV DRDE, SINV AR86 и SINV Girwood.

[0158] Транскрипция *in vitro*: РНК получали транскрипцией *in vitro* с использованием полимеразы бактериофага T7 либо с 5'-кэпом ARCA (набор HiScribe™ T7 ARCA mRNA, NEB), либо транскрипцией без кэпирования (HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (Vaccinia Capping System, мРНК кэп-2'-О-метилтрансфераза, NEB). Затем РНК выделяли, используя экстракцию фенолом/хлороформом или колоночную очистку (набор для очистки РНК Monarch®, NEB). Концентрацию РНК определяли по поглощению при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0159] Репликация: РНК трансформировали электропорацией в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 18-20 ч после трансформации клетки фиксировали и подвергали пермибилизовали (набор буферов для окрашивания eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor, Invitrogen) и затем окрашивали с использованием мышиных моноклональных анти-дцРНК антител, конъюгированных с PE (J2, Scicons), для количественного анализа частоты дцРНК+ клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) дцРНК в отдельных клетках с помощью флуоресцентной проточной цитометрии.

[0160] Экспрессия белка: РНК трансформировали электропорацией в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 18-20 ч после трансформации количественно оценивали экспрессию трансгена(ов). Для репликонов, экспрессирующих rFF, люциферазную активность количественно анализировали с использованием протокола системы анализа люциферазы (Promega) (фиг. 4). Детектирование люминесценции этих клеток, трансфектированных репликоном, демонстрирует, что репликоны были способны подвергаться репликации РНК и экспрессировать представляющей интерес ген (GOI). В данном примере GOI представляет собой репортерный фермент, который проявляет биологическую функцию. В альтернативных экспериментах клетки фиксировали и пермибилизовали (набор буферов для окрашивания eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor, Invitrogen) и окрашивали с использованием мышиных моноклональных анти-LAMP1 антител, конъюгированных с FITC (HA3, BioLegend), для количественной оценки частоты LAMP-слитый белок+ клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) LAMP-слитый белок в отдельных клетках с помощью флуоресцентной проточной цитометрии.

[0161] Для репликонов, экспрессирующих IL-12, из клеточной культуры собирали среду и количественно определяли IL-12 с использованием ELISA (R&D Biosystems) или в анализе биологической активности IL-12 (Promega). Для репликонов, экспрессирующих IL-1RA, собирали среду и количественно определяли IL-1RA с использованием ELISA (R&D Biosystems) или анализа биологической активности с использованием клеток HEK-Blue™ IL-1R (InvivoGen), как описано. Клетки HEK-Blue™ IL-1R экспрессируют SEAP в ответ на IL-1B. Сначала клетки 5E4 HEK-Blue™ IL-1R высевали в лунки 96-луночных планшетов. Клетки HEK-Blue™ IL-1R инкубировали с серийными разведениями тестовых сред в дублирующих лунках в течение 40 мин. Для построения стандартной кривой клетки HEK-Blue™ IL-1R инкубировали с титрованной концентрацией рекомбинантного IL-1RA (Peprotech) в дублирующих лунках в течение 40 мин. Затем в каждую лунку добавляли рекомбинантный IL-1B (InvivoGen) до конечной концентрации 1 нг/мл. На следующие сутки экспрессию SEAP количественно определяли с использованием раствора QUANTI-Blue™ (InvivoGen) для количественного определения биологической активности IL-1RA.

[0162] Дополнительные эксперименты: клетки ВНК-21 или Vero предварительно обрабатывали рекомбинантным интерфероном (IFN) перед электропорацией РНК, и воздействие на репликацию и экспрессию белка для каждого вектора оценивали с использованием анализов, описанных выше.

Пример 4. Оценка in vivo модифицированных векторов CHIKV и SINV - Грипп

[0163] В данном примере представлены результаты экспериментов in vivo, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации синтетическими репликонными конструкциями CHIKV и SINV, описанными в примерах 1 и 2 выше (например, неформулированными и формулированными в LNP векторами).

[0164] В данных экспериментах конструировали и затем оценивали синтетические репликонные конструкции, полученные из следующих альфавирусов: VEE, CHIKV S27, CHIKV DRDE, SINV AR86 и SINV Girdwood.

[0165] Мыши и инъекции: самок мышей BALB/c получали из питомника Charles River Labs, Envigo или Jackson Laboratories. В день введения, дозу 10 мкг (группы с однократной дозой, т.е. только прайм-инъекция) или 5 мкг (группы с двумя дозами, т.е. прайм-буст инъекции) материала вводили внутримышечно в обе четырехглавые мышцы бедра. Векторы вводили либо в неформулированном виде в физиологическом растворе, либо в составе LNP. Проводили наблюдение за животными по массе тела и другим общим показателям на протяжении всего исследования. Для исследований иммуногенности введение животным проводили на день 0 и день 21 (только группы с двумя дозами). Селезенки отбирали на день 14 (группы с однократной дозой 10 мкг) и на день 35 (группы с однократной дозой 5 мкг), и сыворотку выделяли на дни 14 и 35. Экспрессию белка оценивали при введении на день 0 с анализом биолюминесценции на дни 1, 3 и 7. Визуализацию активности люциферазы in vivo выполняли с использованием системы IVIS на указанные временные точки.

[0166] Формуляция в LNP: репликон РНК формулировали в липидных наночастицах с использованием микрожидкостного смесителя и определяли размер частиц, полидисперсность с использованием динамического светорассеяния и эффективность инкапсуляции. В данном примере молярное соотношение липидов, использованное при приготовлении частиц LNP, составляло 35% C12-200, 46,5% холестерина, 2,5% PEG-2К и 16% DOPE.

[0167] ELISpot: для детектирования Т-клеточных ответов после иммунизации использовали набор mouse IFN γ ELISpot (Mabtech) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, готовили суспензии отдельных спленоцитов и высевали при титре 5×10^6 клеток/мл в среду AIM V со следующими условиями стимуляции: только среда (имитационный контроль), РМА и иономицин (положительный контроль) и CD4 (KSSFFRNVVWLIKKN) (SEQ ID NO: 9) и пептиды CD8 (IYSTVASSL) (SEQ ID NO: 10) из НА вируса гриппа A/Vietnam/2004/1203 (H5N1). Пептиды использовали в конечной концентрации 1-10 мкг/мл. Пятнообразующие единицы визуализировали, количественно оценивали и наносили на график на миллион клеток.

[0168] Величину HPV-специфических Т-клеточных ответов определяли следующим образом: анализ IFN γ ELISpot выполняли с использованием набора Mouse IFN γ ELISpot PLUS (HRP) (MabTech) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, спленоциты выделяли и ресуспендировали до титра 5×10^6 клеток/мл в среде, содержащей пептиды, представляющие CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеточные эпитопы к ВПЧ, РМА/иономицин в качестве положительного контроля или ДМСО в качестве имитационной контрольной стимуляции.

[0169] Окрашивание на внутриклеточные цитокины. Селезенки выделяли в соответствии с методами, описанными для ELISpots, и 1×10^6 клеток добавляли в среду, содержащую клетки, в общем объеме 200 мкл на лунку. Каждая лунка содержала пептиды, представляющие либо CD4⁺, либо CD8⁺ Т-клеточные эпитопы к ВПЧ, РМА/иономицин в качестве положительного контроля или ДМСО в качестве имитационной контрольной стимуляции. Через 1 ч в каждую лунку добавляли ингибитор транспорта белка GolgiPlugTM (BD Biosciences). Клетки инкубировали еще в течение 5 ч. После инкубации поверхность клеток окрашивали на CD8⁺ (53-6,7), CD4⁺ (GK1.5), B220 (B238128), Gr-1 (RB6-8C5), CD16/32 (M93) с использованием стандартных методов. После поверхностного окрашивания клетки фиксировали и окрашивали на внутриклеточные белки в соответствии со стандартными методами для IFN γ (RPA-T8), IL-2 (JES6-5H4) и TNF (MP6-XT22). Затем клетки анализировали на проточном цитометре, и полученные файлы FCS анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.4.1.

[0170] Антитела. Ответную выработку антител для измерения общего количества ВПЧ E6/E7-специфичного IgG, оценивали с помощью наборов ELISA производства Alpha Diagnostic International в соответствии с инструкциями производителя.

[0171] Анализ ингибирования гемагглютинации (HAI): для приготовления сыворотки раствор RDE готовили в соответствии с инструкциями производителя.

Неиспользованный раствор можно хранить аликвотными порциями по 1 мл при температуре от -15° до -25°C до одного года. 20 мкл сыворотки отбирали пипеткой для каждого тестируемого образца и положительного контроля в отдельные микроцентрифужные пробирки. В каждую пробирку добавляли по 80 мкл RDE. Количество можно увеличить при использовании того же соотношения (например, 40 мкл сыворотки и 160 мкл RDE), если требуется дополнительная сыворотка. Сыворотки с высоким титром и положительные контроли предварительно разводили перед добавлением RDE (например, 5 мкл сыворотки и 20 мкл PBS плюс 100 мкл RDE). Образцы и положительный контроль инкубировали на водяной бане при температуре $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 ч (день 1). Сыворотку и RDE инактивировали нагреванием на водяной бане при $56^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 35-45 мин (день 2). Сыворотки быстро центрифугировали для удаления конденсата с крышек пробирок. 100 мкл 1X PBS добавляли из расчета на каждые 100 мкл обработанной сыворотки для начального разведения 1:10. Вирус разводили до 4 гемагглютинирующих единиц/25 мкл с использованием 1X PBS/0,75% BSA и помещали на жидкий лед. Для контрольного планшета 25 мкл PBS добавляли в колонки 9-10 96-луночного планшета с V-образным дном. 50 мкл OBS добавляли в колонки 11-12, но только в ряды С-Н. Для планшетов с образцами во все лунки в ряду В-Н (колонки 1-12) добавляли 25 мкл PBS. 50 мкл образцов сыворотки добавляли в дублирующие соседние лунки в ряду А. 25 мкл сыворотки, представляющей собой отрицательный контроль, добавляли в лунки 11А, 11В, 12А, 12В на контрольном планшете. 25 мкл положительного контроля добавляли в лунки 9А и 10А на контрольном планшете. На планшетах с образцами ряд А (колонки 1-12) перемешивали 3-4 раза. 25 мкл переносили в ряд В, продолжая проведение двукратных разведений в ряду Н. 25 мкл из ряда Н отбрасывали. На контрольном планшете ряд А (колонки 1-10) перемешивали 3-4 раза. 25 мкл переносили в ряд В, продолжая проведение двукратных разведений в ряду Н. 25 мкл из ряда Н отбрасывали. 25 мкл разбавленного вируса добавляли во все лунки планшета(ов) для образцов и в колонки 9-10 контрольного планшета. Вирус также вносили в лунки 11А, 11В, 12А и 12В на контрольном планшете. В лунки 11Е и 12Е вносили по 50 мкл разведенного вируса, перемешивали 3-4 раза и проводили двукратные разведения в лунках 11Н и 12Н. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 50-60 мин. Во все лунки добавляли по 50 мкл 1,1% HRBC. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 50-60 мин. Планшеты наклоняли для считывания картины агглютинации.

[0172] Для оценки влияния на *in vivo* векторов, полученных из CHIKV и SINV в данном эксперименте, их сравнивали с синтетическим репликоном VEE, полученным из ТС-83, который обычно используется в данной области. В данном примере материал, формулированный в LNP, демонстрирует титры HAI через 14 дней после введения однократной дозы у всех животных для каждого вектора. Аналогично все векторы, формулированные в LNP, генерировали как CD4+, так и CD8+ HA-специфические Т-клеточные ответы в селезенке, что определяли с использованием анализа ELISpot. В

данном случае, было отмечено, что некоторые из векторов, полученных из CHIKV и SINV, приводили к достоверному повышению CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеточных ответов в зависимости от того, какой эпитоп использовали для стимуляции (фиг. 5А-5В). Данный результат показал, что векторы, полученные из CHIKV и SINV, сами по себе могут генерировать дифференциальные ответы по сравнению со стереотипными векторами на основе VEE. Для применения в качестве вакцин был бы желателен более высокий Т-клеточный ответ и ответная выработка антител против кодированного белка, тогда как более низкие Т-клеточные ответы и ответная выработка антител против кодированного белка являются более предпочтительными для биотерапевтических средств.

Пример 5. Оценка *in vivo* модифицированных векторов CHIKV и SINV - онкология

[0173] В данном примере приведены результаты экспериментов *in vivo*, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации синтетическими репликонными конструкциями CHIKV и SINV, описанными в примерах 1 и 2 выше (например, неформулированные и формулированные в LNP векторы). В этих экспериментах конструировали и затем оценивали синтетические репликонные конструкции, полученные из следующих альфавирусов: VEE, CHIKV S27, CHIKV DRDE, SINV AR86 и SINV Girdwood.

[0174] Мыши и инъекции. Самок мышей BALB/c получали из питомника Charles River Labs, Envigo или Jackson Laboratories. В день введения, 10 мкг материала вводили внутримышечно в обе четырехглавые мышцы бедра. Векторы вводили либо в неформулированном виде в физиологическом растворе, либо в формулированном виде в LNP. Проводили наблюдение за животными по массе тела и другим общим показателям на протяжении всего исследования. Для исследований иммуногенности животным проводили введение на день 0 и день 21. Селезенки отбирали на день 35.

[0175] Формуляция в LNP. РНК-репликон формулировали в липидных наночастицах с использованием микрожидкостного смесителя и определяли размер частиц, полидисперсность с использованием динамического светорассеяния и эффективность инкапсуляции. Молярные соотношения липидов, использованные при приготовлении частиц LNP, составляли 35% C12-200, 46,5% холестерина, 2,5% PEG-2K и 16% DOPE. Альтернативно, можно использовать готовую композицию липидов, полученную от другой компании, например, производства Precision Nanosystems, Inc.

[0176] ELISpot. Для оценки величины ESR1-, HER2- или HER3-специфических Т-клеточных ответов, проводили анализ IFN γ ELISpot с использованием набора Mouse IFN γ ELISpot PLUS (HRP) (MabTech) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, спленоциты выделяли и ресуспендировали до титра 5×10^6 клеток/мл в среде, содержащей пептиды, представляющие либо CD4⁺, либо CD8⁺ Т-клеточные эпитопы к ESR1 (см., например, таблицу 1), и пептидную библиотеку для HER2 ECD, РМА/иономицин в качестве положительного контроля или ДМСО в качестве имитационной контрольной стимуляции (фиг. 6).

Пептиды ESR1

ESR1	Последовательности пептидов	SEQ ID NO
ESR1 K303R	LWPSPLMIKRSKRNSLALSLTADQM	SEQ ID NO: 11
ESR1 E380Q	VDLTLHDQVHLLQCAWLEILMIGLV	SEQ ID NO: 12
ESR1 Y537N	SMKCKNVVPLNDLLEMLDAHRL	SEQ ID NO: 13
ESR1 Y537S	SMKCKNVVPLSDLLEMLDAHRL	SEQ ID NO: 14
ESR1 Y537C	SMKCKNVVPLCDLLEMLDAHRL	SEQ ID NO: 15
ESR1 D538G	SMKCKNVVPLYGLLEMLDAHRL	SEQ ID NO: 16

[0177] Для оценки влияния на *in vivo* векторов, полученных из CHIKV и SINV, в данном эксперименте их сравнивали с синтетическим репликоном VEE, полученным из TC-83, который обычно используется в данной области. В данном примере несколько активирующих мутаций неоантигенов (кодированных как 31-мерные пептиды, центрированных вокруг мутации) кодировали для ESR1 и P3K, усеченного опухоль-ассоциированного антигена (внеклеточный и трансмембранный домен HER2, т.е. ген ERBB2), и опухоль-ассоциированного антигена с подавленной киназной активностью (HER3, т.е. ген ERBB3) в том же остоле. Подобно исследованию с вирусом гриппа, все векторы, формулированные в LNP, демонстрировали Т-клеточные ответы у некоторых или всех мышей против мутаций ESR1 и HER2. Величина общего Т-клеточного ответа, измеренная с использованием ELISpot, зависела от каждого антигена. Однако в ответах на каждый отдельный антиген в некоторых случаях отдельные векторы достоверно отличались от VEE, тогда как в других случаях каждый вектор функционировал сравнимо с VEE (фиг. 6). Полученные данные подтверждают, что новые CHIKV- и SINV-векторы функционируют иначе, чем VEE, и в сочетании с данными примера 4 демонстрируют, что различия непредсказуемы и зависят также от кодированного белка. Это подтверждает пригодность данных векторов как предпочтительных как для вакцин, так и для биотерапевтических средств в зависимости от мишени.

[0178] Несмотря на то, что были раскрыты конкретные варианты настоящего раскрытия, следует понимать, что возможны различные модификации и комбинации, которые рассматриваются в пределах истинного духа и объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, нет никаких намерений ограничивать точный реферат и раскрытие, представленное в настоящем изобретении.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или РНК-репликон вируса Чикунгунья (CHIKV), где модифицированный геном или РНК-репликон CHIKV не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

2. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или РНК-репликон вируса Синдбис (SINV), где модифицированный геном или РНК-репликон SINV не имеет по меньшей мере участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

3. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-2, где модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не имеет значительного участка последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков.

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, где модифицированный вирусный геном или РНК-репликон не содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки.

5. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащая одну или более экспрессионных кассет, где каждая из экспрессионных кассет содержит промотор, функционально связанный с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, где по меньшей мере одна из экспрессионных кассет содержит субгеномный (sg) промотор, функционально связанный с последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.6, где промотор sg представляет собой субгеномный промотор 26S.

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащая одну или более нетранслируемых областей (UTR).

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.8, где по меньшей мере одна из UTR представляет собой гетерологичную UTR.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 5-9, где по меньшей мере одна из экспрессионных кассет содержит кодирующую последовательность представляющего интерес гена (GOI).

11. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.10, где GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из терапевтического полипептида, профилактического полипептида, диагностического полипептида, нутрицевтического полипептида, промышленного фермента и репортерного полипептида.

12. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 10-11, где GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антитела, антигена, иммуномодулятора,

фермента, сигнального белка и цитокина.

13. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 10-12, где кодирующая последовательность GOI оптимизирована для экспрессии на более высоком уровне, чем уровень экспрессии референсной кодирующей последовательности.

14. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-13, где последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4.

15. Рекомбинантная клетка, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14.

16. Рекомбинантная клетка по п.15, где рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку.

17. Рекомбинантная клетка по п.16, где рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного.

18. Рекомбинантная клетка по п.17, где клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного.

19. Рекомбинантная клетка по п.18, где рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого.

20. Рекомбинантная клетка по п.19, где клетка насекомого представляет собой клетку комара.

21. Рекомбинантная клетка по п.18, где рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

22. Рекомбинантная клетка по п.18, где рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки CV1 обезьяны, трансформированной SV40 (COS-7), клетки почки эмбриона человека (например, НЕК 293 или клетка НЕК 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), мышинной клетки Сертоли (например, клетки ТМ4), клетки почки обезьяны (CV1), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки печени человека (Нер G2), клетки рака молочной железы мыши (ММТ 060562), клетки TRI, клетки FS4, клетки яичника китайского хомячка (клетки СНО), клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки CHME5 человека, клетки PER.C6 человека, клетки мышинной миеломы NS0, клетки плоскоклеточной карциномы гортани человека, фибробласта человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, эндотелиальной клетки человека, астроцитарной клетки человека, макрофагальной клетки человека, клетки RAW 264.7 человека, клетки 3T3 мыши, клетки L929 мыши, клетки соединительной ткани мыши, мышечной клетки мыши и клетки почки кролика.

23. Клеточная культура, содержащая по меньшей мере одну рекомбинантную клетку по любому из пп. 15-22 и культуральную среду.

24. Трансгенное животное, содержащее конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14.

25. Трансгенное животное по п.24, где животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное.

26. Трансгенное животное по п.25, где животное представляет собой насекомое.

27. Трансгенное животное по п.26, где насекомое представляет собой комара.

28. Трансгенное животное по п.25, где животное представляет собой млекопитающее.

29. Трансгенное животное по п.28, где животное представляет собой млекопитающее, отличное от человека.

30. Способ получения представляющего интерес полипептида, включающий: (i) разведение трансгенного животного по любому из пп. 24-29 или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 11-14 в условиях, в которых трансгенное животное или рекомбинантная клетка продуцируют полипептид, кодированный GOI.

31. Способ получения представляющего интерес полипептида у субъекта, включающий введение субъекту конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 11-14.

32. Способ по п.31, где субъектом является позвоночное животное или беспозвоночное животное.

33. Способ по любому из пп. 31-32, где субъектом является насекомое.

34. Способ по любому из пп. 31-32, где субъектом является субъект-млекопитающее.

35. Способ по п.34, где субъект-млекопитающее представляет собой человека.

36. Рекомбинантный полипептид, полученный способом по любому из пп. 30-35.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент и:

(a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14;

(b) рекомбинантную клетку по любому из пп. 15-22; и/или

(c) рекомбинантный полипептид по п.36.

38. Фармацевтическая композиция по п.37, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

39. Фармацевтическая композиция по п.37, содержащая рекомбинантную клетку по любому из пп. 15-22 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

40. Фармацевтическая композиция по п.37, содержащая рекомбинантный полипептид по п.36 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

41. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-40, где композиция составлена в липосоме, наночастице на основе липида (LNP) или полимерной

наночастице.

42. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-41, где композиция представляет собой иммуногенную композицию.

43. Фармацевтическая композиция по п.42, где иммуногенная композиция составлена в виде вакцины.

44. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-41, где композиция является по существу неиммуногенной для субъекта.

45. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-44, где фармацевтическая композиция составлена в виде адьюванта.

46. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 37-45, где фармацевтическая композиция составлена для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интранодального введения, интратуморального введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального, интраокулярного, ректального и перорального введения.

47. Способ индукции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту композиции, содержащей:

- (a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14;
- (b) рекомбинантную клетку по любому из пп. 15-22;
- (c) рекомбинантный полипептид по п.36; и/или
- (d) фармацевтическую композицию по любому из пп. 37-46.

48. Способ профилактики и/или лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, содержащей:

- (a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14;
- (b) рекомбинантную клетку по любому из пп. 15-22;
- (c) рекомбинантный полипептид по п.36; и/или
- (d) фармацевтическую композицию по любому из пп. 37-46.

49. Способ по п.48, где патологическое состояние представляет собой пролиферативное заболевание или микробную инфекцию.

50. Способ по любому из пп. 47-49, где у субъекта имеет место или имеется подозрение на наличие патологического состояния, ассоциированного с пролиферативным заболеванием или микробной инфекцией.

51. Способ по любому из пп. 47-50, где вводимая композиция приводит к повышению продукции интерферона у субъекта.

52. Способ по любому из пп. 47-51, где композицию вводят субъекту индивидуально в виде единственной терапии (монотерапии) или в виде первой терапии в комбинации по меньшей мере с одной дополнительной терапией.

53. Способ по п.52, где по меньшей мере одна дополнительная терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, гормональной

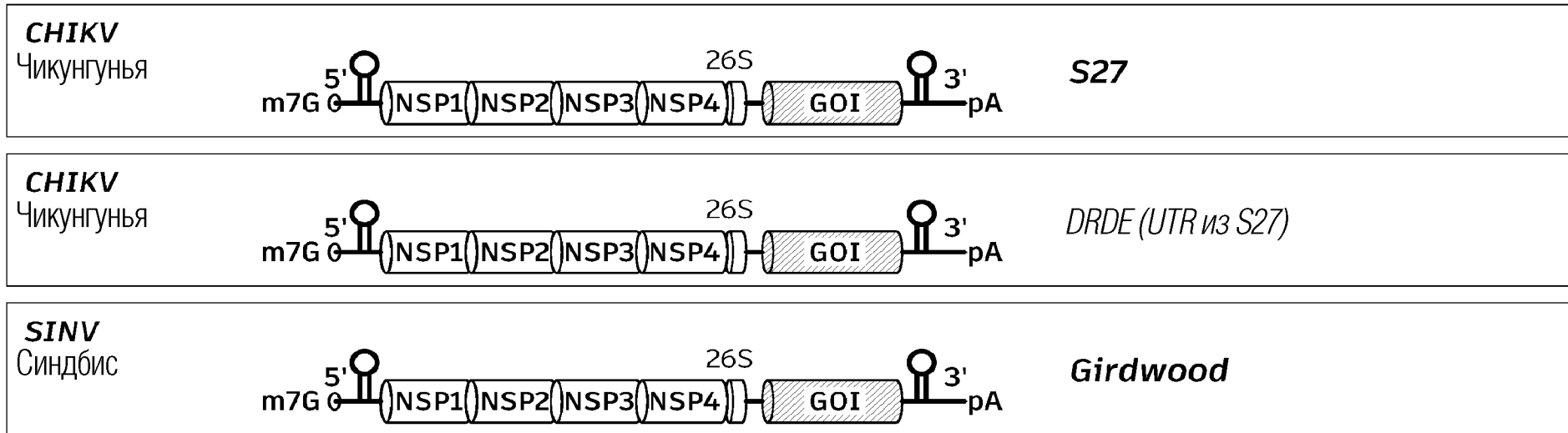
терапии, токсинотерапии, таргетной терапии и хирургического вмешательства.

54. Набор для индукции иммунного ответа, для профилактики и/или лечения патологического состояния или микробной инфекции, содержащий:

- (a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14;
- (b) рекомбинантную клетку по любому из пп. 15-22;
- (c) рекомбинантный полипептид по п.36; и/или
- (d) фармацевтическую композицию по любому из пп. 37-46.

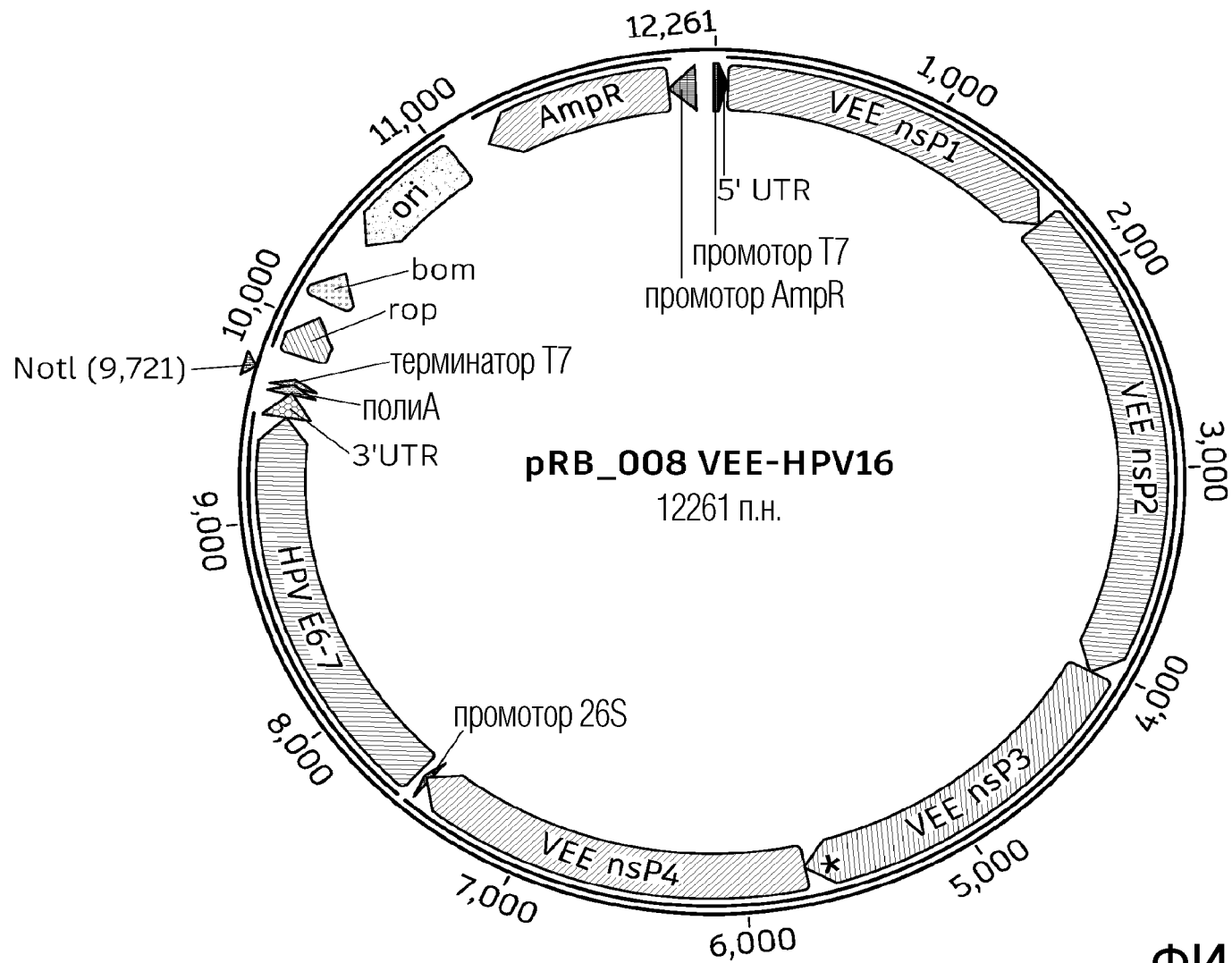
Схема

Штамм

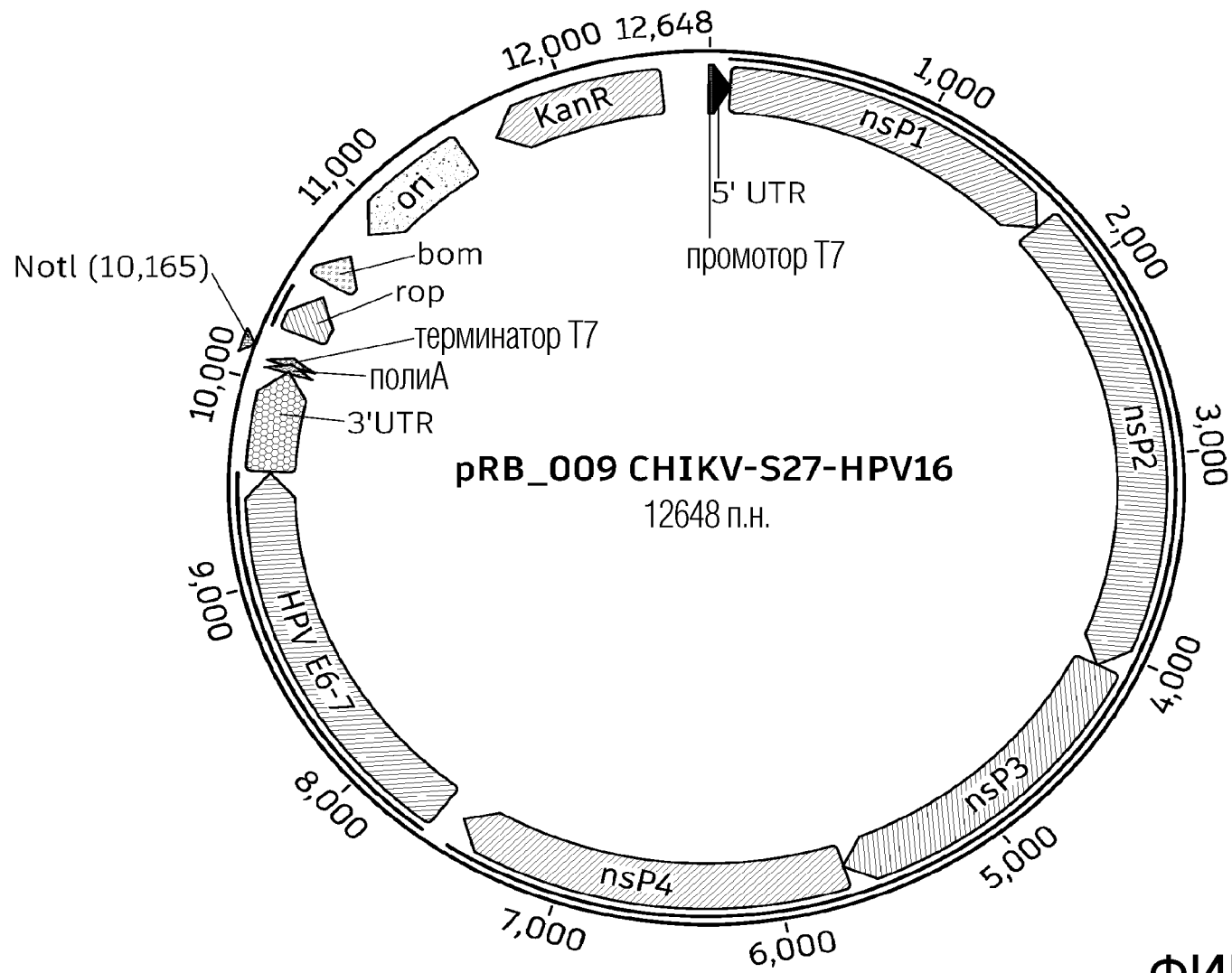


1/17

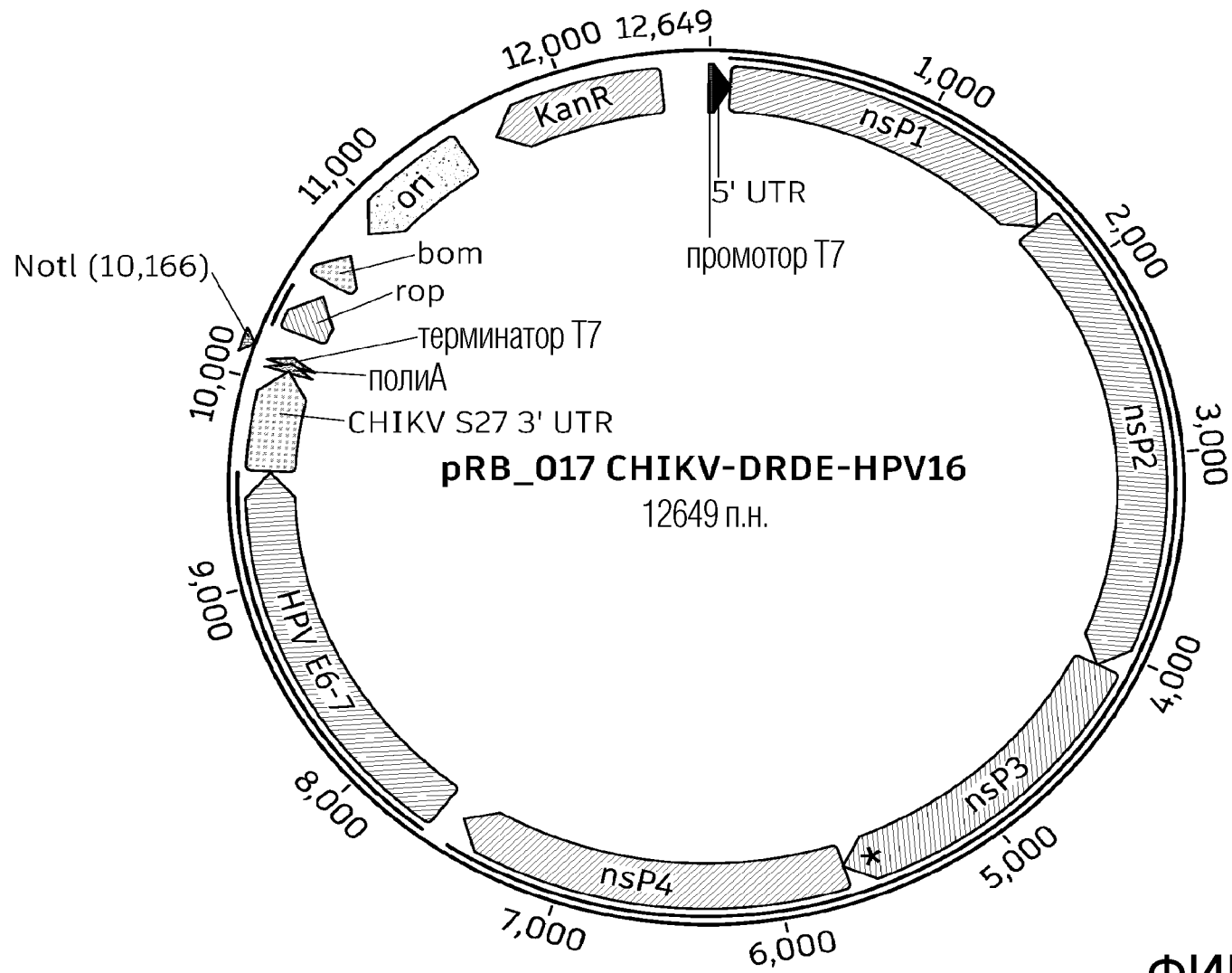
ФИГ. 1



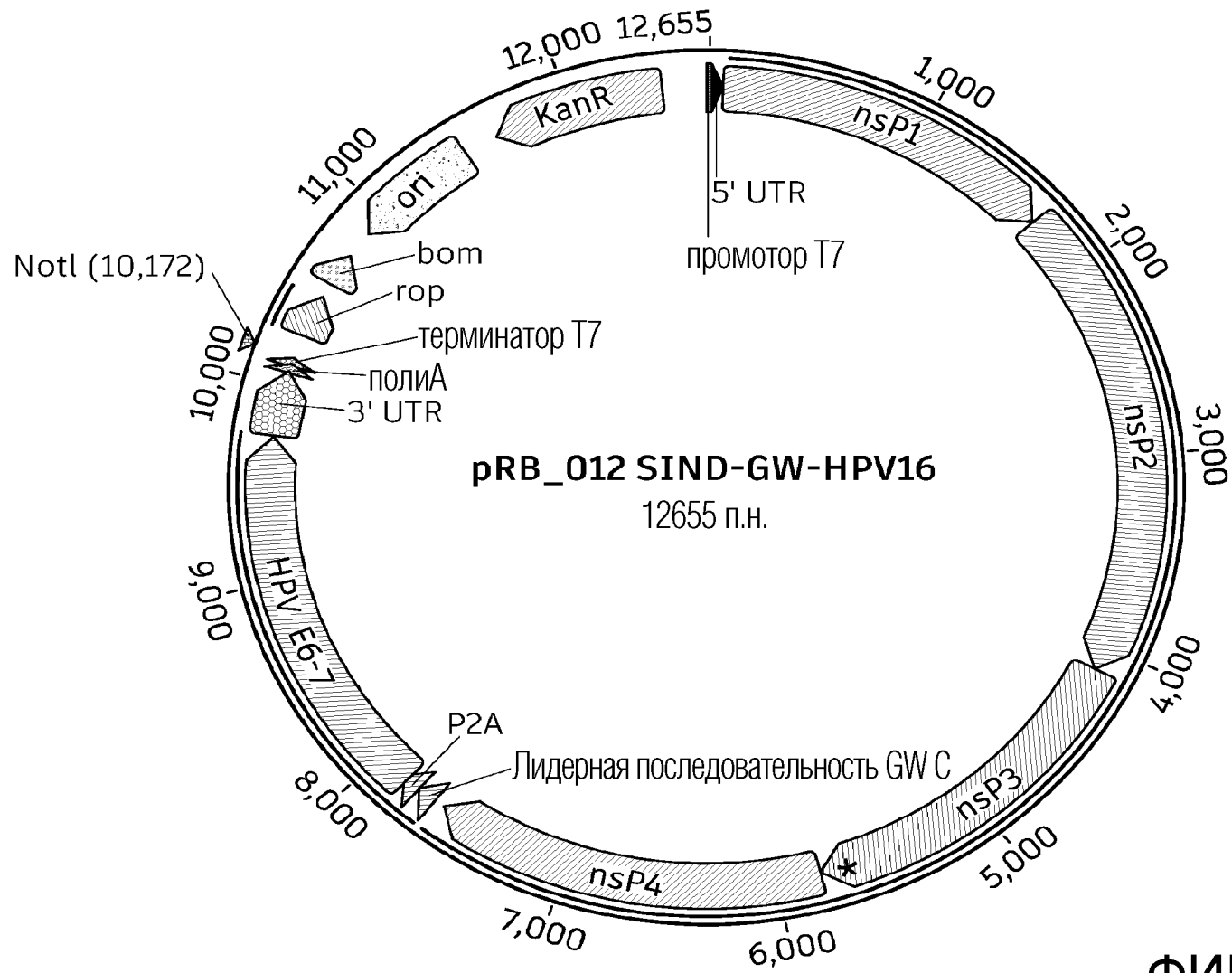
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

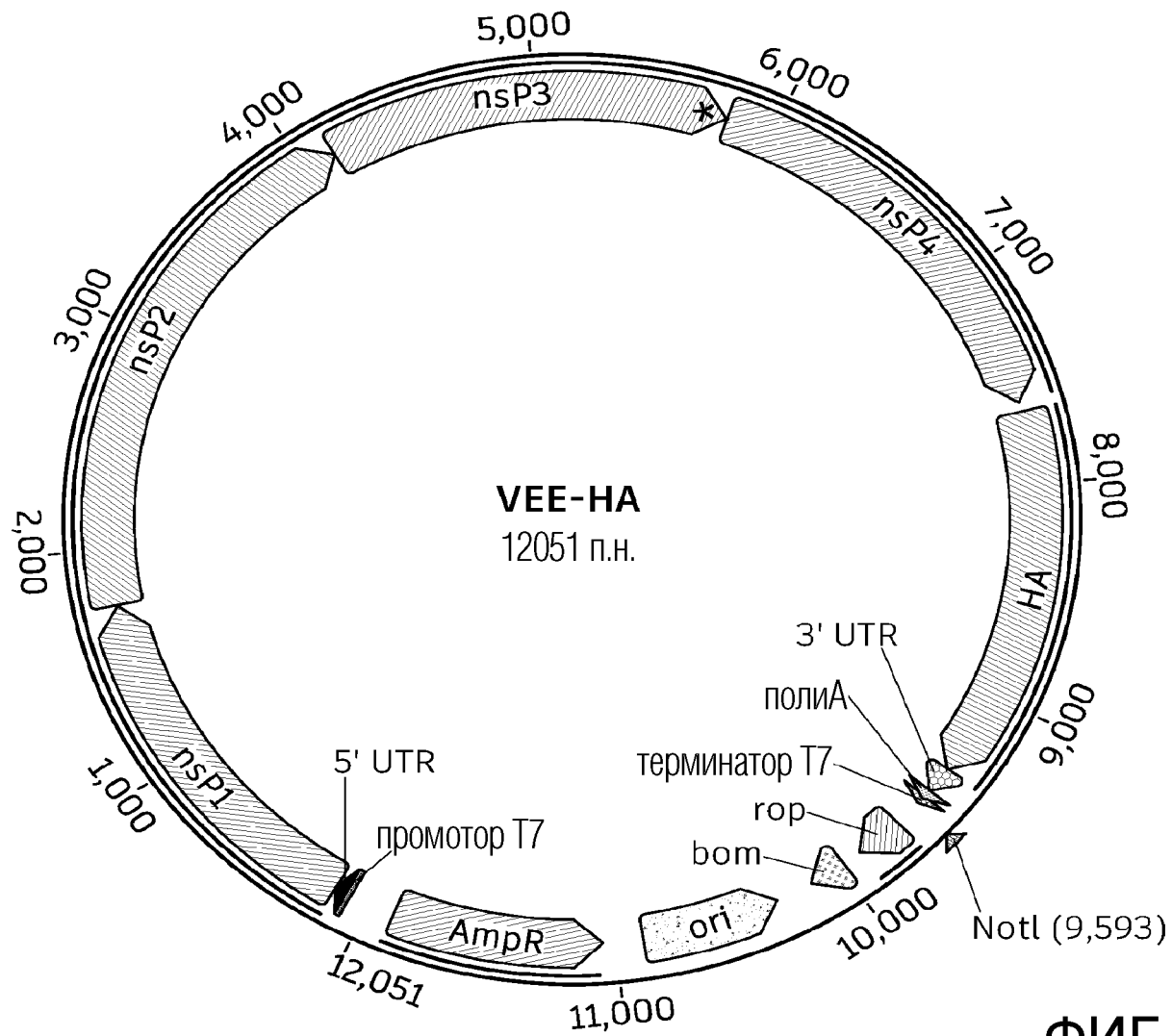


ФИГ. 2С

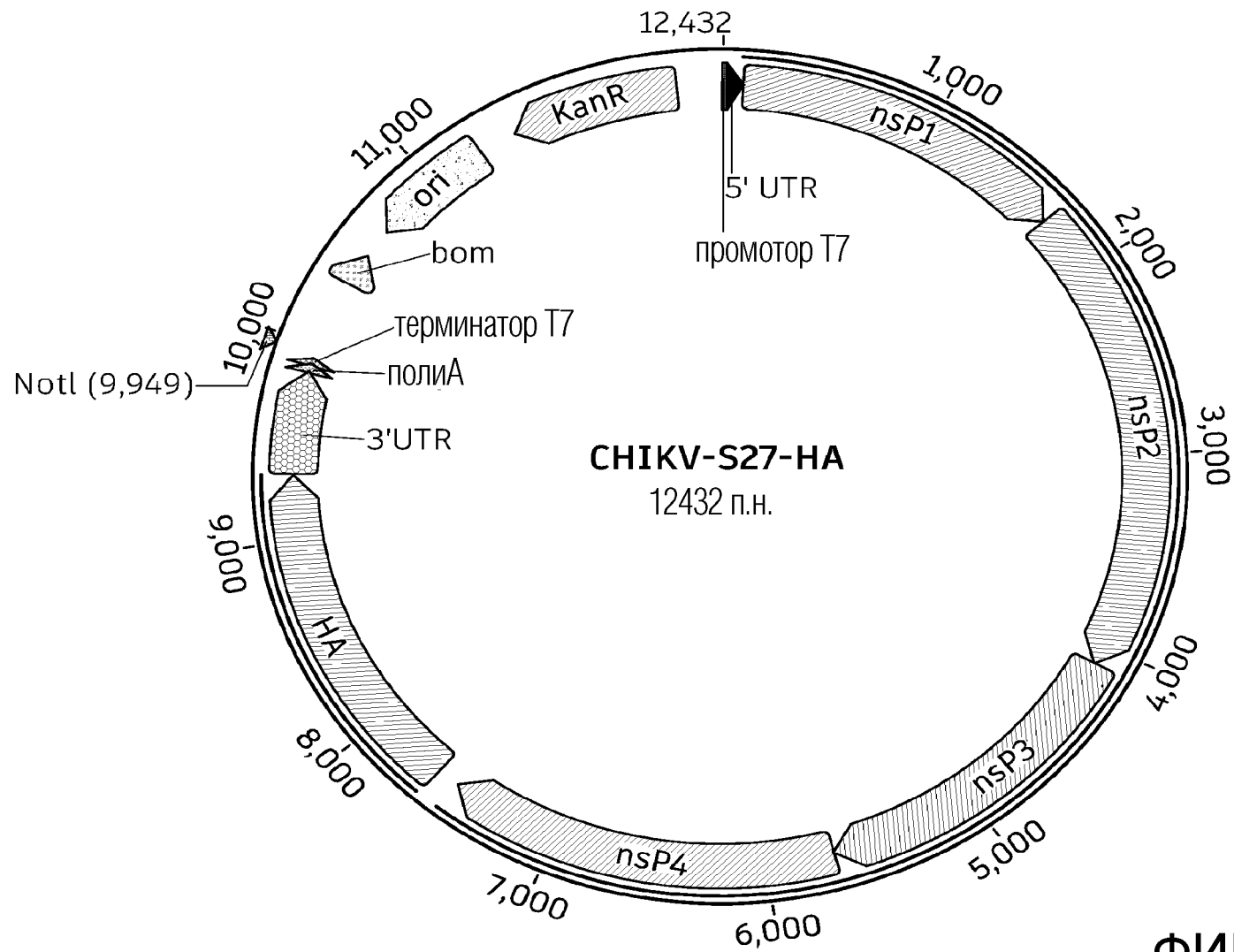


5/17

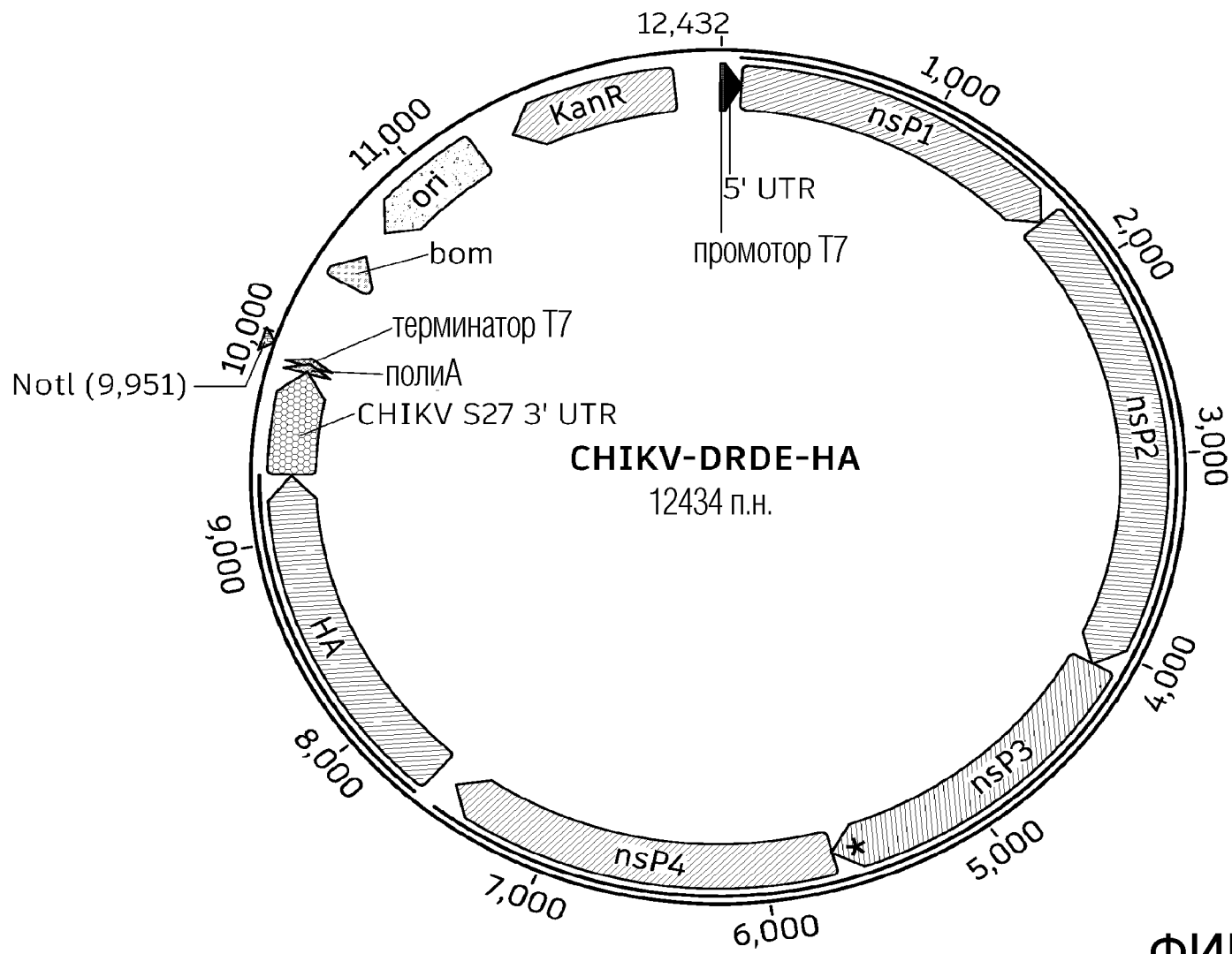
ФИГ. 2D



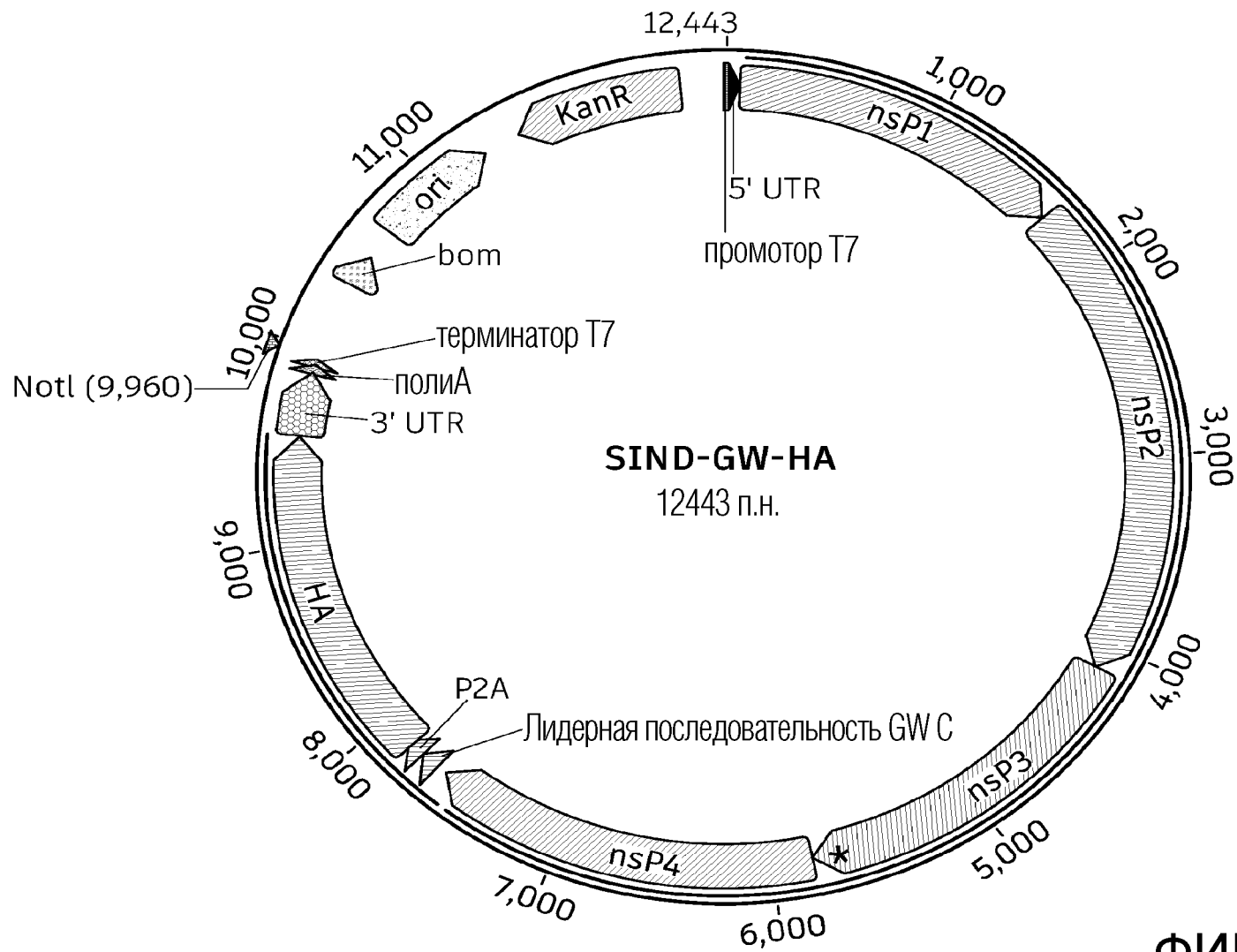
ФИГ. 3А



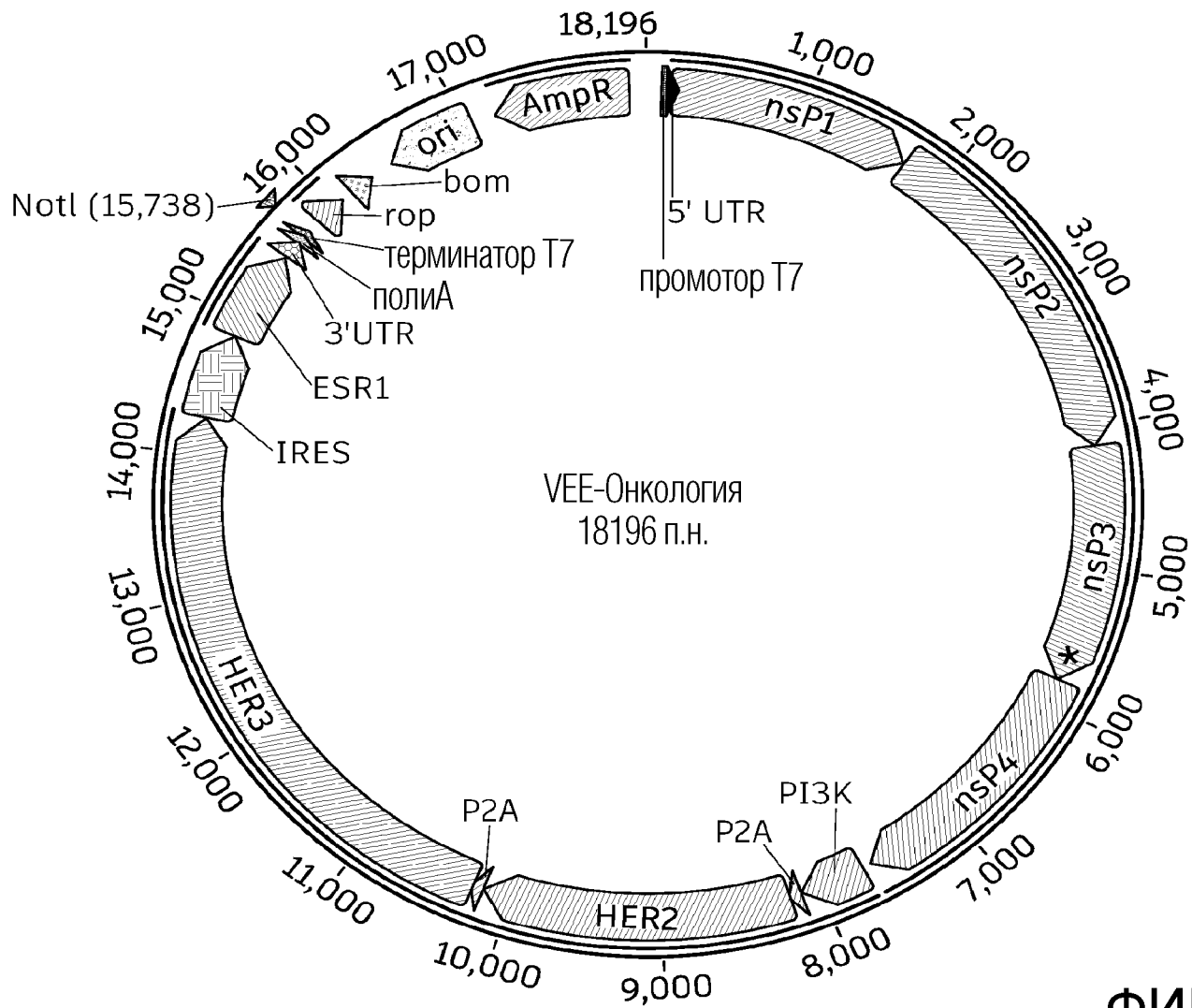
ФИГ. 3В



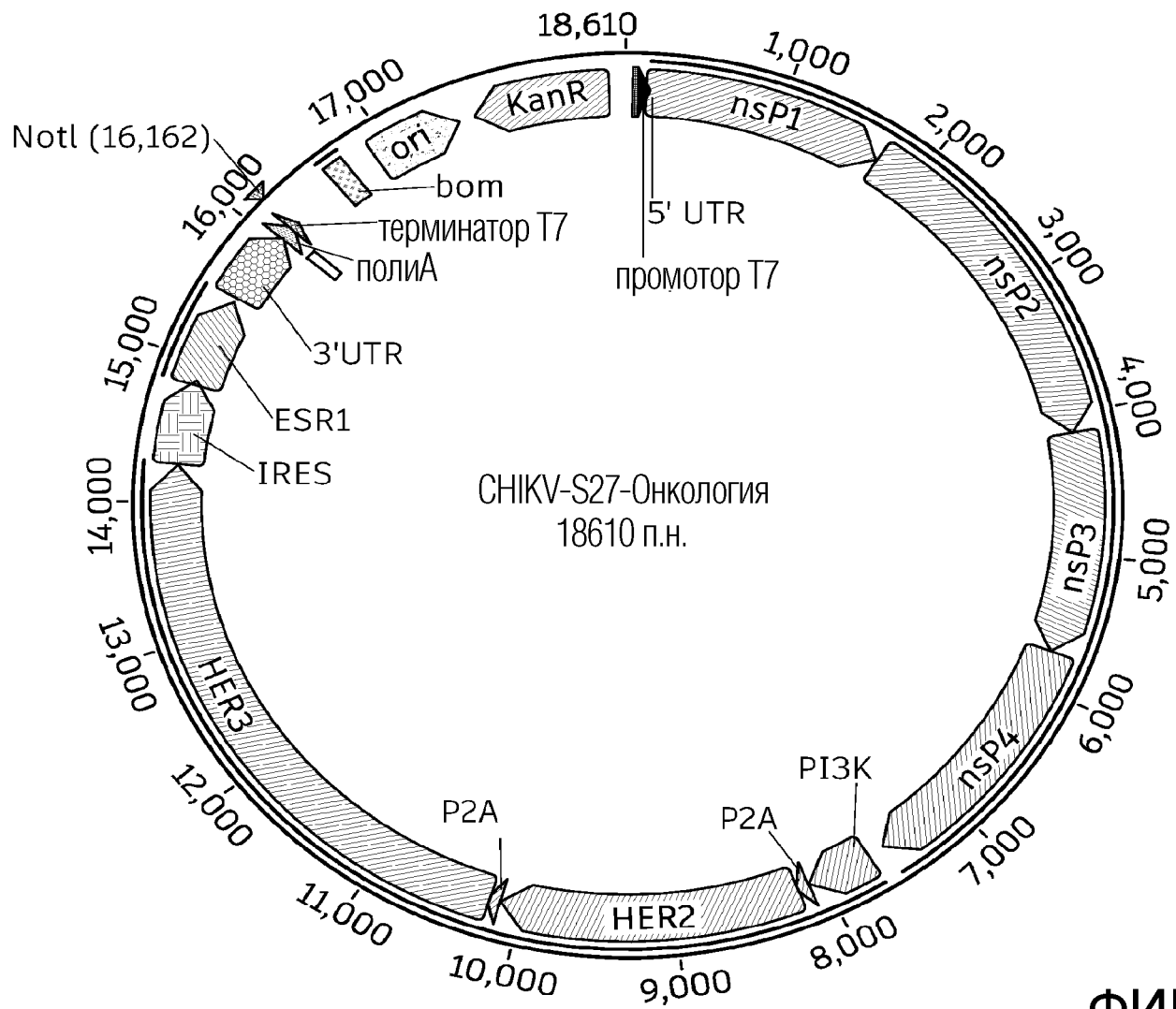
ФИГ. 3С



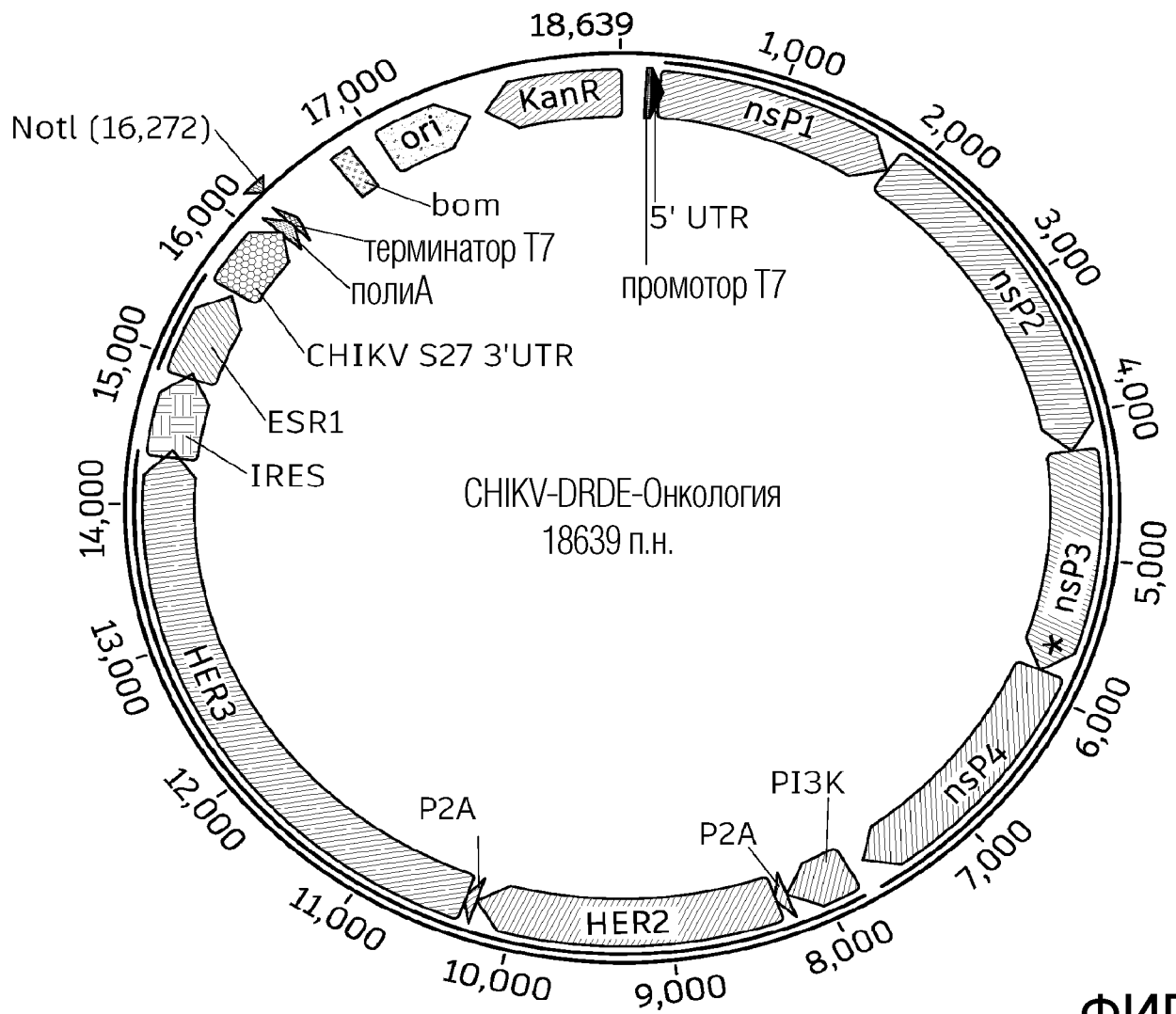
ФИГ. 3D



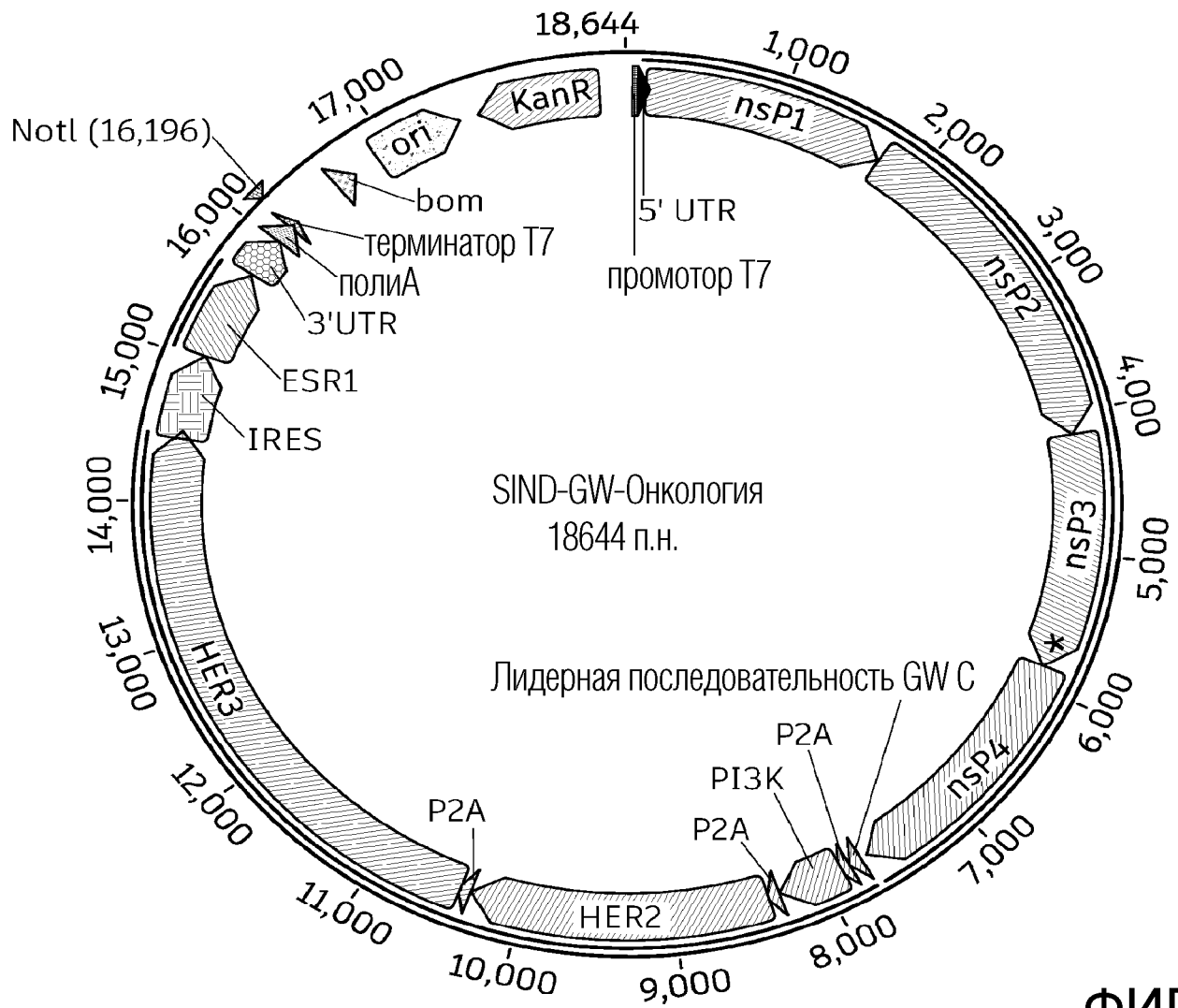
ФИГ. 3Е



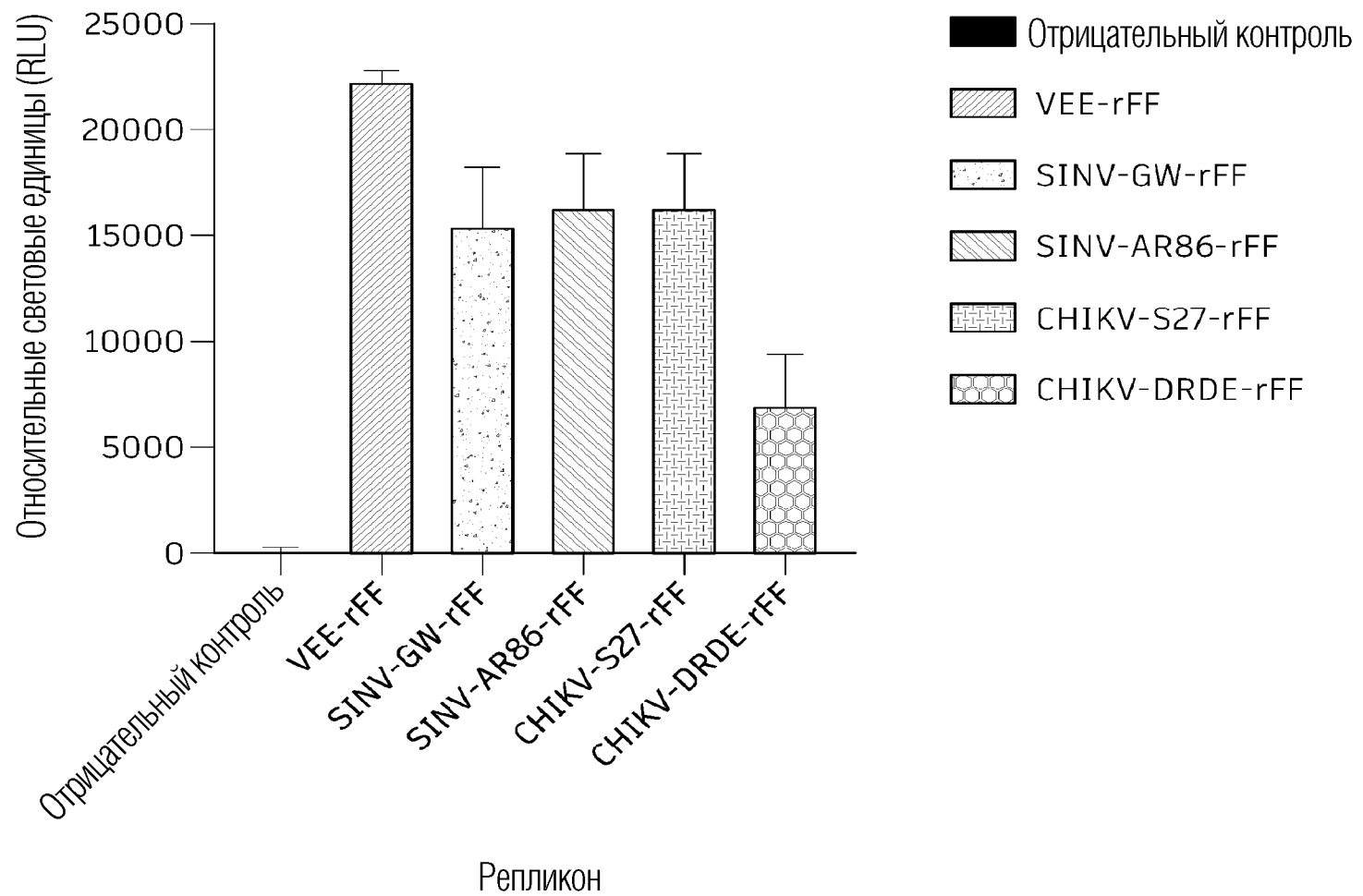
ФИГ. 3F



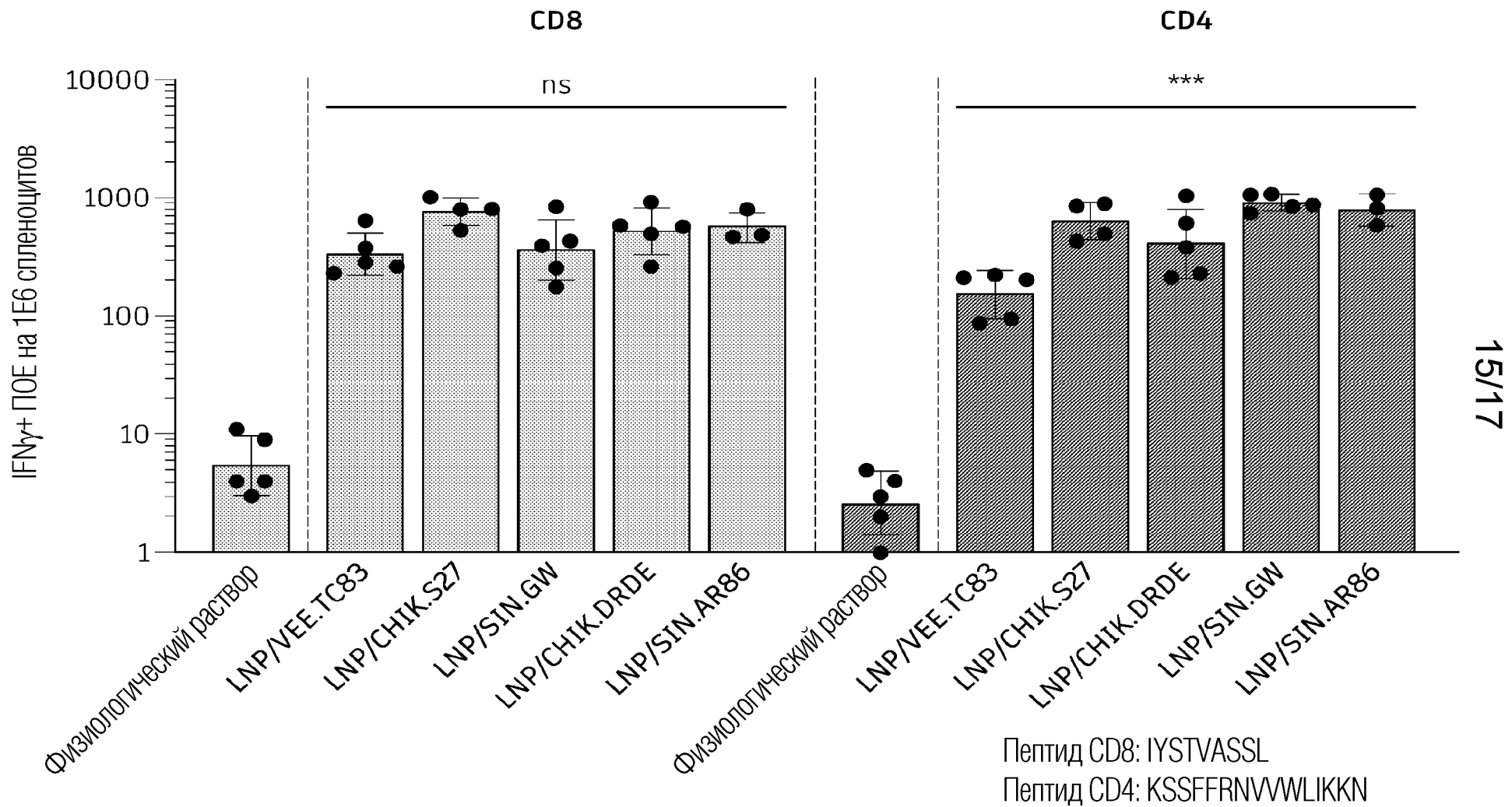
ФИГ. 3G



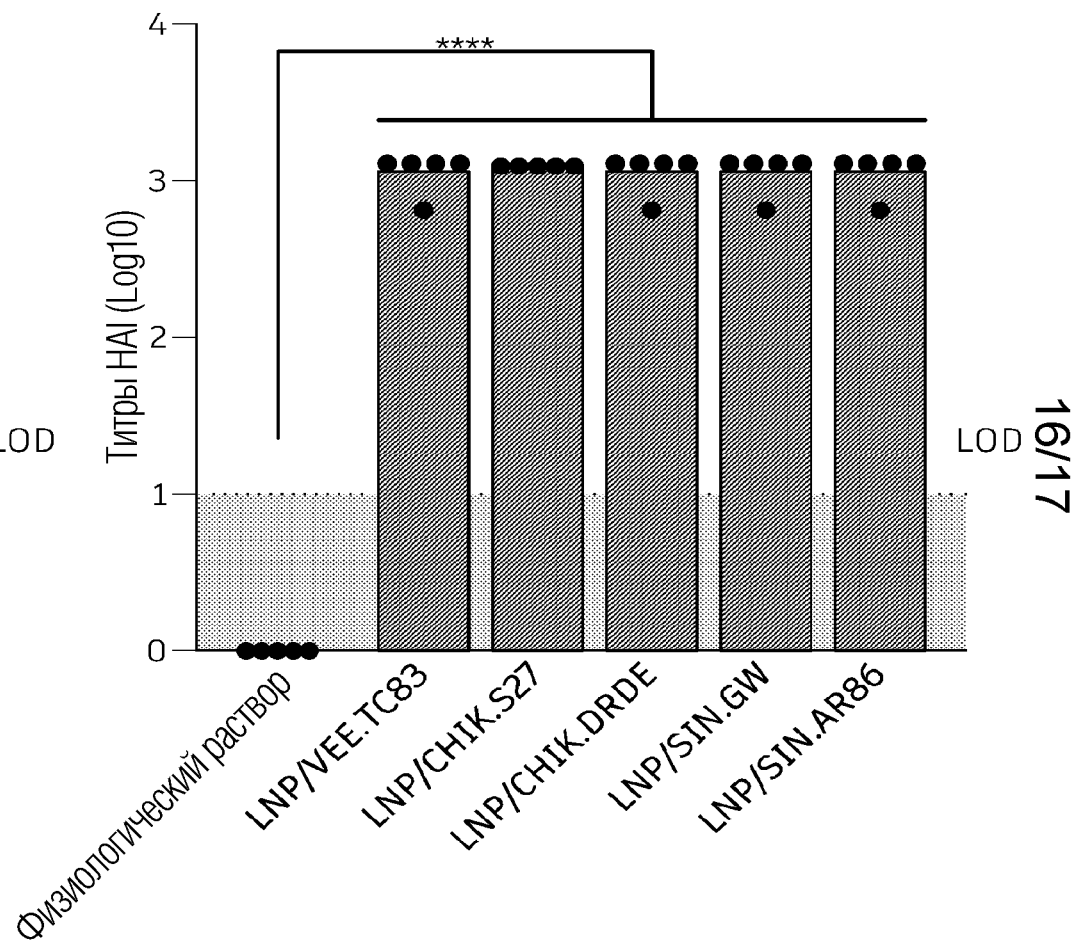
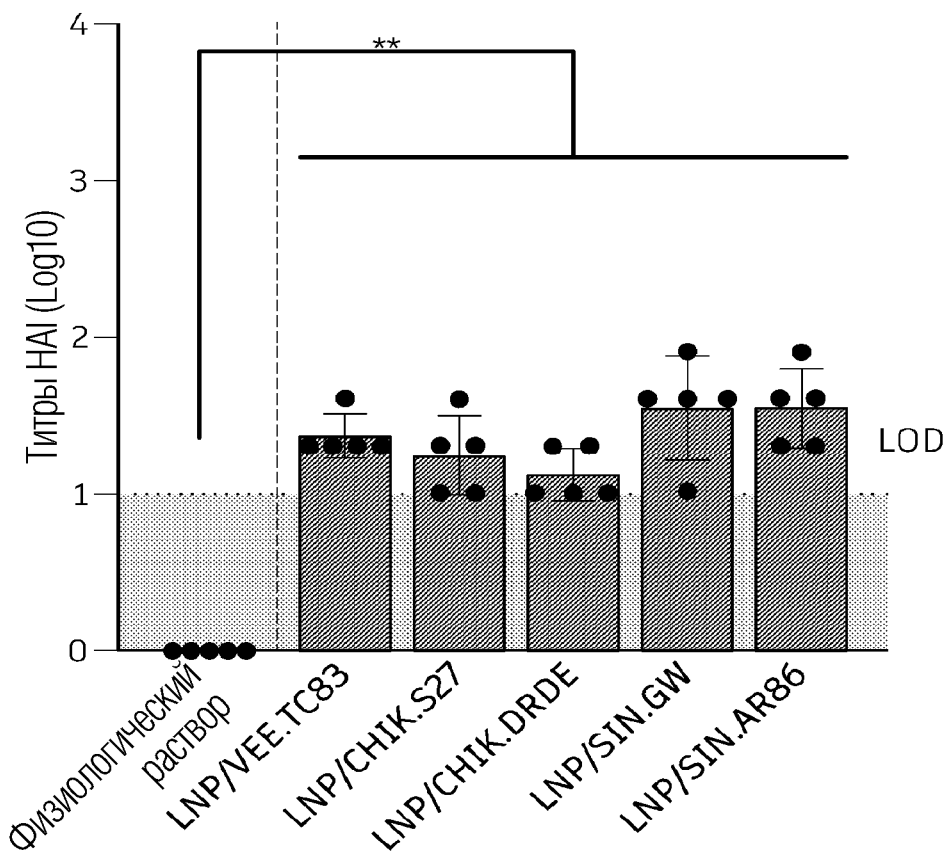
ФИГ. 3Н



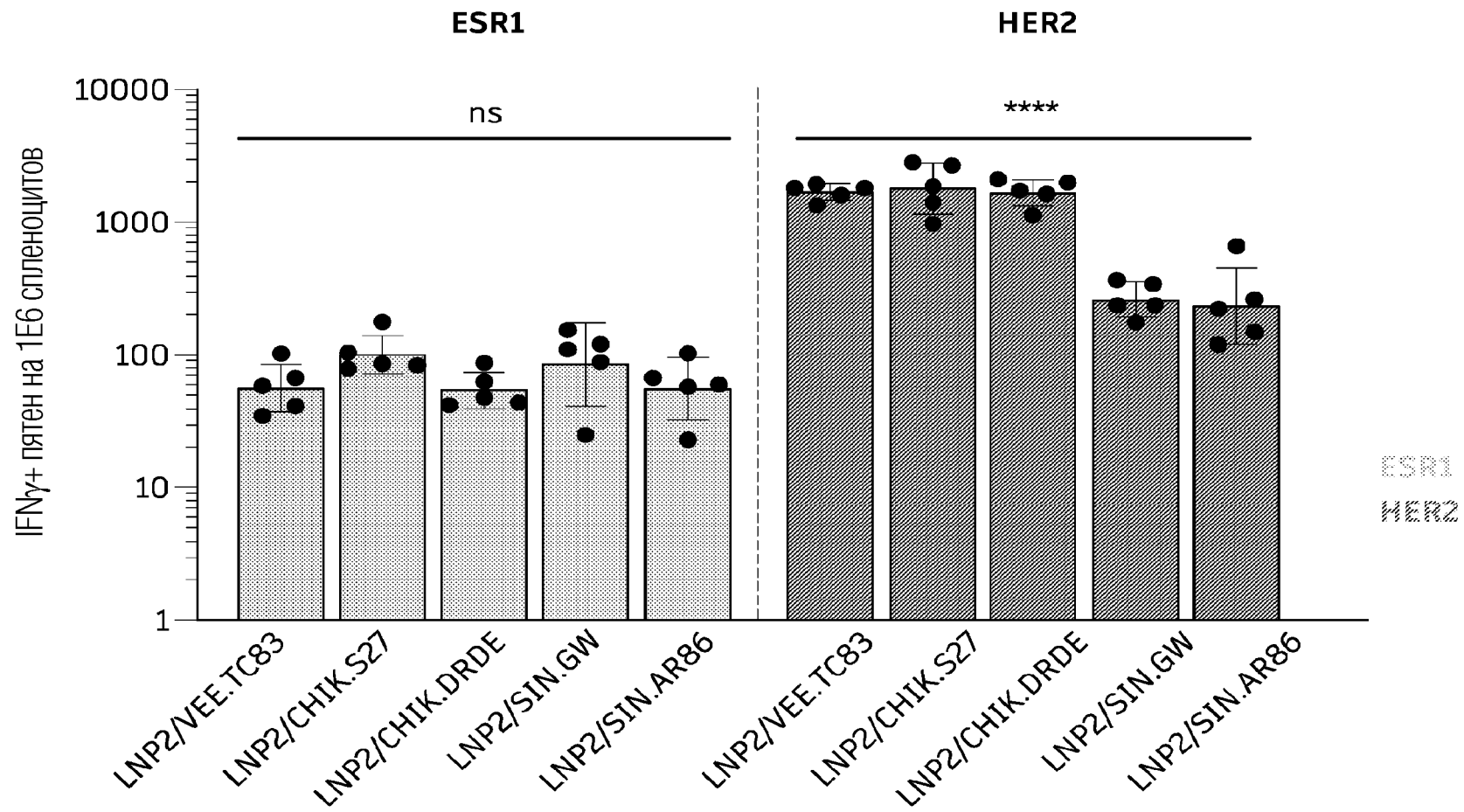
ФИГ. 4



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФІГ. 6