

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392963 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.19(51) Int. Cl. C07K 14/18 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.04.20(54) АЛЬФАВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УНИВЕРСАЛЬНЫЕ АДАПТЕРЫ
ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ

(31) 63/177,656

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.21

Ван Натаниэль Стефен, Мияке-
Стоунер Сигеки Джозеф, Чоу Энни
Чиа-Цзун (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/025470

(87) WO 2022/226019 2022.10.27

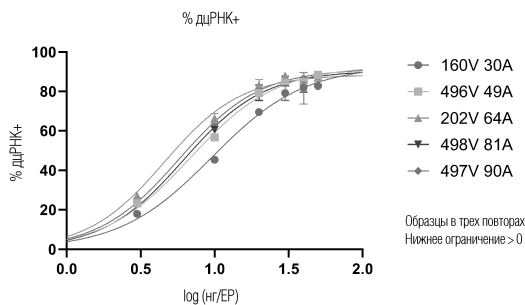
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

РЕПЛИКЕЙТ БАЙОСАЙЕНС, ИНК.
(US)

(57) Настоящее изобретение относится к области молекулярной вирусологии, включая молекулы нуклеиновых кислот, содержащие модифицированные вирусные геномы или репликоны (например, самореплицирующиеся РНК), содержащие их фармацевтические композиции, и применение таких молекул и композиций нуклеиновых кислот для продукции желательных продуктов в культурах клеток или в живом организме. Настоящее изобретение также относится к способам модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, также как к способам профилактики и/или лечения различных нарушений здоровья.



A1

202392963

202392963

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579187EA/061

АЛЬФАВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УНИВЕРСАЛЬНЫЕ АДАПТЕРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США серийный No. 63/177656, поданной 21 апреля 2021 г. Раскрытие процитированной выше заявки включено в настоящее описание в качестве ссылки, включая все чертежи.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее раскрытие относится к области молекулярной вирусологии и иммунологии, и в частности, относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим модифицированные вирусные геномы и репликоны (например, самореплицирующиеся РНК), к содержащим их фармацевтическим композициям, и к применению таких молекул и композиций нуклеиновых кислот для продукции желательных продуктов в культурах клеток или в живом организме. Настоящее изобретение также относится к способам модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, так же как к способам предотвращения и/или лечения различных нарушений здоровья.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Материал сопутствующего списка последовательностей, таким образом, приведен в настоящем описании в качестве ссылки. Текстовый файл сопутствующего списка последовательностей, названный 058462-503001WO_Sequence_Listing.txt, создан 12 апреля 2022 г. и составляет 227 кБ.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] В последние годы несколько различных групп вирусов животных подвергали генетической манипуляции либо посредством гомологичной рекомбинации, либо посредством прямого конструирования их геномов. Доступность систем обратной генетики для как ДНК-, так и РНК-вирусов создала новые перспективы для применения рекомбинантных вирусов, например, в качестве вакцин, экспрессирующих векторов, противоопухолевых средств, генотерапевтических векторов и переносчиков для доставки лекарственных средств.

[0005] Например, множество экспрессирующих векторов на основе вирусов выпущено для экспрессии гетерологичных белков в культивируемых рекомбинантных клетках. Например, применение модифицированных вирусных векторов для экспрессии гена в клетках-хозяевах продолжает расширяться. Недавние достижения в этом отношении включают дальнейшее развитие способов и систем для продукции мультисубъединичных белковых комплексов, и совместной экспрессии модифицирующих белок ферментов для улучшения продукции гетерологичного белка. Другой недавний прогресс в отношении технологий вирусных экспрессирующих векторов включает множество передовых применений генной инженерии для контроля экспрессии гена,

получения вирусных векторов, генотерапевтических применений *in vivo* и создания векторов для доставки вакцин.

[0006] Однако все еще существует потребность в более эффективных способах и системах для экспрессии представляющих интерес продуктов на платформах экспрессии на основе репликона РНК.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение относится, главным образом, к разработке иммунотерапевтических средств, таких как рекомбинантные конструкции нуклеиновых кислот и включающие их фармацевтические композиции, для применения в предотвращении и управлении течением различных нарушений здоровья, таких как пролиферативные нарушения и микробная инфекция. В частности, как более подробно описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям нуклеиновых кислот, содержащим последовательности, кодирующие модифицированный геном или репликон альфавируса, где значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК, заменена на синтетическую адаптерную молекулу, имеющую конфигурацию, чтобы способствовать вставке гетерологичной последовательности в последовательность, кодирующую модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК. Настоящее изобретение также относится к конструкциям нуклеиновых кислот, содержащим последовательности, кодирующие модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, где присутствует участок для рестрикционного фермента, вставленный после последовательности поли(А), для создания ДНК-матрицы, приводящего к получению в результате 3'-конца репликона РНК, содержащего только остатки аденилата. Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, считают, что альфавирусные репликоны РНК, содержащие только остатки аденилата, усиливают биологическую активность репликонов РНК. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам и трансгенным животным, сконструированным для включения одной или нескольких из конструкций нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, к способам получения представляющей интерес молекулы, так же как к фармацевтическим композициям. Кроме того, конкретные аспекты настоящего изобретения относятся к композициям и способам для модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, и/или для предотвращения и/или лечения различных нарушений здоровья, включая пролиферативные нарушения (например, злокачественные опухоли) и хронические инфекции.

[0008] В одном аспекте настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, включающим модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, где значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК, заменена на синтетическую адаптерную молекулу, имеющую

конфигурацию, чтобы способствовать вставке гетерологичной последовательности в модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, и где синтетическая адаптерная молекула имеет формулу I:

[5'-фланкирующий домен]-[участок рестрикции]_n-[3'-фланкирующий домен]

Формула I

[0009] , где а) *n* представляет собой целое число от 1 до 6;

[0010] б) участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционной эндонуклеазы; и

[0011] с) каждый из 5'-фланкирующего домена и 3'-фланкирующего домена включает последовательность нуклеиновой кислоты, как прогнозировано, имеющую минимальную вторичную структуру.

[0012] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен не включает последовательность, которая кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления, последовательность 5'-фланкирующего домена имеет значение ΔG сворачивания структуры с минимальной свободной энергией (MFE), более высокое, чем предопределенное пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для аутопротеолитического пептида встроена выше участка(ов) рестрикции. В некоторых вариантах осуществления, аутопротеолитический пептид включает одну или более последовательностей аутопротеолитического расщепления, происходящих из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2A тешовируса-1 свиней (P2A), 2A вируса ящура (FMDV) (F2A), 2A вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2A вируса *Thosoa asigna* (T2A), 2A вируса цитоплазматического полиедроза (BmCPV2A), 2A вируса фляшерии (BmIFV2A), или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для аутопротеолитического пептида встроена выше участка(ов) рестрикции. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает внутренний участок связывания рибосомы (IRES).

[0013] В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен не включает участок старта трансляции ни в какой рамке считывания. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает участок старта трансляции или его часть, в качестве последних нуклеотидов 5'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает кодон метионина, в качестве последних трех нуклеотидов 5'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен имеет длину от приблизительно 15 нуклеотидов до приблизительно 35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен имеет длину приблизительно 30

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1.

[0014] В некоторых вариантах осуществления, последовательность 3'-фланкирующего домена имеет значение ΔG сворачивания структуры с минимальной свободной энергией (MFE), более высокое, чем predetermined пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен не включает последовательность, которая кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает стоп-кодон трансляции в качестве первых трех нуклеотидов 3'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, стоп-кодон выбран из TAG, TAA или TGA. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен синтетической адаптерной молекулы не кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля с последовательностью, локализованной непосредственно выше нее (например, в 5'-UTR сгРНК) или с последовательностью, локализованной непосредственно ниже нее (например, внутри кодирующей последовательности GOI). В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен не кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля с последовательностью, локализованной непосредственно выше нее (например, внутри кодирующей последовательности GOI) или с последовательностью, локализованной непосредственно ниже (например, в 3'-UTR). В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен и/или 3'-фланкирующий домен не включает последовательность, имеющую комплементарность с последовательностью, локализованной внутри 3'-UTR. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен и/или 3'-фланкирующий домен не включает последовательность, имеющую комплементарность с 3'-концом 3'-UTR.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, синтетическая адаптерная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа I, рестрикционных ферментов типа II, рестрикционных ферментов типа III, рестрикционных ферментов типа IV и рестрикционных ферментов типа V. В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению

посредством рестрикционного фермента типа II. В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством SpeI или его изошизомера. В некоторых вариантах осуществления, изошизомер SpeI представляет собой AhII, BcuI или SpeI-HF.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению дополнительно включают дополнительный участок рестрикции, встроенный в последовательность, кодирующую поли(А)-хвост модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции встроен на конце последовательности, кодирующей поли(А)-хвост альфавирусного генома или репликона РНК. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента типа IIS или эндонуклеазы хоминга. В некоторых вариантах осуществления, рестрикционный фермент типа IIS представляет собой AcuI, AlwI, Alw26I, BaeI, BbiI, BbsI, BbsI-HF, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BmrI, BpmI, BpuEI, BsaI, BsaI-HF, BsaI-HFv2, BsaXI, BseGI, BseRI, BsgI, BsmAI, BsmBI-v2, BsmFI, BsmI, BspCNI, BspMI, BspQI, BsrDI, BsrI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsIMutI, CspCI, EarI, EciI, Eco31I, Esp3I, FauI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, LpuI, MboII, MlyI, MmeI, MnlI, NmeAIII, PaqCI, PleI, SapI или SfaNI. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством SapI или его изошизомера. В некоторых вариантах осуществления, изошизомер SapI представляет собой LguI, PciSI или BspQI. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством эндонуклеазы хоминга. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза хоминга представляет собой I-CeuI, I-SceI, PI-PspI, PI-SceI.

[0019] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают удлиненную последовательность, кодирующую поли(А)-хвост, который является более длинным, чем 11 остатков, как считали ранее, достаточных для эффективного синтеза минус-цепи. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост является более длинным, чем 34 остатка, для которых ранее не наблюдали дальнейшего усиления репликации, по сравнению с поли(А)-хвостом из 25 остатков. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину, лежащую в диапазоне от приблизительно 30 до приблизительно 120 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину приблизительно 120 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90 и приблизительно 100 остатков аденилата.

[0020] В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК происходит из вируса, принадлежащего к роду Alphavirus из семейства Togaviridae. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или

репликон РНК происходит из альфавируса, принадлежащего к группе VEEV/EEEV или группе SFV, или группе SINV. В некоторых вариантах осуществления, альфавирус представляет собой вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддельбург (MIDV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус О'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус реки Росс (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (UNAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WHAV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлендс-Джи (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), Ндуму (NDUV) или вирус Багги Крик. В некоторых вариантах осуществления, альфавирус представляет собой вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV) или вирус Синдбис (SINV).

[0021] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению дополнительно включают одну или более экспрессирующих кассет, где каждая из экспрессирующих кассет включает промотор, функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет включает субгеномный (сг) промотор, функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, сг промотор представляет собой субгеномный промотор 26S. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот 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.

[0022] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет включает кодирующую последовательность для представляющего интерес гена (GOI). В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI включает стоп-кодон, расположенный выше 3'-фланкирующего домена синтетической адаптерной молекулы. 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, передающего сигналы белка и цитокина. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI является оптимизированной для экспрессии на уровне, более высоком, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI не содержит участок(ки) для рестрикционного фермента,

используемого для линеаризации конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты встроена в вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор на основе самореплицирующейся РНК (срРНК). В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-27.

[0023] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты как описано в настоящем описании. В родственном аспекте, настоящее изобретение относится к культурам клеток, включающим по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, и культуральную среду. Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления рекомбинантных клеток по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления, клетка животного 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 африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки яичника китайского хомяка (клетки СНО), клетки А549 человека, клетки шейки матки человека, клетки СНМЕ5 человека, эпидермоидной клетки гортани человека, клетки фибробласта человека, клетки НЕК-293 человека, клетки HeLa человека, клетки НерG2 человека, клетки НУН-7 человека, клетки МРС-5 человека, мышечной клетки человека, клетки ЗТЗ мышцы, клетки соединительной ткани мышцы, мышечной клетки мышцы и клетки почки кролика.

[0024] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к трансгенным животным, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. 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 не относящееся к человеку млекопитающее.

[0025] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения рекомбинантной молекулы РНК, включающим (i) выращивание трансгенного животного, как описано в настоящем описании, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, как описано в настоящем описании, в таких условиях, что рекомбинантная молекула РНК продуцируется трансгенным животным или в рекомбинантной клетке. В некоторых вариантах осуществления, трансгенное животное или рекомбинантная клетка включают конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, и при этом последовательность, кодирующую рекомбинантную молекулу РНК, необязательно, расщепляют посредством рестрикционного фермента, способного расщеплять участок рестрикции, сконструированный после конца последовательности, кодирующей поли(А)-хвост, для получения матрицы, которая кодирует РНК, имеющую только остатки аденилата в поли(А)-хвосте и 3'-конце. Соответственно, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным молекулам РНК, полученным, в соответствии со способом, описанным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные молекулы РНК, описанные в настоящем описании, имеют усиленную биологическую активность.

[0026] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида, включающим (i) выращивание трансгенного животного, содержащего конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, в таких условиях, что полипептид, кодируемый GOI, продуцируется трансгенным животным или в рекомбинантной клетке. В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам продукции представляющего интерес полипептида, включающим введение субъекту конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании. Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. 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 субъекта-человека. Соответственно, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным полипептидам, полученным, в соответствии со способом, описанным в настоящем описании.

[0027] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим фармацевтически приемлемый наполнитель и одно или более из следующего: (a) конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании; (b) рекомбинантной молекулы РНК, как описано в настоящем описании; (c) рекомбинантной клетки, как описано в настоящем описании; и (d) рекомбинантного полипептида, как описано в настоящем описании.

[0028] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления фармацевтических композиций по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции включают конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции включают рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции включают рекомбинантную молекулу РНК, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции включают рекомбинантный полипептид, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, композицию формулируют в липосоме, наночастице на основе липидов (LNP) или полимерной наночастице. В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой иммуногенную композицию. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенную композицию формулируют в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенную композицию формулируют в качестве биотерапевтического средства, например, переносчика для генной доставки различных молекул с биоактивностью. В некоторых вариантах осуществления, композиция является по существу не иммуногенной для субъекта. В некоторых вариантах осуществления, неиммуногенную композицию формулируют в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления, неиммуногенную композицию формулируют в качестве биотерапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию формулируют в качестве адьюванта. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию формулируют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутривенного введения, внутримышечного введения, внутриузловое введение, внутриопухолевого введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального и перорального введения.

[0029] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту композиции, включающей одно или более из следующего: (a) конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании; (b) рекомбинантной молекулы РНК, как описано в настоящем описании; (c) рекомбинантной клетки, как описано в настоящем описании; (d) рекомбинантного полипептида, как описано в настоящем описании; и (e) фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании.

[0030] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам предотвращения и/или лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта, включающим профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, включающей одно или более из следующего: (a) конструкции нуклеиновой кислоты, как

описано в настоящем описании; (b) рекомбинантной молекулы РНК, как описано в настоящем описании; (c) рекомбинантной клетки, как описано в настоящем описании; (d) рекомбинантного полипептида, как описано в настоящем описании; и (e) фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании.

[0031] Воплощения вариантов осуществления способов предотвращения и/или облегчения, и/или лечения нарушения здоровья, в соответствии с настоящим изобретением, могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, нарушение здоровья представляет собой пролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, аутоиммунное нарушение или микробную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или, как подозревают, имеет состояние, ассоциированное с пролиферативным нарушением, воспалительным нарушением, аутоиммунным нарушением или микробной инфекцией. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или, как подозревают, имеет состояние, ассоциированное с редким заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии, в комбинации с по меньшей мере одним из видов дополнительной терапии. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один из видов дополнительной терапии выбран из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсином, направленной терапии и хирургии.

[0032] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к наборам для модуляции иммунного ответа, для предотвращения и/или для лечения нарушения здоровья или микробной инфекции, включающим одно или более из следующего: (a) конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании; (b) рекомбинантной молекулы РНК, как описано в настоящем описании; (c) рекомбинантной клетки, как описано в настоящем описании; (d) рекомбинантного полипептида, как описано в настоящем описании; и (e) фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании.

[0033] Каждый из аспектов и вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, можно использовать совместно, если это явно или ясно не исключено из контекста варианта осуществления или аспекта.

[0034] Вышеприведенное краткое изложение сущности изобретения является только иллюстративным и не предназначено, чтобы являться ограничивающим каким-либо образом. В дополнение к иллюстративным вариантам осуществления и признакам, описанным в настоящем описании, дополнительные аспекты, варианты осуществления, объекты и признаки настоящего изобретения станут полностью очевидными из чертежей и подробного описания, и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0035] **ФИГ. 1А-1В** являются схематическими представлениями неограничивающих примеров дизайна альфавирусных векторов, в соответствии с

некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых кодирующая последовательность вирусных структурных белков из исходного альфавируса была делетирована, и синтетическая адаптерная молекула была вставлена выше 3'-UTR. На **ФИГ. 1А** проиллюстрирован неограничивающий пример иллюстративного дизайна модифицированного альфавирусного вектора, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. В этом примере, синтетическая адаптерная молекула содержит, в направлении 5'—> 3', 5'-фланкирующий домен, участок узнавания для рестрикции SpeI и 3'-фланкирующий домен. Этот дизайн модифицированного альфавирусного вектора (пустого вектора) также содержит субгеномный промотор 26S (26S), и последовательности 5'-UTR и 3'-UTR, и поли(А)-хвост. Показаны также неструктурные белки NSP1, NSP2, NSP3 и NSP4. На **ФИГ. 1В** показана структура другого дизайна альфавируса, происходящего из вектора, описанного на **ФИГ. 1А**. В этом дизайне, гетерологичный представляющий интерес ген (GOI) клонирован в участок рестрикции SpeI, таким образом, что его экспрессия помещена под контроль субгеномного промотора 26S.

[0036] ФИГ. 2А-2І являются графическими иллюстрациями четырех неограничивающих иллюстративных видов дизайна альфавирусных репликонов РНК (пустых векторов), в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых последовательности, кодирующие модифицированный геном вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEE), модифицированный вирус Чикунгунья (CHIKV) штамма 27, модифицированный CHIKV штамма DRDE, модифицированный вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), модифицированный SINV штамма Girdwood, или модифицированный химерный геном SINV штамма AR86/Girdwood, соответственно, встроены в экспрессирующие векторы, которые также включают синтетическую адаптерную молекулу, вставленную выше соответствующей последовательности 3'-UTR.

[0037] ФИГ. 3А-3F являются графическими иллюстрациями пяти неограничивающих иллюстративных видов дизайна альфавирусных репликонов РНК, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. На **ФИГ. 3А**, модифицированный геном вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, встроены в экспрессирующий вектор, который также содержит кодирующую последовательность для иллюстративного представляющего интерес гена (GOI), например, предшественника гемагглютинина (НА) вируса гриппа А H5N1, вставленную в синтетическую адаптерную молекулу. На **ФИГ. 3В-3F**, кодирующая последовательность для H5N1 НА вставлена в экспрессирующие векторы, содержащие виды дизайна модифицированной химеры SINV AR86-Girdwood, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[0038] ФИГ. 4 является схематическим представлением неограничивающего примера видов дизайна ДНК-матрицы альфавирусного вектора, в соответствии с

некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, в которых участок узнавания рестрикционной эндонуклеазы типа *IIS* был добавлен ниже поли(А). На **ФИГ. 4А** проиллюстрирована секвенированная ДНК-матрица текущего уровня техники, используемая для транскрипции *in vitro* РНК альфавирусного вектора, в которой транскрипция РНК подвергается инициации в участке 5'-промотора Т7 (пром. Т7) и терминации посредством транскрипции в терминаторе Т7 (терм. Т7). На **ФИГ. 4В** проиллюстрирован неограничивающий пример иллюстративного дизайна модифицированного альфавирусного вектора, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения. В этом примере, участок узнавания рестрикционной эндонуклеазы *SapI* вставлен непосредственно ниже последовательности поли(А). Поскольку *SapI* представляет собой рестрикционную эндонуклеазу типа *IIS*, которая расщепляет ДНК вне своего участка узнавания (последовательность, показанная в рамке), в продукте расщепления остаются только остатки дезокситимидина на 5'-конце в последовательности ДНК-матрицы, кодирующие остатки аденозила в продукте РНК. В этом примере, когда ДНК линеаризуют посредством расщепления с использованием *SapI* и используют в качестве матрицы для транскрипции *in vitro*, транскрипция РНК подвергается инициации в участке 5'-промотора Т7 (пром. Т7) и терминации посредством прерывания транскрипции на конце поли(А), оставляя только остатки аденилата на 3'-конце РНК, в отличие от терминации посредством терминатора Т7, приводящей к транскрипции не относящихся к аденилату остатков на 3'-конце продукта РНК.

[0039] ФИГ. 5 представляет собой столбчатую диаграмму, представляющую различие между репликонами РНК с 3'-концом, который (i) состоит из 30 остатков аденилата (А) или (ii) состоит из 30 остатков аденилата, за которыми следует транскрибируемая последовательность терминатора (Т7). Различные количества репликонов РНК вводили посредством электропорации в клетки ВНК-21 в трех повторах, и через 17,5 часов, полученную частоту клеток, содержащих дцРНК в результате репликации репликона или экспрессию кодируемого представляющий интерес трансгена (НА), количественно оценивали посредством флуоресцентной проточной цитометрии. В этой временной точке, при субнасыщающих количествах (<250 нг) трансфицированного репликона РНК, существует доказательство усиленной биологической активности в форме значимо более высокой репликации и экспрессии трансгена для репликона РНК с 3'-концом, оканчивающимся остатками аденилата, против окончания последовательностью терминатора Т7.

[0040] ФИГ. 6 представляет собой столбчатую диаграмму, представляющую различие между репликонами РНК с 3'-концом, который состоит из 30 остатков аденилата, за которыми следует транскрибируемая последовательность терминатора (30; Т7), или состоит из 30 остатков аденилата (30; чистый) или приблизительно 120 остатков аденилата (~120; чистый). Либо 25, либо 100 нг репликона РНК вводили посредством электропорации в клетки ВНК-21 в двух повторах, и через 20 часов, полученную частоту клеток, содержащих дцРНК в результате репликации репликона или экспрессию

кодированного представляющего интерес трансгена (НА), количественно оценивали посредством флуоресцентной проточной цитометрии. В этом примере, для репликона РНК с удлинённым поли(А)-хвостом показана усиленная биологическую активность в форме более высокой репликации и экспрессии трансгена.

[0041] На **ФИГ. 7** схематически сравнивают последовательность узнавания и участок расщепления рестрикционных ферментов типа II против типа IIS.

[0042] На **ФИГ. 8** графически обобщены результаты аналитических экспериментов электрофореза, проведенных для оценки целостности молекул срРНК, полученных посредством транскрипции *in vitro* (IVT) с использованием плазмидной ДНК-матрицы, линейаризованной посредством ферментного расщепления. В этом примере, ДНК линейаризовали с использованием SapI, которая разрезает на конце последовательности поли(А) (например, разрезает непосредственно ниже последовательности поли(А)).

[0043] На **ФИГ. 9** схематически обобщены результаты экспериментов, проведенных для иллюстрации специфических различий в активности репликации РНК для срРНК, в корреляции с длиной их поли(А)-хвостов. Конструкции срРНК в диапазоне доз вводили посредством электропорации (EP) в клетки, и частоту репликации РНК количественно оценивали посредством детекции двухцепочечной РНК (дцРНК) с использованием проточной цитометрии.

[0044] На **ФИГ. 10** схематически обобщены количественные различия в активности репликации РНК для срРНК, в корреляции с длиной их поли(А)-хвостов. Величины, обратные EC50 (дозе РНК для половины максимальной активности) рассчитывали по установке соответствия данных, показанных на **ФИГ. 9**, кривой 4PL, и статистический тест однофакторного ANOVA проводили для определения значимости различий между значениями Log(EC50).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0045] Настоящее изобретение относится, среди прочего, к системам вирусной экспрессии с превосходным потенциалом экспрессии, которые являются пригодными для экспрессии гетерологичных молекул, например, таких как вакцины и терапевтические полипептиды, в рекомбинантных клетках. Например, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям нуклеиновых кислот, например, таким как экспрессирующие конструкции и векторы, содержащие модифицированный геном или репликон РНК альфавируса, в которых значительная часть их исходной вирусной последовательности, кодирующей структурные белки, была делегирована. Настоящее изобретение, в некоторых вариантах осуществления, также относится к экспрессирующим векторам на основе вирусов, включающим одну или более экспрессирующих кассет, кодирующих гетерологичный полипептид. Кроме того, настоящее изобретение, в некоторых вариантах осуществления, относится к конструкциям нуклеиновых кислот например, таким как экспрессирующие конструкции и векторы, содержащие модифицированный геном или репликон РНК вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV) или вирусов Синдбис (SINV), в которых по меньшей мере некоторая часть их

исходной вирусной последовательности, кодирующая структурные белки, была делетирована. Кроме того, настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам подвергнутым генной инженерии для включения одной или нескольких молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании. Биологические материалы и рекомбинантные продукты, происходящие из таких рекомбинантных клеток, также включены в объем настоящего изобретения. Настоящее изобретение также относится к композициям и способам, которые можно использовать для модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, так же как к способам предотвращения и/или лечения различных нарушений здоровья.

[0046] Самоамплифицирующиеся РНК (репликоны) на основе РНК-вирусов (например, альфавирусов) можно использовать в качестве надежных систем экспрессии. Например, опубликовано, что неограничивающим преимуществом использования альфавирусов, таких как EEEV и SINV, в качестве вирусных экспрессирующих векторов является то, что они могут управлять синтезом больших количеств гетерологичных белков в рекомбинантных клетках-хозяевах. В частности, системы на платформе альфавирусного репликона, описанные в настоящем описании, являются способными к экспрессии высоких уровней представляющих интерес гетерологичных полипептидов. Среди других преимуществ, полипептиды, такие как терапевтические одноцепочечные антитела, могут являться наиболее эффективными, если экспрессированы на высоких уровнях *in vivo*. Кроме того, для получения рекомбинантных антитела, очищенных из клеток в культуре (*ex vivo*), высокая экспрессия белка с репликона РНК может увеличивать общие выходы продукта антитела. Кроме того, если подвергаемый экспрессии белок является вакцинным антигеном, высокий уровень экспрессии может индуцировать наиболее сильный иммунный ответ *in vivo*.

[0047] Альфавирусы используют мотивы, содержащиеся в их UTR, структурных областях и неструктурных областях, для воздействия на их репликацию в клетках-хозяевах. Эти области также содержат механизмы, чтобы уклоняться от врожденного иммунитета клетки-хозяина. Часто могут присутствовать значительные различия между альфавирусами. То, какая часть генома содержит эти функциональные компоненты, также изменчиво между альфавирусами. Помимо изменчивости между индивидуальными альфавирусами, часто присутствуют различия внутри штаммов альфавирусов, которые могут обуславливать изменения характеристик, таких как вирулентность. Например, изменчивость последовательности между североамериканскими и южноамериканскими штаммами EEEV изменяет способность к модуляции пути STAT1, что приводит к дифференциальной индукции интерферонов типа I и полученным в результате изменениям в вирулентности. Как описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным альфавирусным геномам или репликонам РНК, основанным на EEEV. В качестве дополнительного примера, SINV штамма S.A.AR86 (AR86) быстро и сильно ингибирует фосфорилирование тирозина STAT1 и STAT2 в ответ на IFN- γ и/или IFN- β , но родственный SINV штамм Girdwood

является неэффективным ингибитором активации STAT1/2. Уникальный треонин в положении 538 в неструктурном белке AR86 приводит к более медленному процессингу неструктурного белка и задержке синтеза субгеномной РНК из родственного SINV штамма Girdwood, что вносит вклад в фенотип нейровирулентности для взрослых мышей и может обеспечивать преимущества для кинетики и выхода экспрессии гетерологичного белка, и вносит вклад в более сильный иммунный ответ на вакцинный антиген, экспрессированный с основанных на AR86 векторах на основе репликона. Истинный репликон AR86, который содержит T538, не был описан. Как более подробно описано ниже, функциональный репликон AR86 с использованием опубликованной геномной последовательности (Genbank U38305) невозможно было получить, что, предположительно, является причиной того, почему существующие репликоны на основе AR86 несут ослабляющую мутацию T538I. Однако, было обнаружено, что возможно получать функциональные репликоны AR86, все еще несущие T538, посредством создания специфических химер с генами nsP из Girdwood. Как дополнительно описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным альфавирусным геномам или репликонам РНК на основе SINV штамма AR86.

[0048] Как более подробно описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным альфавирусным геномам или репликонам РНК, которые были сконструированы для встраивания участка рестрикции на конце последовательности, кодирующей поли(А)-хвост, для обеспечения усиленной биологической активности, такой как увеличенный уровень репликации, экспрессии и/или трансляции.

[0049] Также более подробно описано ниже, что некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным альфавирусным геномам или репликонам РНК, сконструированным для наличия удлиненных поли(А)-хвостов, для обеспечения усиленной биологической активности, такой как увеличенный уровень репликации, экспрессии и/или трансляции.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0050] Если не указано иное, все термины в данной области, условные сокращения и другие научные термины или терминология, используемые в настоящем описании, предназначены, чтобы иметь значения, являющиеся общепринятыми для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В некоторых случаях, термины с общепринятыми значениями определены в настоящем описании для ясности и/или для быстрой ссылки, и включение таких определений в настоящее описание не следует обязательно рассматривать как представляющее значительное различие с общепринятыми в данной области. Многие из способов и процедур, которые описаны или на которые ссылаются в настоящем описании, являются хорошо известными и общеупотребительными, с использованием общепринятых способов, для специалиста в данной области.

[0051] Формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. Например, термин «клетка» включает одну или более клеток, содержащие их смеси. «А и/или В» используют в настоящем описании для включения всех из следующих альтернатив: «А», «В», «А или В», и «А и В».

[0052] Термины «введение» и «осуществление введения», в рамках изобретения, относятся к доставке биоактивных композиции или состава посредством способа введения, включающего, но без ограничения, интраназальное, чрескожное, внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, внутривенное, внутримышечное, пероральное, интравагинальное и местное введение или их комбинации. Термин включает, но без ограничения, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

[0053] Термины «клетка», «культура клеток» и «линия клеток» относится не только к конкретной рассматриваемой клетке, культуре клеток или линии клеток, но также к потомству или потенциальному потомству такой клетки, культуры клеток или линии клеток, независимо от количества переносов или пассажей в культуре. Следует понимать, что не все потомство является точно идентичным родительской клетке. Это происходит из-за того, что конкретные модификации могут возникать в последующих поколениях, либо из-за мутации (например, преднамеренных или самопроизвольных мутаций), либо из-за влияний внешней среды (например, метилирования или других эпигенетических модификаций), так что потомство может, фактически, не являться идентичным родительской клетке, но все еще включено в объем термина, в рамках изобретения, при условии, что потомство сохраняет такую же функциональность, что и исходная клетка, культура клеток или линия клеток.

[0054] Термин «конструкция» относится к рекомбинантной молекуле, включающей одну или более выделенных последовательностей нуклеиновых кислот из гетерологичных источников. Например, конструкции нуклеиновых кислот могут представлять собой химерные молекулы нуклеиновых кислот, в которых две или более последовательности нуклеиновых кислот различного происхождения собраны в одиночную молекулу нуклеиновой кислоты. Таким образом, репрезентативные конструкции нуклеиновых кислот включают любые конструкции, которые содержат (1) последовательности нуклеиновых кислот, включая регуляторные и кодирующие последовательности, которые не обнаружены присоединенными друг к другу в природе (например, по меньшей мере одна из нуклеотидных последовательностей является гетерологичной, по отношению к по меньшей мере одной из ее других нуклеотидных последовательностей), или (2) последовательности, кодирующие части функциональных молекул РНК или белков, не соединенные в природе, или (3) части промоторов, не соединенные в природе. Репрезентативные конструкции нуклеиновых кислот могут включать любые молекулы рекомбинантных нуклеиновых кислот, линейные или кольцевые, одноцепочечные или двухцепочечные молекулы нуклеиновых кислот ДНК или РНК, происходящие из любого источника, такого как плазида, космида, вирус, автономно реплицирующаяся молекула

полинуклеотида, фаг, способный к геномной интеграции или автономной репликации, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, где одна или несколько последовательностей нуклеиновых кислот были функционально связаны. Конструкции по настоящему изобретению могут включать необходимые элементы для управления экспрессией представляющей интерес последовательность нуклеиновой кислоты, которая также содержится в конструкции. Такие элементы могут включать контрольные элементы, такие как промотор, который является функционально связанным с (так чтобы управлять транскрипцией) представляющей интерес последовательностью нуклеиновой кислоты, и необязательно, включает последовательность поли(А)денилирования.

[0055] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты может быть встроена в вектор. Термин «вектор» используют в настоящем описании для обозначения молекулы или последовательности нуклеиновой кислоты, способной к переносу или транспортировке другой молекулы нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин «вектор» охватывает как векторы на основе ДНК, так и векторы на основе РНК. Термин «вектор» включает клонирующие векторы и экспрессирующие векторы, так же как вирусные векторы и интегрирующие векторы. «Экспрессирующий вектор» представляет собой вектор, включающий регуляторную область, таким образом, способный к экспрессии последовательностей и фрагментов ДНК *in vitro*, *ex vivo* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, вектор может включать последовательности, управляющие автономной репликацией в клетке, например, такой как плаزمид (вектор на основе ДНК) или самореплицирующийся РНК-вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор может включать последовательности, достаточные, чтобы обеспечивать интеграцию в ДНК клетки-хозяина. Векторы, которые можно использовать, включают, например, плазмиды (например, ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечный вектор (например, оцДНК или оцРНК). В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой двухцепочечный вектор (например, дцДНК или дцРНК). В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор для доставки генов. В некоторых вариантах осуществления, вектор используют в качестве переносчика для доставки генов, для переноса гена в клетку.

[0056] В дополнение к компонентам конструкции, вектор может включать, например, один или более селективных маркеров, одну или более точек начала репликации, таких как прокариотические и эукариотические точки начала репликации, по меньшей мере один участок для множественного клонирования и/или элементы для облегчения стабильной интеграции конструкции в геном клетки. Две или более конструкций моно встраивать в одну молекулу нуклеиновой кислоты, такую как одиночный вектор, или моно встраивать в две или более отдельных молекулы нуклеиновых кислот, такие как два или более отдельных векторов. «Экспрессирующая

конструкция», в общем, включает по меньшей мере контрольную последовательность, функционально связанную с представляющей интерес нуклеотидной последовательностью. Таким способом, например, промоторы в функциональной связи с нуклеотидными последовательностями, подлежащими экспрессии, предоставляют в экспрессирующих конструкциях для экспрессии в клетке. Для практического осуществления настоящего изобретения, композиции и способы для получения и использования конструкций и клеток известны специалисту в данной области.

[0057] Термин «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» композиции по настоящему изобретению, например, конструкций нуклеиновых кислот (например, поли(А)векторов или молекул сРНК), рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, в общем, относится к количеству, достаточному для осуществления композицией указанной цели, относительно отсутствия композиции (например, достижения эффекта, ради которого ее вводят, стимуляции иммунного ответа, предотвращения или лечения заболевания, или уменьшения одного или более симптомов заболевания, нарушения, инфекции или нарушения здоровья). Примером «эффективного количества» является количество, достаточное для внесения вклада в лечение, предотвращение, или уменьшение симптома или симптомов заболевания, которое также может быть обозначено как «терапевтически эффективное количество». «Уменьшение» симптома означает уменьшение тяжести или частоты симптома(ов), или прекращение симптома(ов). Точное количество композиции, включающее «терапевтически эффективное количество», зависит от цели лечения, и его может определить специалист в данной области с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 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).

[0058] Термин «рекомбинантный», при использовании, применительно к клетке, нуклеиновой кислоте, белку или вектору, показывает, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были изменены или получены посредством вмешательства человека, такого как, например, были модифицированы посредством или являются результатом лабораторных способов. Таким образом, например, рекомбинантные белки и нуклеиновые кислоты включают белки и нуклеиновые кислоты, полученные посредством лабораторных способов. Рекомбинантные белки могут включать аминокислотные остатки, не обнаруженные в нативной (нерекомбинантной или относящейся к дикому типу) форме белка или могут включать аминокислотные остатки, которые были модифицированы, например, мечены. Термин может включать любые модификации последовательности пептида, белка или нуклеиновой кислоты. Такие модификации могут включать следующее: любые химические модификации последовательности пептида, белка или нуклеиновой кислоты, включая одно или более из аминокислот, дезоксирибонуклеотидов

или рибонуклеотидов; добавление, делецию и/или замену одной или нескольких аминокислот в пептиде или белке; создание слитого белка, например, слитого белка, содержащего фрагмент антитела; и добавление, делецию и/или замена одной или нескольких нуклеиновых кислот в последовательности нуклеиновой кислоты. Термин «рекомбинантный», при использовании, применительно к клетке, не предназначен для включения встречающихся в природе клеток, но охватывает клетки, которые были сконструированы/модифицированы для включения или экспрессии полипептида или нуклеиновой кислоты, которые не присутствовали бы в клетке, если бы она не была сконструирована/модифицирована.

[0059] В рамках изобретения, термин «репликон РНК» относится к РНК, которая содержит всю генетическую информацию, необходимую для управления своей собственной амплификацией или саморепликацией внутри перmissive клетки. Таким образом, репликон РНК иногда также обозначают как «самоамплифицирующуюся РНК» (саРНК) или «самореплицирующуюся РНК» (срРНК). Для управления своей собственной репликацией, молекула РНК 1) кодирует полимеразу, репликазу или другие белки, которые могут взаимодействовать с вирусными или происходящими из клетки-хозяина белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами для катализа процесса амплификации РНК; и 2) содержит *цис*-действующие последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции кодированной субгеномной репликоном РНК. Эти последовательности могут подвергаться связыванию, в ходе процесса репликации, с кодированными ею самой белками, или не кодированными ею самой происходящими из клетки белками, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, или комплексами между любыми из этих компонентов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, молекула альфавирусного репликона РНК (например, молекула срРНК или саРНК), в общем, содержит элементы в следующем порядке: 5'-последовательность(и) вирусной или дефектной-интерферирующей РНК, необходимые в *цис*-положении для репликации, последовательности, кодирующие биологически активные альфавирусные неструктурные белки (например, nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4), промотор для субгеномной РНК (сгРНК), 3'-вирусные последовательности, необходимые в *цис*-положении для репликации, и поли(А)денилатный хвост (поли(А)). В некоторых случаях, субгеномный (сг) промотор, управляющий экспрессией гетерологичной последовательности, можно включать в конструкцию срРНК по настоящему изобретению. Кроме того, термин репликон РНК (например, срРНК или саРНК), как правило, относится к молекуле положительной полярности, или «матричной» смысловой, и репликон РНК может иметь длину, отличную от длины любого известного, встречающегося в природе альфавируса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, репликон РНК не содержит последовательности по меньшей мере одного из структурных вирусных белков; последовательности, кодирующие структурные гены, могут быть заменены на гетерологичные последовательности. В этих случаях, когда репликон РНК подлежит

упаковке в рекомбинантную альфавирусную частицу, он может содержать одну или более последовательностей, так называемых сигналов упаковки, которые служат для инициации взаимодействий с альфавирусными структурными белками, приводящих к формированию частицы.

[0060] В рамках изобретения, «субъект» или «индивидуум» включает животных, таких как человек (например, субъект-человек), и не относящихся к человеку животных. В некоторых вариантах осуществления, «субъект» или «индивидуум» представляет собой пациента под наблюдением терапевта. Таким образом, субъект может представлять собой пациента- или субъекта-человека, который имеет, подвержен риску иметь или, как подозревают, имеет представляющее интерес заболевание (например, злокачественную опухоль) и/или один или более симптомов заболевания. Субъект может также представлять собой субъекта, у которого диагностирован риск развития представляющего интерес состояния на время диагностики или позже. Термин «не относящиеся к человеку животные» включает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей, нечеловекообразных приматов и других млекопитающих, например, таких как овцы, собаки, коровы, кур, и не млекопитающих, таких как амфибии, рептилии и т.д.

[0061] Когда представлен диапазон значений, понятно, что что каждое промежуточное значение, до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного, между верхним и нижним пределами этого диапазона, и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, включено в настоящее изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть, независимо, включены в меньшие диапазоны, и также включены в настоящее изобретение, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[0062] Конкретные диапазоны представлены в настоящем описании с использованием числовых значений, которым предшествует термин «приблизительно», который, в рамках изобретения, имеет свое обычное значение приближенно. Термин «приблизительно» используют для обеспечения буквального обоснования точного количества, которому он предшествует, так же как количества, которое составляет около или приблизительно количества, которому термин предшествует. При определении того, составляет ли количество около или приблизительно конкретно перечисленного количества, непечисленное количество около или приблизительно может представлять собой количество, которое, в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно перечисленного количества. Если степень приближения не ясна иным образом из контекста, «приблизительно» означает либо в пределах плюс или минус 10% от представленного значения, либо округленное до ближайшей значащей цифры, во всех случаях включая представленное значение. В

некоторых вариантах осуществления, термин «приблизительно» указывает на обозначенное значение \pm вплоть до 10%, вплоть до \pm 5%, или вплоть до \pm 1%.

[0063] Термин «функционально связанные», в рамках изобретения, обозначает физическую или функциональную связь между двумя или более элементами, например, полипептидными последовательностями или полинуклеотидными последовательностями, которая позволяет им функционировать предназначенным для них образом. Например, термин «функционально связанные», при использовании в контексте молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, или кодирующих последовательностей и промоторных последовательностей в молекуле нуклеиновой кислоты, означает, что кодирующие последовательности и промоторные последовательности находятся в рамке считывания и в надлежащей пространственной ориентации, и на надлежащем удалении, чтобы позволять эффекты соответствующего связывания факторами транскрипции или РНК-полимеразой на транскрипцию. Следует понимать, что функционально связанные элементы могут являться непрерывными или прерывистыми (например, связанными друг с другом через линкер). В контексте полипептидных конструкций, «функционально связанные» относится к физической связи (например, напрямую или опосредованно связанным) между аминокислотными последовательностями (например, различными фрагментами, частями, областями или доменами) для обеспечения описанной активности конструкций. Функционально связанные фрагменты, части, области и домены полипептидов или молекул нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании, могут являться непрерывными или прерывистыми (например, связанными друг с другом через линкер).

[0064] Термин «порция», в рамках изобретения, относится к части. Применительно к конкретной структуре, такой как полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность, или белок, термин ее «порция» может обозначать непрерывную или прерывистую часть указанной структуры. Например, порция 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. Дополнительно или альтернативно, если порция представляет собой прерывистую часть, указанная прерывистая часть состоит из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более частей структуры (например, доменов белка), где каждая часть представляет собой непрерывный элемент структуры. Например, прерывистая часть аминокислотной последовательности может состоять из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более, например, не более, чем 4 частей указанной аминокислотной последовательности, где каждая часть 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.

[0065] Когда представлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного, между верхним и нижним пределами этого диапазона, и любым другим указанным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне, включено в настоящее изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть, независимо, включены в меньшие диапазоны, и также включены в настоящее изобретение, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[0066] Конкретные диапазоны представлены в настоящем описании с использованием числовых значений, которым предшествует термин «приблизительно». Термин «приблизительно» используют в настоящем описании для обеспечения буквального обоснования точного количества, которому он предшествует, так же как количества, которое составляет около или приблизительно количества, которому термин предшествует. При определении того, составляет ли количество около или приблизительно конкретно перечисленного количества, непечисленное количество около или приблизительно может представлять собой количество, которое, в контексте, в котором оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент конкретно перечисленного количества.

[0067] Термин «процент идентичности», в рамках изобретения, в контексте двух или более нуклеиновых кислот или белков, относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или аминокислот, которые являются одинаковыми (например, приблизительно 60% идентичность последовательности, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более высокая идентичность на протяжении указанной области), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0, с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или посредством выравнивания вручную и визуальной проверки. См., например, веб-сайт NCBI на ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Это определение также относится к, или может является применимым к последовательности, комплементарной запрашиваемой последовательности. Это определение включает сравнение последовательностей, проведенное посредством алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями на протяжении полной длины соответствующих эталонных последовательностей. Это определение также включает последовательности, которые имеют делеции и/или добавления, так же как те, которые имеют замены. Идентичность последовательности можно рассчитывать на протяжении области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 20 аминокислот или нуклеотидов, или на протяжении области, имеющей

длину 10-100 аминокислот или нуклеотидов, или на протяжении полной длины данной последовательности. Идентичность последовательности можно рассчитывать с использованием опубликованных способов и широкодоступных компьютерных программ, таких как пакет программного обеспечения GCS (Devereux et al., *Nucleic Acids Res* (1984) 12:387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., *J Mol Biol* (1990) 215:403). Идентичность последовательности можно измерять с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей, такого как пакет программного обеспечения для анализа последовательностей от Genetics Computer Group at the University of Wisconsin Biotechnology Center (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), с его параметрами по умолчанию. Дополнительные способы, которые можно подходящим образом использовать для определения сходства или идентичности аминокислотных последовательностей, включают способы, основанные на специфической для положений оценочной матрице структур (P3SM), которая включает баллы прогнозирования структур от Rosetta, так же как способы, основанные на нормализованном по длине расстоянии редактирования, как описано ранее, например, в Setcliff et al., *Cell Host & Microbe* 23(6), May 2018.

[0068] Термин «фармацевтически приемлемый наполнитель», в рамках изобретения, относится к любому подходящему веществу, обеспечивающему фармацевтически приемлемый носитель, добавку или разбавитель для введения представляющих интерес соединения(й) субъекту. Таким образом, «фармацевтически приемлемый наполнитель» может охватывать вещества, обозначаемые как фармацевтически приемлемые разбавители, фармацевтически приемлемые добавки и фармацевтически приемлемые носители. В рамках изобретения, термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает, но без ограничения, солевой раствор, растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Вспомогательные активные соединения (например, антибиотики и дополнительные лекарственные средства) также можно включать в композиции.

[0069] В рамках изобретения, «субъект» или «индивидуум» включает животных, таких как человек (например, индивидуумы-люди) и не относящихся к человеку животных. В некоторых вариантах осуществления, «субъект» или «индивидуум» представляет собой пациента под наблюдением терапевта. Таким образом, субъект может представлять собой пациента- или индивидуума-человека, который имеет, подвержен риску иметь или, как подозревают, имеет представляющее интерес нарушение здоровья (например, злокачественную опухоль или инфекцию) и/или один или более симптомов нарушения здоровья. Субъект может также представлять собой индивидуума, у которого диагностирован риск развития представляющего интерес нарушения здоровья на время диагностики или позже. Термин «не относящиеся к человеку животные» включает всех позвоночных, например, млекопитающих, например, грызунов, например, мышей,

нечеловекообразных приматов и других млекопитающих, например, таких как овцы, собаки, коровы, кур, и не млекопитающих, таких как амфибии, рептилии и т.д.

[0070] Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем описании, включают «содержащие», «состоящие из» и «в основном состоящие из» аспекты и варианты осуществления. В рамках изобретения, «содержащий» является синонимичным с «включающий», «вмещающий» или «отличающийся», и является включительным или неограничивающим, и не исключает дополнительные, не перечисленные элементы или стадии способов. В рамках изобретения, «состоящие из» исключает любые элементы, стадии или ингредиенты, не указанные в заявленных композиции или способе. В рамках изобретения, «в основном состоящие из» не исключает материалов или стадий, не оказывающих существенного влияния на основные и новые характеристики заявленных композиции или способа. Любое упоминание в настоящем описании термина «содержащие», в частности, в описании компонентов композиции или в описании стадий способа, понимают как охватывающее композиции и способы, в основном состоящие из и состоящие из перечисленных компонентов или стадий.

[0071] Когда представлен диапазон значений, специалисту в данной области понятно, что все диапазоны, описанные в настоящем описании, включают все без исключения возможные поддиапазоны и комбинации поддиапазонов. Любой перечисленный диапазон можно легко понимать как в достаточной степени описывающий и позволяющий такой же диапазон, разбитый на по меньшей мере равные половины, трети, четверти, пятые, десятые и т.д. В качестве неограничивающего примера, каждый диапазон, обсуждаемый в настоящем описании, можно легко разбить на нижнюю треть, среднюю треть и верхнюю треть, и т.д. Как также понятно специалисту в данной области, все формулировки, такие как «вплоть до», «по меньшей мере», «более чем», «менее чем» и т.п., включают перечисленное количество и относятся к диапазонам, которые можно впоследствии разбить на поддиапазоны, как обсуждали выше. Наконец, как понятно специалисту в данной области, диапазон включает каждый индивидуальный член. Таким образом, например, группа, имеющая 1-3 членов, относится к группе, имеющей 1, 2 или 3 члена. Подобным образом, группа, имеющая 1-5 членов, относится к группе, имеющей 1, 2, 3, 4 или 5 членов, и т.д.

[0072] Заголовки, например, (a), (b), (i) и т.д., представлены только для простоты чтения описания и формулы изобретения. Использование заголовков в описании или формуле изобретения не требует осуществления стадий или элементов в алфавитном или числовом порядке, или в порядке, в котором они представлены.

[0073] Понятно, что конкретные признаки настоящего изобретения, которые, для ясности, описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, могут быть также представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте одного варианта осуществления, могут быть также представлены по отдельности или в любой

подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, конкретно включены в настоящее изобретение и описаны в настоящем описании, точно также, как если бы все без исключения комбинации были индивидуально и явно описаны. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также конкретно включены в настоящее изобретение и описаны в настоящем описании, точно также, как если бы все без исключения подкомбинации были индивидуально и явно описаны в настоящем описании.

Альфовирусы

[0074] Alphavirus представляет собой род генетически, структурно и серологически родственных вирусов группы IV семейства *Togaviridae*, который включает по меньшей мере 30 членов, каждый из которых имеет одноцепочечный РНК-геном положительной полярности, заключенный в нуклеокапсид, окруженный оболочкой, содержащей вирусные белки шипика. В настоящее время, род альфовирусов содержит, среди прочих, вирус Синдбис (SIN), вирус леса Семлики (SFV), вирус реки Росс (RRV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) и вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), которые все являются близко родственными и являются способными инфицировать различных позвоночных, таких как млекопитающие, грызуны, рыбы, виды птиц и более крупные млекопитающие, такие как человек и лошади, так же как беспозвоночных, таких как насекомые. Перенос между видами и индивидуумами происходит в основном через комаров, что делает альфовирусы вносящими вклад в коллекцию арбовирусов - или переносимых членистоногими вирусов. В частности, вирусы Синдбис и леса Семлики были широко исследованы, и жизненный цикл, способ репликации и т.д. этих вирусов хорошо охарактеризованы. В частности, показано, что альфовирусы реплицируются очень эффективно в клетках животных, что делает их ценными в качестве векторов для продукции белков и нуклеиновых кислот в таких клетках.

[0075] Каждый из этих альфовирусов имеет одноцепочечный РНК-геном положительной полярности, заключенный в нуклеокапсид, окруженный оболочкой, содержащей вирусные белки шипика. Частицы Alphavirus являются оболочечными, проявляют тенденцию являться сферическими (хотя немного плеоморфными), и имеют изометрический нуклеокапсид. Геном Alphavirus представляет собой одноцепочечную РНК положительной полярности длиной приблизительно 11-12 т.п.о., содержащую 5'-кэп, 3'-поли-А-хвост, и две открытые рамки считывания, где первая рамка кодирует неструктурные белки с ферментной функцией, и вторая рамка кодирует вирусные структурные белки (например, капсидный белок СР, гликопротеин Е1, гликопротеин Е2, белок Е3 и белок 6К).

[0076] Две трети с 5'-конца генома альфовируса кодируют ряд неструктурных белков (nsP), необходимых для транскрипции и репликации вирусной РНК. Эти белки транслируются напрямую с РНК и совместно с клеточными белками формируют РНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для репликации вирусного генома и транскрипции сгРНК. Четыре nsP (nsP1-4) продуцируются в форме одного полибелка,

составляющего аппарат репликации вируса. Процессинг полибелка происходит строго регулируемым образом, где расщепление на стыке P2/3 влияет на использование РНК-матрицы в ходе репликации генома. Этот участок локализован в основании узкой щели и не является легко доступным. После расщепления, nsP3 образует кольцевую структуру, которая окружает nsP2. Эти два белка имеют обширную поверхность контакта. Мутации в nsP2, образующие нецитопатические вирусы или термочувствительные фенотипы, кластеризуются в области поверхности контакта P2/P3. Мутации P3 напротив локализации нецитопатических мутаций nsP2 предотвращают эффективное расщепление P2/3. Это, в свою очередь, может влиять на инфекционность РНК, изменяя уровни продукции вирусной РНК.

[0077] Треть с 3'-конца генома содержит сгРНК, которая служит в качестве матрицы для трансляции всех структурных белков, необходимых для формирования вирусных частиц: корового нуклеокапсидного белка С, и оболочечных белков Р62 и Е1, которые ассоциируют в форме гетеродимера. Заякоренные в вирусной мембране поверхностные гликопротеины являются ответственным за узнавание рецептором и вход в клетки-мишени посредством слияния мембран. сгРНК транскрибируется с субгеномного промотора р26S, присутствующего на 3'-конце последовательности РНК, кодирующей белок nsр4. Протеолитическое созревание Р62 до Е2 и Е3 вызывает изменение вирусной поверхности. Совместно, гликопротеиновые «шипики» Е1, Е2, и иногда Е3, формируют димер Е1/Е2 или тример Е1/Е2/Е3, где Е2 простирается от центра к вершинам, Е1 заполняет пространство между вершинами, и Е3, если присутствует, находится на дистальном конце шипика. При подвергании вируса воздействию кислотности эндосомы, Е1 диссоциирует от Е2 с формированием гомотримера Е1, который является необходимым для стадии слияния, чтобы свести вместе клеточные и вирусные мембраны. Альфавирусный гликопротеин Е1 представляет собой вирусный белок слияния класса II, который является структурно отличным от белков слияния класса I, обнаруженных в вирусе гриппа и HIV. Гликопротеин Е2 функционирует для взаимодействия с нуклеокапсидом через свой цитоплазматический домен, в то время как его эктодомен является ответственным за связывание с клеточным рецептором. Большинство альфавирусов теряют периферический белок Е3, в то время как у вирусов Семлики он остается ассоциированным с вирусной поверхностью.

[0078] Опубликовано, что репликация альфавируса происходит на мембранных поверхностях внутри клетки-хозяина. На первой стадии инфекционного цикла, 5'-конец геномной РНК транслируется в полибелок (nsP1-4) с активностью РНК-полимеразы, образующий отрицательную цепь, комплементарную геномной РНК. Последовательность на 3'-конце геномной РНК играет важную роль в инициации синтеза отрицательной цепи, где минимальное количество остатков аденилата идентифицировано как необходимое для возникновения репликации. В частности, ранее опубликовано, что для репликации альфавирусных геномов, должно быть по меньшей мере 11 остатков в поли(А)-хвосте, после 3'-UTR, для эффективной инициации синтеза минус-цепи, и таким образом,

возникновения репликации. Ранее опубликовано также, что удлинение поли(А)-хвоста до 25 остатков приводит к усилению репликации, но дальнейшего усиления репликации не наблюдали, когда поли(А) удлиняли далее до 34 остатков. Кроме того, внутренние остатки не-А в поли(А) являются наиболее часто неблагоприятными для репликации, что позволяет предполагать, что ферментное присоединение поли(А)-хвоста не обеспечивало преимуществ для репликона РНК, который не содержал исключительно 3'-остатки аденилата после 3'-UTR. Ранее опубликовано, что не присутствует усиление синтеза минус-цепи на РНК-матрицах с более чем 25 остатками аденилата в поли(А)-хвосте. На второй стадии репликации, отрицательную цепь используют в качестве матрицы для продукции двух РНК, соответственно: (1) положительной геномной РНК, соответствующей геному вторичных вирусов, образующей, посредством трансляции, другие nsP и действующей в качестве генома для вируса; и (2) сгРНК, кодирующей структурные белки вируса, формирующие инфекционные частицы. Соотношение положительной геномной РНК/сгРНК регулируется посредством протеолитического ауторасщепления полибелка до nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4. На практике, экспрессия вирусных генов происходит в двух фазах. В первой фазе, в основном происходит синтез положительных геномных цепей и отрицательных цепей. В ходе второй фазы, синтез сгРНК является практически исключительным, таким образом, приводя к продукции большого количества структурного белка.

[0079] Как описано выше, часто могут присутствовать значительные различия между альфавирусами. То, какие части генома содержат компоненты с различными или синонимическими функциями, также изменчиво между альфавирусами. Помимо изменчивости между индивидуальными альфавирусами, часто присутствуют различия внутри штаммов альфавирусов, которые также могут обуславливать изменения характеристик, таких как вирулентность. Например, изменчивость последовательности между североамериканскими и южноамериканскими штаммами EEEV изменяет способность к модуляции пути STAT1, что приводит к дифференциальной индукции интерферонов типа I и полученным в результате изменениям в вирулентности. Как описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным альфавирусным геномам или репликонам РНК, основанным на EEEV. В качестве дополнительного примера, SINV штамм S.A.AR86 (AR86) быстро и сильно ингибирует фосфорилирование тирозина STAT1 и STAT2 в ответ на IFN- γ и/или IFN- β , но родственный SINV штамм Girdwood является неэффективным ингибитором активации STAT1/2. Уникальный треонин в положении 538 в неструктурном белке AR86 приводит к более медленному процессингу неструктурного белка и задержке синтеза субгеномной РНК из родственного SINV штамма Girdwood, что вносит вклад в фенотип нейровирулентности для взрослых мышей и может обеспечивать преимущества для кинетики и выхода экспрессии гетерологичного белка, и вносит вклад в более сильный иммунный ответ на вакцинный антиген, экспрессированный с основанных на AR86 векторах на основе репликона. Функциональный репликон AR86 с использованием

опубликованной геномной последовательности (Genbank U38305) не был получен, вероятно, из-за фенотипа T538, описанного выше, что, предположительно, является причиной того, почему существующие репликоны на основе AR86 содержат множество изменений, включая ослабляющую мутацию T538I. Однако, экспериментальные результаты, представленные в настоящем описании, показали, что возможно получать функциональные репликоны AR86, все еще несущие T538, посредством создания специфических химер с генами nsP из Girdwood. Как дополнительно описано ниже, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированным альфавирусным геномам или репликонам РНК на основе SINV штамма AR86.

КОМПОЗИЦИИ ПО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0080] Как более подробно описано ниже, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к конструкциям нуклеиновых кислот, к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, где по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков соответствующего немодифицированного альфавирусного генома или репликона РНК, была удалена. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированному альфавирусному геному или репликону РНК, в которых кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 присутствует, однако, по меньшей мере часть последовательности или полная последовательность, кодирующая один или более структурных белков, отсутствует. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированному альфавирусному геному или репликону РНК, в которых кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 присутствует, однако, значительная часть последовательности, кодирующей структурные белки, отсутствует. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам и культурам клеток, сконструированным для включения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании.

А. Конструкции нуклеиновых кислот

[0081] Как более подробно описано ниже, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к новым конструкциям нуклеиновых кислот, включающим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный геном или репликон РНК альфавируса, такого как вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV) или вирус Синдбис (SINV). Например, модифицированный альфавирусный геном может включать делецию(и), замену(ы) и/или вставку(и) в одной или нескольких геномных областях родительского альфавирусного генома.

[0082] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых

кислот включают модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, где значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК заменена на синтетическую адаптерную молекулу, имеющую конфигурацию, чтобы способствовать вставке гетерологичной последовательности в модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая адаптерная молекула имеет формулу I:

[5'-фланкирующий домен]-[участок рестрикции]_n-[3'-фланкирующий домен]

Формула I

[0083] , где а) *n* представляет собой целое число от 1 до 6;

[0084] б) участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционной эндонуклеазы; и

[0085] с) каждый из 5'-фланкирующего домена и 3'-фланкирующего домена включает последовательность нуклеиновой кислоты, как прогнозировано, имеющую минимальную вторичную структуру.

[0086] В некоторых вариантах осуществления, *n* представляет собой целое число от 1 до 6, такое как, например, от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 3, от 2 до 4, от 2 до 5, от 2 до 6, от 3 до 4, от 3 до 5, от 3 до 6, от 4 до 5, от 4 до 6 или от 5 до 6. В некоторых вариантах осуществления, *n* представляет собой 1.

[0087] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, где значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более структурных белков, из модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК была удалена, например, модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК не включает по меньшей мере часть кодирующей последовательности для одного или более альфавирусных структурных белков СР, Е1, Е2, Е3 и 6К.

[0088] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков СР, Е1, Е2, Е3 и 6К немодифицированного вирусного генома или репликона РНК, была удалена. В некоторых вариантах осуществления, часть последовательности или полная последовательность, кодирующая СР, была удалена. В некоторых вариантах осуществления, часть последовательности или полная последовательность, кодирующая Е1, была удалена. В некоторых вариантах осуществления, часть последовательности или полная последовательность, кодирующая Е2, была удалена. В некоторых вариантах осуществления, часть последовательности или полная последовательность, кодирующая Е3, была удалена. В некоторых вариантах осуществления, часть последовательности или полная последовательность, кодирующая

6К, была удалена. В некоторых вариантах осуществления, часть последовательности или полная последовательность, кодирующая комбинацию CP, E1, E2, E3 и 6К, была удалена. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированному альфавирусному геному или репликону РНК, в которых кодирующая последовательность для неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 немодифицированного альфавирусного генома или репликона РНК присутствует, однако, по меньшей мере часть последовательности или полная последовательность, кодирующая один или более структурных белков (например, CP, E1, E2, E3 и 6К) альфавирусного генома или репликона РНК, отсутствует. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к модифицированному альфавирусному геному или репликону РНК, в которых значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей структурные белки, из модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК, была удалена.

[0089] В некоторых вариантах осуществления, значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей один или более вирусных структурных белков, была удалена. Специалисту в данной области понятно, что значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующая вирусный структурный полипептид, может включать достаточную часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусный структурный полипептид, чтобы позволять предположительную идентификацию этого полипептида, либо посредством оценки последовательности вручную специалистом в данной области, либо посредством компьютерно-автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, в «Basic Local Alignment Search Tool»; Altschul SF et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1993). Соответственно, значительная часть нуклеотидной последовательности содержит достаточную часть последовательности, чтобы позволять специфическую идентификацию и/или выделение фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащей эту последовательность. Например, значительная часть 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% полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты. Как описано выше, настоящее изобретение относится к молекулам и конструкциям нуклеиновых кислот, лишенных частичных или полных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более вирусных структурных белков. Специалист в данной области, пользуясь преимуществом последовательностей, как описано в настоящем описании, может легко использовать все или значительную часть описанных последовательностей для композиций и способов по настоящему изобретению. Соответственно, настоящая заявка содержит полные последовательности, как описано в настоящем описании, например, последовательности,

приведенные в сопутствующем списке последовательностей, так же как значительные части этих последовательностей, как определено выше.

[0090] В некоторых вариантах осуществления, полная последовательность, кодирующая вирусные структурные белки, была удалена, например, модифицированный вирусный геном или репликон РНК не включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую структурные белки, из вирусного немодифицированного генома или репликона РНК.

[0091] Конструкции срРНК по настоящему изобретению, как правило, имеют длину по меньшей мере приблизительно 2 т.п.о. Например, срРНК может иметь длину по меньшей мере приблизительно 2 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 3 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 4 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 5 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 6 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 7 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 8 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 9 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 10 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 11 т.п.о., по меньшей мере приблизительно 12 т.п.о. или более чем 12 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления, срРНК может иметь длину от приблизительно 4 т.п.о. до приблизительно 20 т.п.о., от приблизительно 4 т.п.о. до приблизительно 18 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 14 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 12 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о., от приблизительно 9 т.п.о. до приблизительно 14 т.п.о., от приблизительно 10 т.п.о. до приблизительно 18 т.п.о., от приблизительно 11 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 18 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 20 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 8 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 7 т.п.о., от приблизительно 5 т.п.о. до приблизительно 6 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 12 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 9 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 8 т.п.о., от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 7 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 9 т.п.о., от приблизительно 7 т.п.о. до приблизительно 8 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о., от приблизительно 8 т.п.о. до приблизительно 9 т.п.о., от приблизительно 9 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о., от приблизительно 9 т.п.о. до приблизительно 10 т.п.о. или от приблизительно 10 т.п.о. до приблизительно 11 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления, срРНК может иметь длину от приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 14 т.п.о. В некоторых вариантах осуществления, срРНК может иметь длину приблизительно 6 т.п.о. до приблизительно 16 т.п.о.

Синтетическая адаптерная молекула

[0092] Как описано выше, каждый из 5'-фланкирующего домена и 3'-фланкирующего домена синтетической адаптерной молекулы включает последовательность нуклеиновой кислоты, как прогнозировано, имеющую минимальную вторичную структуру, такую как структура стебель-петля или структура шпильки, которая может потенциально функционировать в качестве сигнала терминации для полимеразы, что, в свою очередь, может вызвать преждевременную терминацию. Специалисту в данной области понятно, что вторичную структуру последовательности нуклеиновой кислоты можно оценивать посредством множества способов, включая способы, разработанные для определения или прогнозирования значения ΔG сворачивания данной последовательности нуклеиновой кислоты, или для определения структуры с минимальной свободной энергией (MFE) для последовательности нуклеиновой кислоты. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, последовательность 5'-фланкирующего домена синтетической адаптерной молекулы имеет значение ΔG сворачивания структуры с MFE, более высокое, чем предопределенное пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления, структуру с MFE для последовательности нуклеиновой кислоты можно определять посредством использования инструмента Mfold для прогнозирования структуры РНК с MFE и расчета ΔG , на основании этой структуры, как описано ранее, например, в Zuker M. *Nucleic Acids Research*, Volume 31, Issue 13, 1 July 2003. Альтернативно или дополнительно, можно также использовать пакет программного обеспечения Vienna RNA, публично доступный на <http://PHK.tbi.univie.ac.at/>, с набором общеупотребительных программ для сворачивания, дизайна и анализа последовательностей РНК. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, последовательность 5'-фланкирующего домена синтетической адаптерной молекулы имеет значение ΔG сворачивания структуры с MFE более чем приблизительно $>-9,6$ ккал/моль для локальной структуры шпилька/стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен не включает последовательность, которая кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля.

[0093] В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида, который можно использовать, чтобы способствовать бесшовной и/или инсулированной экспрессии представляющего интерес белка без N-концевой лидерной последовательности. Подходящие аутопротеолитические пептиды включают, но без ограничения, последовательности аутопротеолитического расщепления, происходящие из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2А тешовируса-1 свиней (P2A), 2А вируса ящура (FMDV) (F2A), 2А вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2А вируса *Thosea asigna* (T2A), 2А вируса цитоплазматического полиэдроза (VmCPV2A), 2А вируса фляшерии (VmIFV2A). В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность для аутопротеолитического пептида встроена выше участка(ов) рестрикции. Для цели по настоящему изобретению, термин «выше», применительно к

последовательности нуклеиновой кислоты, обозначает область, локализованную на 5'-конце рассматриваемой последовательности нуклеиновой кислоты, и термин «ниже» обозначает область, локализованную на 3'-конце указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен синтетической адаптерной молекулы включает кодирующую последовательность для одной или нескольких последовательностей аутопротеолитического расщепления, происходящие из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2A тешовируса-1 свиней (P2A), 2A вируса ящура (FMDV) (F2A), 2A вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2A вируса *Thosea asigna* (T2A), 2A вируса цитоплазматического полиэдроса (BmCPV2A), 2A вируса фляшерии (BmIFV2A), или их комбинацию.

[0094] В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает внутренний участок связывания рибосомы (IRES), который можно использовать, чтобы способствовать инсулированной экспрессии представляющего интерес белка. В некоторых вариантах осуществления, элемент IRES встроен выше участка(ов) рестрикции. Последовательности IRES, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, вирусные последовательности IRES, клеточные последовательности IRES и искусственные последовательности IRES. Неограничивающие примеры последовательностей IRES включают IRES ассоциированного с саркомой Капоши вируса герпеса (KSHV), IRES вируса гепатита, IRES пестивируса, крипавируса IRES, IRES вируса черемуховой тли, IRES фактора роста фибробластов, IRES тромбоцитарного фактора роста, IRES фактора роста эндотелия сосудов, IRES инсулиноподобного фактора роста, IRES пикорнавируса, IRES вируса энцефаломиокардита (EMCV), IRES Pim-1, IRES p53, IRES Araf-1, IRES TDP2, IRES L-тис и IRES с-тис.

[0095] В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен не включает участок старта трансляции ни в какой рамке считывания. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает участок старта трансляции или его часть (например, оканчивающийся на «А» или «АТ», или «АТG»), в качестве последних нуклеотидов 5'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает кодон метионина, в качестве последних трех нуклеотидов 5'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен имеет длину от приблизительно 15 нуклеотидов до приблизительно 35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, например, такую как по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает последовательность

нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97% по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления, 1'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, и кроме того, где один, два, три, четыре или пять нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты заменены на другой нуклеотид.

[0096] Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, 3'-фланкирующий домен синтетической адаптерной молекулы включает последовательность нуклеиновой кислоты, как прогнозировано, имеющую минимальную вторичную структуру, такую как структура стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления, последовательность 3'-фланкирующего домена имеет значение ΔG сворачивания структуры с минимальной свободной энергией (MFE), более высокое, чем предопределенное пороговое значение. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен не включает последовательность, которая кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает стоп-кодон трансляции в качестве первых трех нуклеотидов 3'-адаптерной последовательности. Подходящие стоп-кодны включают TAG, TAA и TGA. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает стоп-кодон TAG в качестве первых трех нуклеотидов 3'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает стоп-кодон TAA в качестве первых трех нуклеотидов 3'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает стоп-кодон TAG в качестве первых трех нуклеотидов 3'-адаптерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, например, такую как, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97% по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, 3'-фланкирующий домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, и кроме того, где один, два, три,

четыре или пять нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты заменены на другой нуклеотид.

[0097] В некоторых вариантах осуществления, синтетическая адаптерная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70% например, такую как по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая адаптерная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97% по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая адаптерная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, синтетическая адаптерная молекула включает последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую 100% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20, и кроме того, где один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять нуклеотидов в последовательности нуклеиновой кислоты заменены на другой нуклеотид.

Участки рестрикции

[0098] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции в синтетической адаптерной молекуле поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа I, рестрикционных ферментов типа II, рестрикционных ферментов типа III, рестрикционных ферментов типа IV, рестрикционных ферментов типа V и эндонуклеаз хоминга. В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции в синтетической адаптерной молекуле поддается уникальному расщеплению, например, уникальный участок рестрикции во всей конструкции нуклеиновой кислоты. Чтобы сделать участок рестрикции уникальным, молчание мутации можно, необязательно, конструировать в участках рестрикции в кодирующей репликон последовательности конструкции нуклеиновой кислоты.

[0099] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа I, представляющих собой комплексные, мультисубъединичные, комбинированные ферменты рестрикции и модификации, которые разрезают ДНК в участке, который отличается, и находится на случайном расстоянии (по меньшей мере 1000 п.о.), в отдалении от их участка узнавания. За расщеплением в этих случайных участках следует процесс транслокации ДНК, что показывает, что эти ферменты являются также молекулярными моторами. Участок узнавания является асимметричным и состоит из двух специфических частей, одной, содержащей 3-4 нуклеотида, и другой, содержащей 4-5 нуклеотидов, разделенных посредством неспецифического спейсера из приблизительно 6-8 нуклеотидов. Эти ферменты являются многофункциональными и являются способными к активности как рестрикционного расщепления, так и

модификации, в зависимости от статуса метилирования ДНК-мишени. Кофакторы S-аденозилметионин (AdoMet), гидролизованный аденозинтрифосфат (АТФ) и ионы магния (Mg^{2+}) являются необходимыми для их полной активности.

[0100] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа II, которые узнают специфические последовательности 4-8 нуклеотидов, которые являются, как правило, палиндромными, и разрезают в определенных положениях внутри последовательностей узнавания, оставляя липкие (5'- или 3'-выступающие концы) или тупые концы (см., например, **ФИГ. 7**). Они образуют дискретные фрагменты рестрикции и различные паттерны полос в геле, и их часто используют в лаборатории для общепринятого анализа ДНК и клонирования генов. Иллюстративные ферменты типа II включают HhaI, HindIII и NotI, которые расщепляют ДНК внутри своих последовательностей узнавания. Многие ферменты типа II являются коммерчески доступными. Большинство узнают последовательности ДНК, которые являются симметричными, поскольку они связываются с ДНК в форме гомодимеров, однако, некоторые, (например, BbvCI) узнают асимметричные последовательности ДНК, поскольку они связываются в форме гетеродимеров. Некоторые ферменты типа II узнают непрерывные последовательности (например, EcoRI), в которых две половины участков последовательности узнавания являются смежными, в то время как другие узнают прерывистые последовательности (например, BglII) в которых половины участков разделены. Расщепление оставляет 3'-гидроксил на одной стороне каждого разреза и 5'-фосфат на другой. Ферменты типа II требуют магния для активности, и соответствующие ферменты модификации требуют S-аденозилметионина. Ферменты типа II проявляют тенденцию являться небольшими, с субъединицами в диапазоне 200-350 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции в синтетической адаптерной молекуле поддается расщеплению посредством SpeI или его изошизомера. Подходящие изошизомеры SpeI включают, но без ограничения, AhII, BcuI и SpeI-NF.

[0101] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции в синтетической адаптерной молекуле поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента типа IIS. Рестрикционные ферменты типа IIS содержат группу ферментов, которые разрезают ДНК на определенном расстоянии ниже или выше последовательности узнавания. Это обусловлено архитектурой фермента, где каталитический домен и домен узнавания разделены посредством полипептидного линкера. Не существует требований к последовательности в отношении идентичности оснований в участке расщепления; таким образом последовательности вне участка узнавания могут представлять собой любую комбинацию нуклеотидов ((см., например, **ФИГ. 7**). Рестрикционные ферменты типа IIS включают ферменты, подобные FokI и AlwI, которые расщепляют за пределами своей последовательности узнавания с одной стороны. Эти ферменты являются промежуточными по размеру, длиной 400-650 аминокислот, и они узнают последовательности, которые являются непрерывными и асимметричными. Они содержат

два отдельных домена, один для связывания ДНК, другой для расщепления ДНК. Считают, что они связываются с ДНК в форме мономеров, по большей части, но расщепляют ДНК кооперативно, посредством димеризации доменов расщепления смежных молекул ферментов. По этой причине, некоторые ферменты типа IIS являются намного более активными в отношении молекул ДНК, содержащих множество участков узнавания.

[0102] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа III (например, EcoP15), представляющих собой большие комбинированные ферменты рестрикции и модификации. Рестрикционные ферменты типа III узнают две отдельные непалиндромные последовательности, находящиеся в обратной ориентации. Они разрезают ДНК приблизительно через 20-30 пар оснований после участка узнавания. Эти ферменты содержат более одной субъединицы и требуют кофакторов AdoMet и АТР для своих ролей в метилировании и рестрикционном расщеплении ДНК, соответственно. Рестрикционные ферменты типа III являются компонентами механизмов рестрикции-модификации прокариотической ДНК, которые защищают организм от проникновения чужеродной ДНК. Ферменты типа III представляют собой гетеро-олигомерные, многофункциональные белки, состоящие из двух субъединиц, Res (P08764) и Mod (P08763). Субъединица Mod узнает последовательность ДНК, специфическую для этой системы и представляет собой метилтрансферазу модификации; таким образом, она является функционально эквивалентной субъединицам M и S рестрикционной эндонуклеазы типа I. Res является необходимой для рестрикционного расщепления, хотя она не имеет собственной ферментной активности. Ферменты типа III узнают короткие асимметричные последовательности ДНК длиной 5-6 п.о. и расщепляют на 25-27 п.о. ниже, оставляя короткие, одноцепочечные 5'-выступающие концы. Они требуют присутствия двух неметилированных участков узнавания в обратной ориентации, чтобы происходило рестрикционное расщепление. Эти ферменты метилируют только одну цепь ДНК, в положении N-6 остатков аденозила, так что новая реплицированная ДНК может иметь только одну метилированную цепь, что является достаточным для защиты против рестрикционного расщепления. Ферменты типа III принадлежат к бета-подсемейству N6-аденинметилтрансфераз, содержащему девять мотивов, характеризующих это семейство, включая мотив I, карман связывания AdoMet (FXGXG), и мотив IV, каталитическую область (S/D/N (PP) Y/F). Дополнительную информацию относительно систем рестрикции ДНК типа I, II, III и IV, V можно обнаружить, например, в Leonen et al., *Nucleic Acids Res* (2014) 42(1):3-19, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0103] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных

ферментов типа IV, которые узнают модифицированную, необязательно, метилированную ДНК и проиллюстрированы системами McrBC и Mrr из *E. coli*.

[0104] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа V, которые используют направляющие РНК (нРНК) для нацеливания на специфические непалиндромные последовательности, обнаруживаемые у проникающих организмов. Рестрикционные ферменты типа V могут разрезать ДНК различной длины, при условии, что предоставлена подходящая направляющая РНК. Неограничивающие примеры рестрикционных ферментов типа V включают комплекс cas9-нРНК из CRISPR.

[0105] В некоторых вариантах осуществления, участок рестрикции поддается расщеплению посредством эндонуклеазы хоминга (например, I-SceI). Эндонуклеазы хоминга представляют собой ДНКазы для двухцепочечной ДНК, которые имеют большие, асимметричные участки узнавания (12-40 пар оснований) и кодирующие последовательности, которые обычно заключены либо в интронах, либо в интееинах. Как правило, эндонуклеазы хоминга разрезают ДНК на определенном расстоянии ниже или выше их больших, асимметричных последовательностей узнавания (12-40 пар оснований). Большое количество биохимических и структурных данных опубликовано для этих ферментов на протяжении последних нескольких десятилетий, и может быть обнаружено, например, в Chevalier and Stoddard, *Nucleic Acids Res* (2001) 29(18): 3757-3774), содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Примеры эндонуклеаз хоминга, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, I-CeuI, I-SceI, PI-PspI и PI-SceI.

[0106] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, кроме того, включают дополнительный участок рестрикции, встроенный непосредственно ниже последовательности, кодирующей поли(А)-хвост альфавирусного генома или репликона РНК. В случаях, в которых конструкции нуклеиновых кислот находятся в кольцевой форме, дополнительный участок рестрикции, встроенный непосредственно ниже последовательности, кодирующей поли(А)-хвост, может способствовать линейаризации кольцевых конструкций нуклеиновых кислот, таким образом, образуя «чистые» поли(А)-концы матрицы и/или образуя продукты нуклеиновой кислоты с одинаковой идентичностью концов. В некоторых вариантах осуществления, такой участок рестрикции может позволять получение деконкатемеризованных продуктов амплификации по типу катящегося кольца (RCA) или процессинг продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), оставляющие одинаковую идентичность концов. Специалисту в данной области понятно, что «чистый» поли(А)-конец матрицы, в общем, обозначает конец последовательности ДНК с гомополимерной последовательностью, который служит матрицей для продукта РНК IVT, который подвергается терминации посредством прерывания транскрипции, что приводит к получению продукта РНК, содержащего последовательность поли(А) без 3'-остатков не-А. В одном аспекте, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конструкциям

нуклеиновых кислот, включающим модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, включая поли(А)-хвост, где дополнительный участок рестрикции сконструирован непосредственно ниже последовательности, кодирующей поли(А)-хвост альфавирусного генома или репликона РНК. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента типа IIS. Примеры рестрикционных ферментов типа IIS, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают AclI, AlwI, Alw26I, BaeI, BbiI, BbsI, BbsI-HF, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BmrI, BpmI, BpuEI, BsaI, BsaI-HF, BsaI-HFv2, BsaXI, BseGI, BseRI, BsgI, BsmAI, BsmBI-v2, BsmFI, BsmI, BspCNI, BspMI, BspQI, BsrDI, BsrI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2 и BtsIMutI. Дополнительные подходящие рестрикционные ферменты типа IIS включают, но без ограничения, CspCI, EarI, EciI, Eco3II, Esp3I, FauI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, LpuI, MboII, MlyI, MmeI, MnlI, NmeAIII, PaqCI, PleI, SapI и SfaNI. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством SapI, VpiI, VmsI, Mva1269I или изошизомера любого из них. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством SapI или его изошизомера. В некоторых вариантах осуществления, изошизомер SapI представляет собой LguI, PciSI или BspQI.

[0107] Продемонстрировано, что модифицированные альфавирусные геномы или репликоны РНК (например, срРНК), как описано в настоящем описании, например, включающие участок рестрикции, встроенный ниже последовательности, кодирующей поли(А)-хвост, приводящий к получению модифицированных альфавирусных геномов или репликонов РНК (например, срРНК) без не относящихся к аденилату остатков на 3'-конце, показывают неожиданно усиленную биологическую активность, поскольку репликоны текущего уровня техники чаще всего содержат не относящиеся к аденилату остатки на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления, уровень усиления активности репликации, экспрессии и/или трансляции модифицированных геномов или репликонов РНК (например, срРНК), как описано в настоящем описании, выше по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 (2-кратный), 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более раз, относительно уровня репликации, экспрессии или трансляции, детектированного для соответствующего немодифицированного репликона (например, срРНК), например, репликона (например, срРНК) с не относящимися к аденилату остатками на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления, уровень усиления активности репликации, экспрессии и/или трансляции модифицированных геномов или репликонов РНК (например, срРНК), как описано в настоящем описании, увеличен на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100%, относительно уровня репликации, экспрессии или трансляции, детектированного для соответствующего немодифицированного репликона (например, срРНК), например, репликона (например, срРНК) с не относящимися к аденилату остатками на 3'-конце. Уровень усиления

активности можно измерять посредством любых удобных способов и технологий, известных в данной области включая, но без ограничения, уровень транскрипта, количество белка, активность белка и т.д. В некоторых вариантах осуществления, уровень усиления активности может быть доказан посредством более высокого процента клеток, содержащих двухцепочечную РНК, при данной массе (дозе) РНК, трансформированной в клетки в культуре ткани. В некоторых вариантах осуществления, уровень усиления активности может быть доказан посредством более высокого процента клеток, экспрессирующих белок, при данной массе (дозе) РНК, трансформированной в клетки в культуре ткани.

[0108] Без ограничения какой-либо конкретной теорией, усиленный уровень репликации, экспрессии или трансляции может быть обусловлен отсутствием не-А нуклеотидов на 3'-конце рекомбинантной молекулы РНК, которое канонически не встречается в нормальной биологии альфавируса. Дизайн модифицированного альфавируса, описанного в настоящем описании, резко контрастирует с существующими альфавирусными векторами, где РНК-полимеразу SP6 или T7 часто используют для транскрипции продукта РНК, которая подвергается терминации, в то же время с транскрипцией последовательности (содержащей остатки не-А) ниже поли(А), в признаке, известном как «терминатор», или где рестрикционный фермент используют для линейаризации матрицы, кодирующей продукт РНК, который подвергается терминации посредством прерывания транскрипции, но встраиванию в результате не относящихся к аденилату остатков на 3'-конце РНК.

[0109] Как более подробно описано ниже, встраивание участка для рестрикционного фермента типа PIS ниже поли(А)-хвоста, который впоследствии расщепляется для получения линейной ДНК-матрицы, вызывает терминацию транскрипции посредством прерывания транскрипции, без присутствия терминаторной последовательности для РНК-полимеразы. В экспериментах, описанных ниже, участок для рестрикционной эндонуклеазы типа PIS представляет собой участок для SapI, который расщепляет выше последовательности узнавания SapI, оставляя только поли(А)-матрицу на 3'-конце линейаризованной ДНК (т.е., никаких нуклеотидов не-А не может присутствовать в ДНК-матрице или транскрибированном продукте РНК). Этот способ не был описан для репликонов, и не было описано, что присутствие исключительно остатков аденилата в поли(А)-хвосте придает какое-либо усиление биологической активности репликонам, где наиболее распространенными способами являются использование терминатора транскрипции или прерывания транскрипции, которые оба, как правило, оставляют не относящиеся к аденилату нуклеотиды на конце продукта транскрипции, или ферментное присоединение поли(А)-хвоста транскрибированного *in vitro* продукта, который все еще содержит не относящиеся к аденилату остатки после 3'-UTR.

[0110] Как обсуждали выше, ранее опубликовано, что для репликации альфавирусных геномов, 11 остатков в поли(А)-хвосте после 3'-UTR являются необходимыми для эффективной инициации синтеза минус-цепи, и таким образом,

возникновения репликации. Кроме того, внутренние остатки не-А в поли(А) являются наиболее часто неблагоприятными для репликации, что позволяет предполагать, что ферментное присоединение поли(А)-хвоста не обеспечивало преимуществ для репликона РНК, который не содержал исключительно 3'-остатки аденилата после 3'-UTR. Ранее опубликовано, что не присутствует усиление синтеза минус-цепи синтез на РНК-матрицах с более чем 25 остатками аденилата в поли(А)-хвосте, например, с 34 остатками аденилата в поли(А)-хвосте. Дополнительную информацию в этом отношении можно обнаружить, например, в Hardy & Rice, J. Virol. Pp. 4630-4639, April 2005.

[0111] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, поли(А)-хвост альфавирусного генома или репликона РНК (например, срРНК) удлинен посредством увеличения длины поли(А) на ДНК-матрице, для усиления уровня репликации, экспрессии или трансляции, которое является неожиданным, на основании опубликованных биологии альфавируса или альфавирусных репликонов. В частности, экспериментальные данные, представленные в настоящем описании, показали неожиданное изменение (например, увеличение) уровня биологической активности в форме репликации РНК и экспрессии белка посредством увеличения длины поли(А)-хвоста. В некоторых вариантах осуществления, удлиненная последовательность, кодирующая поли(А)-хвост, имеет длину, лежащую в диапазоне от приблизительно 30 до приблизительно 120 остатков аденилата, например, такую как от приблизительно 30 до приблизительно 60, от приблизительно 40 до приблизительно 70, от приблизительно 50 до приблизительно 80, от приблизительно 60 до приблизительно 90, от приблизительно 70 до приблизительно 100, от приблизительно 40 до приблизительно 80, от приблизительно 50 до приблизительно 70, от приблизительно 60 до приблизительно 90 или от приблизительно 40 до приблизительно 90 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост является более длинным, чем приблизительно 34 остатка. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90 и приблизительно 100 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину 30 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину 49 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину 91 остаток аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину 90 остатков аденилата. В некоторых вариантах осуществления, удлиненный поли(А)-хвост имеет длину 64 остатка аденилата.

[0112] Уровень усиления активности можно измерять посредством любых подходящих способов и технологий, известных в данной области, включая, но без ограничения, способы и технологии, измеряющие уровень транскрипта, количество белка и/или активность белка и т.д.

[0113] В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты включает модифицированный репликон РНК (например, срРНК), содержащий модифицированный геном или репликон РНК (например, срРНК) вируса, принадлежащего к роду Alphavirus семейства *Togaviridae*. Как вирулентные, так и невирулентные штаммы альфавируса являются подходящими. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК происходит из альфавируса, принадлежащего к группе VEEV/EEEV или группе SFV, или группе SINV. В некоторых вариантах осуществления, альфавирус выбран из группы, состоящей из вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вируса Эверглейдс (EVEV), вируса Мукамбо (MUCV), вируса Пиксуна (PIXV), вируса Миддельбург (MIDV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса О'Ньюнг-ньюнг (ONNV), вируса реки Росс (RRV), вируса леса Барма (BF), вируса Гета (GET), вируса Сагияма (SAGV), вируса Бебару (BEBV), вируса Майаро (MAYV), вируса Уна (UNAV), вируса Синдбис (SINV), вируса Аура (AURAV), вируса Ватароа (WHAV), вируса Бабанки (BABV), вируса Кызылагач (KYZV), вируса западного энцефалита лошадей (WEEV), вируса Хайлендс-Джи (HJV), вируса Форт-Морган (FMV), Ндуму (NDUV) и вирус Багги Крик. В некоторых вариантах осуществления, альфавирус представляет собой вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV). В некоторых вариантах осуществления, альфавирус представляет собой вирус Чикунгунья (CHIKV). В некоторых вариантах осуществления, альфавирус представляет собой вирус Синдбис (SINV). В некоторых вариантах осуществления, альфавирус представляет собой вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV).

[0114] Неограничивающие примеры штаммов CHIKV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают CHIKV S27, CHIKV LR2006-OPY-1, CHIKV YO123223, CHIKV DRDE, CHIKV 37997, CHIKV 99653, CHIKV Ag41855 и штамм Нагпур (Индия) 653496. Дополнительные примеры штаммов CHIKV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, штаммы, описанные в 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 репликон РНК (например, срРНК) CHIKV является происходящим из CHIKV штамма S27. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК CHIKV является происходящим из CHIKV штамма DRDE. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК (например, срРНК) CHIKV является происходящим из CHIKV штамма DRDE-06. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК (например, срРНК) CHIKV является происходящим из CHIKV штамма DRDE-07.

[0115] Неограничивающие примеры штаммов SINV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают SINV штамма AR339, AR86 и Girdwood. Дополнительные примеры штаммов SINV, подходящих для композиций и

способов по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, штаммы, описанные в 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. of Virol.* 2018, 163:2465-2469 и Ling et al. *J. Virol.* 2019, 93:e00620-19. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК (например, срРНК) SINV является происходящим из SINV штамм Girdwood. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК (например, срРНК) SINV представляет собой химеру из SINV штамма Girdwood и SINV штамма AR86.

[0116] Неограничивающие примеры штаммов VEEV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают 204381, 306425, 3880, 3908, 6119, 66637, 68U201, 69Z1, 83U434, 93-42124, 96-32863, AB66640, An9004, C-84, CPA-201, FSL0201, INH-6803, INH-9813, Pan36080, P676, SH3, TC-83, TRD, V178, V198, V209A, V3526 и ZPC738.

[0117] Неограничивающие примеры штаммов EEEV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают 300851, 436087, 783372, 792138, AR36, AR38, AR59, BG60, BR56, BR60, BR65, BR67, BR75, BR76, BR77, BR78, BR83, BR85, C-49, CO92, CT90, EC74, FL02a-b, FL82, FL91, FL93-1637, FL93-939, FL93-969, FL96, GA01, GA91, GA97, GML, GML903836, GU68, LA02, LA47, LA50, MA06, MA38, MA77, MD85, MD90A, MP-9, MS83, MX97, NJ03a-b, NJ60, NY03a-d, NY04a-k, NY05a-f, NY69, NY71a-c, NY73, NY74a-h, NY75, PA62, PA84, PA86, PE-0,0155-96, PE-16,0050-98, PE-18,0140-99, PE-18,0172-99, PE-3,0815-96, PE6, PE70, PE75, TN08, TR59, TVP8512, TX03, TX91, TX95, VA03, VA33, VA33, VE76, VE80 и W180. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или репликон РНК (например, срРНК) EEEV является происходящим из EEEV штамма FL93-939.

[0118] Неограничивающие примеры штаммов WEEV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают WEEV California, McMillan, IMP181, Imperial, Imperial181, IMPR441, 71V-1658, AG80-646, BFS932, COA592, EP-6, E1416, BFS1703, BFS2005, BSF3060, BSF09997, CHLV53, KERN5547, 85452NM, Montana-64, S8-122 и TBT-235. Дополнительные примеры штаммов WEEV, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают 5614, 93A27, 93A30, 93A38, 93A79, B628(CI 15), CBA87, CNTR34, CO921356, Fleming, Lake43, PV012357A, PV02808A, PV72102, R02PV001807A, R02PV002957B, R02PV003422B, R05PV003422B, R0PV003814A и R0PV00384A. Дополнительные подходящие штаммы WEEV включают, но без ограничения, штаммы, описанные в Bergren NA et al., *J. Virol.* 88(16): 9260-9267, Aug 2014, и на веб-сайте Virus Pathogen Resource (ViPR; который является публично доступным на

www.viprbrc.org/brc/vipr_genome_search.sp?method=SubmitForm&blockId=868&decorator=toga). В некоторых вариантах осуществления, модифицированный геном или срРНК WEEV является происходящим из WEEV штамма Imperial.

[0119] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению дополнительно включают одну или более экспрессирующих кассет. В принципе, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, могут, в общем, включать любое количество экспрессирующих кассет. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, могут включать по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть экспрессирующих кассет. Специалисту в данной области понятно, что термин «экспрессирующая кассета» относится к конструкции генетического материала, которая содержит кодирующие последовательности и достаточно регуляторной информации, чтобы управлять надлежащей транскрипцией и/или трансляцией кодирующих последовательностей в клетке, *in vivo* и/или *ex vivo*. Экспрессирующая кассета может быть вставлена в вектор для нацеливания на желательную клетку-хозяина и/или субъекта. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, термин экспрессирующая кассета может быть использован взаимозаменяемо с термином «экспрессирующая конструкция». В некоторых вариантах осуществления, термин «экспрессирующая кассета» относится к конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает ген, кодирующий белок или функциональную РНК, функционально связанный с регуляторными элементами, например, такими как промотор и/или сигнал терминации, и необязательно, любую из или комбинацию других последовательностей нуклеиновых кислот, влияющих на транскрипцию или трансляцию гена.

[0120] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет включает промотор, функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты. Соответственно, конструкции нуклеиновых кислот, в рамках изобретения, могут находить применение, например, в качестве экспрессирующего вектора, который, когда включает регуляторный элемент (например, промотор), функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, может влиять на экспрессию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет включает субгеномный (*с₂*) промотор, функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, *с₂* промотор представляет собой субгеномный промотор 26S. В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновых кислот 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: 16. 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: 17.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет включает кодирующую последовательность для представляющего интерес гена (GOI). В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI включает стоп-кодон, расположенный выше 3'-фланкирующего домена синтетической адаптерной молекулы. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI является оптимизированной по желательному свойству. Например, в некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI является оптимизированной для экспрессии на уровне, более высоком, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности. Применительно к оптимизации последовательности для нуклеотидных последовательностей, вырожденность генетического кода обеспечивает возможность замены по меньшей мере одного основания кодирующей белок последовательности гена на другое основание, не вызывая изменений аминокислотной последовательности полипептида, продуцированного с гена. Таким образом, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут также иметь любую последовательность оснований, которая была изменена из любой полинуклеотидной последовательности, описанной в настоящем описании, посредством замены, в соответствии с вырожденностью генетического кода. Ссылки, описывающие использование кодонов, являются легко доступными публично. В некоторых вариантах осуществления, варианты полинуклеотидной последовательности можно получать по множеству причин, например, для оптимизации экспрессии для конкретного хозяина (например, изменения использования кодонов в мРНК альфавируса на кодоны, предпочтительные для других организмов, таких как человек, нечеловекообразные приматы, хомяки, мыши или обезьяна). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI является оптимизированной для экспрессии в являющейся мишенью клетке-хозяине посредством использования кодонов, оптимизированных для экспрессии. Способы конструирования синтетических последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих GOI, с использованием предпочтительных кодонов, оптимальных для экспрессии в клетке-хозяине, можно определять посредством вычислительных способов, анализирующих общность использования кодонов для кодирования нативных белков для генома клетки-хозяина и их относительную распространенность, посредством способов, хорошо известных в данной области. Базу данных использования кодонов (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) можно использовать для получения оптимизированных по кодонному составу последовательностей в окружении клеток млекопитающих. Кроме

того, являются доступными множество инструментов программного обеспечения для перевода последовательностей из одного организма к оптимальному использованию кодонов для другого организма-хозяина, такие как JCat Codon Optimization Tool (www.jcat.de), Integrated DNA Technologies (IDT) Codon Optimization Tool (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) или Optimizer online codon optimization tool (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>). Такие синтетические последовательности могут быть сконструированы посредством способов, известных в данной области для конструирования синтетических молекул нуклеиновых кислот, и могут быть получены от множества коммерческих поставщиков. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI является оптимизированной для экспрессии на уровне, более высоком, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности, например, такой как кодирующая последовательность, которая не была подвергнута оптимизации кодонного состава. В некоторых вариантах осуществления, оптимизированная по кодонному составу последовательность GOI приводит к увеличению уровня экспрессии на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100%, по сравнению с эталонной кодирующей последовательностью, которая не была подвергнута оптимизации кодонного состава. В некоторых вариантах осуществления, оптимизированная по кодонному составу последовательность GOI приводит к увеличению уровня экспрессии по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза или по меньшей мере в 5 раз, по сравнению с эталонной кодирующей последовательностью которая не была подвергнута оптимизации кодонного состава.

[0122] Полипептид, закодированный посредством GOI, может, в общем, 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, который может представлять собой антитело, антиген, иммуномодулятор, фермент, передающий сигналы белок или цитокин. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать микробные белки, вирусные белки, бактериальные белки, грибковые белки, белки млекопитающих и комбинации любых из них. В некоторых вариантах осуществления, GOI кодирует предшественник гемагглютинина (HA) вируса гриппа A H5N1. Неограничивающие примеры GOI включают интерлейкины и взаимодействующие белки, включая: G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-10, IL-10-подобный, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-18BP, IL-1-like, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-20, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6-like, IL-7, IL-9, IL-21, IL-22, IL-33, IL-37, IL-38, LIF и OSM. Дополнительные подходящие GOI включают, но без ограничения, интерфероны (например, IFN- α , IFN- β , IFN- γ), TNF (например, CD154, LT- β , TNF- α , TNF- β , 4-1BBL,

APRIL, CD70, CD153, CD178, GITRL, LIGHT, OX40L, TALL-1, TRAIL, TWEAK и TRANCE), TGF- β (например, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3), гематопоетины (например, Epo, Tpo, Flt-3L, SCF, M-CSF, MSP), хемокины и их рецепторы (например, XCL1, XCL2, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 и CX3CL1), продукты иммуносупрессивных генов и родственные факторы транскрипции (например, PECAM1, FCGR3A, FOS, NFKB1, JUN, NIF1A, PD-L1, mTOR, STAT5B и STAT4). Дополнительные GOI, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, продукты иммуностимулирующих генов (например, CD27/CD70, CD40, CD40L, B7.1, BTLA, MAVS, OX40, OX40L, RIG-I и STING), устойчивые к лекарственному средству мутанты/варианты генов, таких как ABCB1, ABCC1, ABCG2, AKT1, ALK, BAFF, BCR-ABL, BRAF, CCND1, cMET, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERK2, ESR1, GRB2, KRAS, MDR1, MRP1, NTRK1, PDC4, P-gp, PI3K, PTEN, RET, ROS1, RSK1, RSK2, SHIP и STK11. Также GOI, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают последовательности, кодирующие вирусные белки, в частности, белки шипика, белки ворсинок, структурные белки и белки прикрепления.

[0123] В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать антитело или вариант антитела (например, одноцепочечный Fv, биспецифические молекулы, антитела верблюдовых, Fab и HCAb). В некоторых вариантах осуществления, антитело нацелено на поверхностные молекулы, ассоциированные с злокачественными опухолями или подвергнутые повышающей регуляции в них, или поверхностные молекулы, ассоциированные с инфекционным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, антитело нацелено на поверхностные молекулы, имеющие иммуностимулирующую функцию, или имеющие иммуносупрессивную функцию.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать фермент, недостаточность или мутация которого является ассоциированной с заболеваниями или состояниями здоровья, например, такой как, агалсидаза бета, агалсидаза альфа, имиглюцераза, талиглюцераза альфа, велаглюцераза альфа, алглюцераза, себелипаза альфа, ларонидаза, идурсульфаз, элосульфаз альфа, галсульфаз, алглюкозидаза альфа и CTFR.

[0125] В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать полипептид, выбранный из молекул антигенов, биотерапевтических молекул или комбинации любых из них. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать полипептид, выбранный из опухолеассоциированных антигенов, опухолеспецифических антигенов, неоантигенов и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать полипептид, выбранный из рецепторов эстрогенов, передающих внутриклеточные сигналы ферментов, и рецепторы эпидермального фактора роста человека. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать

биотерапевтический полипептид, выбранный из иммуномодуляторов, модуляторов ангиогенеза, модуляторов внеклеточного матрикса, модуляторов метаболизма, неврологических модуляторов и комбинаций любых из них. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать цитокин, выбранный из хемокинов, интерферонов, интерлейкинов, лимфокинов и факторов некроза опухоли. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать интерлейкины, выбранные из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, IL-35, IFN γ и субъединиц любых из них. В некоторых вариантах осуществления, GOI может кодировать биотерапевтический полипептид, выбранный из IL-12A, IL-12B, IL-1RA и комбинаций любых из них.

[0126] В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность GOI не содержит участок(ки) для рестрикционного фермента, используемого для линейаризации конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК (например, срРНК). В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может быть встроена в вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой одноцепочечный вектор, например, оцДНК-вектор или оцРНК-вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой двухцепочечный вектор, например, дцДНК-вектор или дцРНК-вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой плазмиду. Как более подробно описано ниже, вектор по настоящему изобретению можно получать с использованием технологии рекомбинантной ДНК, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации, амплификации по типу катящегося кольца (RCA), молекулярного клонирования и т.д., или химического синтеза. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой полностью синтетический вектор, например, полностью синтетический оцДНК вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой полностью синтетический дцДНК вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой продукт реакции ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению может представлять собой продукт реакции RCA. В некоторых вариантах осуществления, вектор может представлять собой вектор для доставки генов. В некоторых вариантах осуществления, вектор можно использовать в качестве переносчика для доставки генов, для переноса гена в клетку.

[0127] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный альфавирус, 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,

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: 24. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный альфавирус, 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: 25. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный альфавирус, 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: 27.

[0128] Последовательности нуклеиновых кислот, 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%) с последовательностью представляющего интерес модифицированного альфавируса, можно идентифицировать и/или выделять посредством использования последовательностей, идентифицированных в настоящем описании (например, SEQ ID NO: 3-27), или любых других, как они известны в данной области, посредством анализа последовательности генома, гибридизации и/или ПЦР с использованием вырожденных праймеров или геноспецифических праймеров, из последовательностей, идентифицированных в геноме соответствующего альфавируса.

[0129] Молекулярные технологии и способы, посредством которых эти новые конструкции нуклеиновых кислот были собраны и охарактеризованы, описаны более полно в настоящем описании в примерах настоящей заявки. В разделе примеры, вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус Синдбис (SINV), вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV) и вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEE) были использованы для иллюстрации композиций и способов, описанных в настоящем описании.

[0130] В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновых кислот представляют собой рекомбинантные молекулы нуклеиновых кислот. В рамках изобретения, термин рекомбинантный означает любую молекулу (например, ДНК, РНК, полипептид), которая происходит из, или возникает в результате, однако, опосредованно, человеческой манипуляции. В качестве неограничивающих примеров, кДНК представляет собой рекомбинантную молекулу ДНК, поскольку представляет собой любую молекулу нуклеиновой кислоты, которая была получена посредством реакции(й) полимеразы *in vitro*, или к которой были прикреплены линкеры, или которая была интегрирована в

вектор, такой как клонирующий вектор или экспрессирующий вектор. В качестве неограничивающих примеров, рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты: 1) была синтезирована или модифицирована *in vitro*, например, с использованием химических или ферментных способов (например, посредством использования химического синтеза нуклеиновых кислот, или посредством использования ферментов для репликации, полимеризации, экзонуклеолитического расщепления, эндонуклеолитического расщепления, лигирования, обратной транскрипции, транскрипции, модификации оснований (включая, например, метилирование) или рекомбинации (включая гомологичную и сайт-специфическую рекомбинацию) молекул нуклеиновых кислот; 2) включает соединенные нуклеотидные последовательности, которые не являются соединенными в природе; 3) была сконструирована с использованием способов молекулярного клонирования, таким образом, что она лишена одного или более нуклеотидов, по отношению к встречающейся в природе нуклеотидной последовательности; и/или 4) была подвергнута манипуляции с использованием способов молекулярного клонирования, таким образом, что она имеет одно или более изменений или реаранжировок последовательностей, по отношению к встречающейся в природе нуклеотидной последовательности.

[0131] В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновых кислот, описанные в настоящем описании, получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК (например, полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации, клонирования и т.д.) или химического синтеза. Молекулы нуклеиновых кислот, как описано в настоящем описании, включают природные молекулы нуклеиновых кислот и их гомологи, включая, но без ограничения, природные аллельные варианты и модифицированные молекулы нуклеиновых кислот, в которых один или более нуклеотидных остатков были вставлены, deletированы и/или заменены, таким образом, что такие модификации обеспечивают желательное свойство в осуществлении биологической активности, как описано в настоящем описании.

[0132] Молекулу нуклеиновой кислоты, включая вариант встречающейся в природе последовательности нуклеиновой кислоты, можно получать с использованием ряда способов, известных специалисту в данной области (см., например, Sambrook et al., In: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты можно модифицировать, по отношению к встречающейся в природе последовательности, из которой она происходит, с использованием множества способов, включая, но без ограничения, классические способы мутагенеза и способы рекомбинантной ДНК, такие как, но без ограничения, сайт-направленный мутагенез, химическая обработка молекулы нуклеиновой кислоты для индукции мутаций, расщепление рестрикционным ферментом фрагмента нуклеиновой кислоты, лигирование фрагментов нуклеиновых кислот, ПЦР амплификация и/или мутагенез избранных областей последовательности нуклеиновой кислоты, рекомбинационное клонирование, и химический синтез, включая химический

синтез смесей олигонуклеотидов и лигирование смешанных групп для «построения» смеси молекул нуклеиновых кислот, и их комбинации. Гомологи молекулы нуклеиновой кислоты могут быть выбраны из смеси модифицированных молекул нуклеиновых кислот посредством скрининга по функции белка или репликона (например, срРНК), кодированного молекулой нуклеиновой кислоты, и/или посредством гибридизации с геном дикого типа или его фрагментом, или посредством ПЦР с использованием праймеров, имеющих гомологию с мишенью, или молекулой или последовательностью нуклеиновой кислоты дикого типа.

В. Рекомбинантные клетки и культуры клеток

[0133] Как более подробно описано ниже, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к рекомбинантным клеткам, которые были сконструированы для включения конструкции нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, и/или включают (например, экспрессируют) конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, конструкцию нуклеиновой кислоты (например, вектор или срРНК) по настоящему изобретению можно вводить в клетку-хозяина для получения рекомбинантной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты и/или конструкцию срРНК. Например, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению можно вводить в клетку-хозяина например, такую как клетка яичников китайского хомяка (СНО), для получения рекомбинантной клетки, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты. Соответственно, прокариотические или эукариотические клетки, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, также представляют собой признаки настоящего изобретения. В родственном аспекте, некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем описании, относятся к способам трансформации клетки, включающей введение в клетку-хозяина, такую как клетка животного, конструкции нуклеиновой кислоты, в рамках изобретения, и затем отбор или скрининг трансформированной клетки. Введение конструкций нуклеиновых кислот (например, ДНК или РНК, включая мРНК) или векторов по настоящему изобретению в клетки можно осуществлять посредством способов, известных специалисту в данной области например, таких как вирусная инфекция, трансфекция, конъюгация, слияние протопластов, липофекция, электропорация, нуклеофекция, преципитация фосфатом кальция, опосредованная полиэтиленгликолем (PEG) трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном трансфекция, опосредованная липосомами трансфекция, технология пушки для частиц, прямая микроинъекция, опосредованная наночастицами доставка нуклеиновых кислот и т.п. Например, способы введения гетерологичных молекул нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих известны в данной области и включают опосредованную декстраном трансфекцию, преципитацию фосфатом кальция, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию молекул(ы) нуклеиновой кислоты в липосомы, технологию липидных наночастиц, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

[0134] В одном аспекте, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к рекомбинантным клеткам, например, рекомбинантным эукариотическим клеткам, например, клеткам животных, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем описании. Конструкция нуклеиновой кислоты может являться стабильно интегрированной в геном хозяина, или может являться эпизомно реплицирующейся, или присутствующей в рекомбинантной клетке-хозяине в форме миникольцевого экспрессирующего вектора для стабильной или временной экспрессии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, конструкция нуклеиновой кислоты поддерживается и реплицируется в рекомбинантной клетке-хозяине в форме эпизомной единицы. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты является стабильно интегрированной в геном рекомбинантной клетки. Стабильную интеграцию можно осуществлять с использованием классических способов случайной геномной рекомбинации или с использованием способов более точного геномного редактирования, таких как использование геномного редактирования посредством управляемой направляющей РНК CRISPR/Cas9 или посредством TALEN. В некоторых вариантах осуществления, конструкция нуклеиновой кислоты, присутствует в рекомбинантной клетке-хозяине в форме миникольцевого экспрессирующего вектора для стабильной или временной экспрессии.

[0135] Клетки-хозяева могут представлять собой либо нетрансформированные клетки, либо клетки, которые уже были трансфицированы с использованием по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева могут являться подвергнутыми генной инженерии (например, трансдуцированными или трансформированными, или трансфицированными) с использованием по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты.

[0136] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии представляющего интерес белка, как описано в настоящем описании, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем описании. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка по настоящему изобретению представляет собой прокариотическую клетку, такую как бактерия *E. coli*, или эукариотическую клетку, такую как клетка насекомого (например, клетка комара или клетка Sf21), или клетки млекопитающих (например, клетки COS, клетки NIH 3T3 или клетки HeLa). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, прокариотическая клетка представляет собой клетку *E. coli*. Например, представляющий интерес белок можно продуцировать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не являются необходимыми. После экспрессии, представляющий интерес белок можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимой фракции и можно далее очищать.

[0137] В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *in vivo*, например, рекомбинантная клетка в живом организме, например, клетка 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 субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *ex vivo*, например, была выделена, в форме индивидуальной клетки или в качестве части органа или ткани, из живого организма или организма, подлежащего лечению или процедуре, и затем возвращена в живой организм или организм. В некоторых вариантах осуществления, клетка присутствует *in vitro*, например, получена из хранилища.

[0138] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, рекомбинантная клетка по настоящему изобретению представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления, клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка животного представляет собой клетку млекопитающего. Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного белка могут происходить из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки насекомых.

[0139] Клетки позвоночных можно также использовать в качестве хозяев. В этом отношении, линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии, могут являться полезными. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного. В некоторых вариантах осуществления, клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетка животного представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка животного представляет собой клетку не относящегося к человеку животного. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку нечеловекообразного примата. Дополнительными примерами линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно использовать, являются линия клеток CV1 почки обезьяны, трансформированных SV40 (COS-7), линия клеток эмбриональной почки человека (например, клетки 293 или 293), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки Сертоли мыши (например, клетки TM4), клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HELA), клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы Буффало (BRL 3A), клетки

легкого человека (W138), клетки печени человека (Нер G2), клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ 060562), клетки TRI, клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие линии клеток-хозяев млекопитающих, которые можно использовать, включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включая DHFR– CHO клетки, и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0.

[0140] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки CHME5 человека, эпидермоидной клетки гортани человека, клетки фибробласта человека, клетки НЕК-293 человека, клетки HeLa человека, клетки НерG2 человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, клетки 3Т3 мыши, клетки соединительной ткани мыши, мышечной клетки мыши и клетки почки кролика.

[0141] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, рекомбинантная клетка представляет собой клетку насекомого, например, клетку из линии клеток насекомого. В некоторых вариантах осуществления, клетка насекомого представляет собой клетку Sf21. Дополнительные подходящие линии клеток насекомых включают, но без ограничения, линии клеток, полученные от насекомых отрядов Diptera, Lepidoptera и Hemiptera, и могут происходить из различных источников ткани. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка по настоящему изобретению представляет собой клетку из линии клеток чешуекрылого насекомого. В прошедшие несколько десятилетий, доступность линий клеток чешуекрылых насекомых увеличилась приблизительно на 50 линий за десятилетие. Больше информации, относительно доступных линии клеток чешуекрылых насекомых, можно обнаружить, например, в Lynn D.E., Available lepidopteran insect cell lines. *Methods Mol. Biol.* 2007;388:117-38, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантная клетка представляет собой клетку комара, например, клетку комара из видов внутри родов *Anopheles* (An.), *Culex* (Cx.) и *Aedes* (*Stegomyia*) (Ae.). Иллюстративные линии клеток комаров, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем описании, включают линии клеток из 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 линии клеток комаров включают, но без ограничения, 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 из линии клеток C6/26.

[0142] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к культурам клеток, включающим по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем

описании, и культуральную среду. Как правило, культуральная среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования клеток, описанных в настоящем описании. Способы трансформации широкого множества вышеупомянутых клеток и видов - хозяев известны в данной области и описаны в технической и научной литературе. Соответственно, культуры клеток, включающие по меньшей мере одну рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, также включены в объем настоящего изобретения. Способы и системы, подходящие для получения и поддержания культур клеток, известны в данной области.

В. Трансгенные животные

[0143] Настоящее изобретение также относится, в другом аспекте, к трансгенным животным, включающим конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании. 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 не относящееся к человеку млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления, трансгенное животное продуцирует рекомбинантную молекулу РНК, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, трансгенное животное продуцирует представляющий интерес белок, как описано в настоящем описании.

[0144] Трансгенных не относящихся к человеку животных-хозяев по настоящему изобретению получают с использованием стандартных способов, известных в данной области для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в геном не относящегося к человеку животного. В некоторых вариантах осуществления, не относящиеся к человеку животные по настоящему изобретению представляют собой нечеловекообразных приматов. Другие виды животных, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают животных, которые являются (i) подходящими для трансгенеза и (ii) способными к реаранжировке фрагментов генов иммуноглобулинов для получения ответа антител. Примеры таких видов включают, но без ограничения, мышей, крыс, хомяков, кроликов, кур, коз, свиней, овец и коров. Способы и методы для получения трансгенных не относящихся к человеку животных известны в данной области. Иллюстративные способы включают пронуклеарную микроинъекцию, микроинъекцию ДНК, опосредованный лентивирусным вектором перенос ДНК в ранние эмбрионы и опосредованный спермой трансгенез, опосредованное аденовирусом введение ДНК в сперму животного (например, у свиней), ретровирусные векторы (например, виды птиц), перенос ядер соматических клеток (например, у коз). Обзор уровня техники в получении трансгенных домашних сельскохозяйственных животных приведен в Niemann, H. et al. (2005) Rev. Sci. Tech. 24:285-298.

[0145] В некоторых вариантах осуществления, животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное. В некоторых вариантах осуществления, животное представляет собой субъекта-млекопитающего. В некоторых

вариантах осуществления, млекопитающее животное представляет собой не относящееся к человеку животное. В некоторых вариантах осуществления, млекопитающее животное представляет собой нечеловекообразного примата. В некоторых вариантах осуществления, трансгенных животных по настоящему изобретению можно получать с использованием классических способов случайной геномной рекомбинации или с использованием более точных способов, таких как геномное редактирование посредством управляемой направляющей РНК CRISPR/Cas, или геномное редактирование посредством направляемой ДНК эндонуклеазы с использованием NgAgo (Argonaute *Natronobacterium gregoryi*), или геномное редактирование посредством TALEN (подобных активаторам транскрипции эффекторных нуклеаз). В некоторых вариантах осуществления, трансгенные животные по настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии микроинъекции трансгена и не требуют использования технологии гомологичной рекомбинации, и таким образом, считаются более простыми для получения и отбора, чем для способов с использованием гомологичной рекомбинации.

[0146] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения рекомбинантной молекулы РНК, включающим (i) выращивание трансгенного животного, как описано в настоящем описании, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, как описано в настоящем описании, в таких условиях, что рекомбинантная молекула РНК продуцируется трансгенным животным или в рекомбинантной клетке.

[0147] В некоторых вариантах осуществления, трансгенное животное или рекомбинантная клетка включают конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, и при этом последовательность, кодирующую рекомбинантную молекулу РНК, необязательно, расщепляют посредством рестрикционного фермента, способного расщеплять участок рестрикции, сконструированный после конца последовательности, кодирующей поли(А)-хвост, для получения матрицы, которая кодирует РНК, имеющую только остатки аденилата в поли(А)-хвосте и 3'-конце. Соответственно, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным молекулам РНК, полученным, в соответствии со способом, описанным в настоящем описании.

[0148] В некоторых вариантах осуществления, трансгенное животное или рекомбинантная клетка включает конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, и при этом последовательность, кодирующая рекомбинантную молекулу РНК, содержит удлиненный поли(А)-хвост. Соответственно, настоящее изобретение также относится к рекомбинантным молекулам РНК, полученным, в соответствии со способом, описанным в настоящем описании.

[0149] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида, включающим (i) выращивание трансгенного животного, содержащего конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, включающей конструкцию нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем описании, в таких условиях, что полипептид, закодированный GOI, продуцируется трансгенным животным или в

рекомбинантной клетке. В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам получения представляющего интерес полипептида, включающим введение субъекту конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании. Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления способов по настоящему изобретению могут включать один или более из следующих признаков. 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 субъекта-человека. Соответственно, рекомбинантные полипептиды, полученные посредством способа, описанного в настоящем описании, также включены в объем настоящего изобретения.

[0150] Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления описанных способов получения рекомбинантного полипептида могут включать один или более из следующих признаков. В некоторых вариантах осуществления, способы получения рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению дополнительно включают выделение и/или очистку продуцированного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, способы получения полипептида по настоящему изобретению дополнительно включают структурную модификацию продуцированного полипептида для увеличения времени полужизни. В некоторых вариантах осуществления способов получения рекомбинантного полипептида, как описано в настоящем описании, N-конец продуцированного полипептида можно далее химически или ферментно модифицировать для увеличения времени полужизни. В некоторых вариантах осуществления, C-конец продуцированного полипептида является химически или ферментно модифицированным для увеличения времени полужизни. Неограничивающие примеры химических и ферментных модификаций, подходящих для способов, описанных в настоящем описании, включают пегилирование, связывание с XTEN, связывание с PAS®, связывание с ELP и связывание с НАР. Способы, системы и реагенты, подходящие для этих модификаций, известны в данной области. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, полипептид, продуцированный посредством способов, описанных в настоящем описании, можно пегилировать, связывать с XTEN, связывать с PAS, связывать с ELP и/или связывать с НАР для увеличения времени полужизни. В некоторых вариантах осуществления продуцированный полипептид конъюгируют с другим белком или пептидом (например, сывороточным альбумином, доменом Fc антитела, трансферрином, GLK или пептидом СТР) для увеличения времени полужизни.

D. Фармацевтические композиции

[0151] Конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению можно включать в композиции, включая фармацевтические композиции. Такие композиции, как правило, включают одно или более из конструкций нуклеиновых кислот (например, векторов или молекул срРНК), рекомбинантных клеток,

рекомбинантных молекул РНК, рекомбинантных полипептидов, описанных и представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель, например, носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют для предотвращения, лечения или управления течением нарушения здоровья, такого как иммунное заболевание или микробная инфекция. Например, композиции по настоящему изобретению можно формулировать в качестве профилактической композиции, терапевтической композиции или фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый наполнитель или их смесь. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют для применения в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют для применения в качестве адьюванта.

[0152] Соответственно, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим фармацевтически приемлемый наполнитель и: а) конструкцию нуклеиновой кислоты (например, вектор или молекулу срРНК) по настоящему изобретению; б) рекомбинантную клетку по настоящему изобретению; и/или с) рекомбинантный полипептид по настоящему изобретению.

[0153] 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 (например, вектор или молекулу срРНК), как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, включающим рекомбинантную клетку, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, включающим рекомбинантную молекулу РНК, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, композиции включают рекомбинантный полипептид, как описано в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот по настоящему изобретению (например, векторы или молекулы срРНК) можно использовать в голой форме или формулированными с носителем для доставки. Иллюстративные носители для доставки, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают, но без ограничения, липосомы (например, нейтральные или анионные липосомы), микросферы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), наночастицы на основе липидов (LNP), твердые липидные наночастицы (SLN), полиплексы, полимерные наночастицы, частицы вирусных репликонов (VRP) или носители, конъюгированные с биоактивными лигандами, которые могут способствовать доставке и/или усиливать иммунный ответ. Эти соединения являются легко доступными специалисту в данной области; например, см.

Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press (1990). Адъюванты, отличные от липосом и т.п., также используют, и они известны в данной области. Адъюванты могут защищать антиген (например, конструкции нуклеиновых кислот, векторы, молекулы сРНК) от быстрого распространения посредством их секвестрирования в локальном хранилище, или они могут содержать вещества, стимулирующие у хозяина секрецию факторов, которые являются хемотаксическими для макрофагов и других компонентов иммунной системы. Специалист в данной области может сделать подходящий выбор, например, из описанного ниже.

[0154] В некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению может включать одно или более из следующего: физиологического буфера, липосомы, наночастицы на основе липидов (LNP), твердой липидной наночастицы (SLN), полиплекса, полимерной наночастицы, частицы вирусного репликаона (VRP), микросферы, иммуностимулирующего комплекса (ISCOM), конъюгата биоактивного лиганда или комбинации любых из них.

[0155] Композицию по настоящему изобретению можно формулировать в таком формате, чтобы она являлась совместимой с предназначенным для нее способом введения, таким как липосома, наночастица на основе липидов (LNP) или полимерная наночастица. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению сформулированы в липосоме. В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению сформулированы в наночастице на основе липидов (LNP). LNP являются, как правило, менее иммуногенными, чем вирусные частицы. В то время как многие люди имеют предсуществующий иммунитет к вирусным частицам, не присутствует предсуществующий иммунитет к LNP. Кроме того, маловероятно возникновение адаптивного иммунного ответа против LNP, что позволяет повторяющееся дозирование LNP.

[0156] Липиды, подходящие для композиций и способов, описанных в настоящем описании, могут представлять собой катионные липиды, ионизируемые катионные липиды, анионные липиды или нейтральные липиды.

[0157] В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению может включать один или более ионизируемых липидов. В рамках изобретения, термин «ионизируемый липид» относится к липиду, который является катионным или становится ионизируемым (протонированным), по мере того, как pH снижается ниже pK_a ионизируемой группы липида, но является более нейтральным при более высоких значениях pH. При значениях pH ниже pK_a , липид затем является способным вступать в ассоциацию с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами (например, олигонуклеотидами). В рамках изобретения, термин «ионизируемый липид» включает липиды, которые приобретают положительный заряд при уменьшении pH ниже физиологического pH, и любой из ряда видов липидов, которые несут суммарный положительный заряд при селективном pH, таком как физиологический pH. Доказано, что постоянно катионные липиды, такие как DOTMA, являются слишком токсичными для

клинического применения. Ионизируемый липид может присутствовать в липидных составах, в соответствии с другими вариантами осуществления, предпочтительно, в соотношении от приблизительно 30 до приблизительно 70 моль%, в некоторых вариантах осуществления, приблизительно 30 моль%, в других вариантах осуществления, приблизительно 40 моль%, в других вариантах осуществления, приблизительно 45 моль% в других вариантах осуществления, приблизительно 47,5 моль% в других вариантах осуществления, приблизительно 50 моль%, в других вариантах осуществления и приблизительно 60 моль% в других («моль%» обозначает процент от общего количества молей, который составляет конкретный компонент). Термин «приблизительно» в этом абзаце обозначает диапазон плюс или минус 5 моль%. DODMA, или 1,2-диолеилокси-3-диметиламинопропан, представляет собой ионизируемый липид, как и DLin-MC3-DMA или 0-(Z, Z,Z, Z-гептатриаконта-6,9,26,29-тетраен-19-ил)-4-(N, N-диметиламино) («MC3»).

[0158] Иллюстративные ионизируемые липиды, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают липиды, описанные в Публикациях РСТ WO2020252589A1 и WO2021000041A1, Патентах США No. 8450298 и 10844028, и Love K.T. et al., Proc Natl Acad Sci USA, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869, полное содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает одно или более липидных соединений, описанных в Love K.T. et al. (2010 выше), таких как C16-96, C14-110 и C12-200. В некоторых вариантах осуществления, LNP включает ионизируемый катионный липид, выбранный из группы, состоящей из ALC-0315, C12-200, LN16, MC3, MD1, SM-102 и комбинации любых из них. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает C12-200 липид. Структура C12-200 липида известна в данной области и описана, например, в Патентах США No. 8450298 и 10844028, полное содержание которых, таким образом, приведено в настоящем описании в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления C12-200 комбинируют с холестерином, C14-PEG2000 и DOPE. В некоторых вариантах осуществления, C12-200 комбинируют с DSPC и DMG-PEG2000.

[0159] В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает один или более катионных липидов. Несколько различных ионизируемых катионных липидов были разработаны для использования в LNP. Подходящие катионные липиды включают, но без ограничения, 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. В одном типе LNP, группа GalNAc прикреплена к внешней части LNP и действует в качестве лиганда для поглощения в печень посредством асиалилгликопротеинового рецептора. Любой из этих катионных липидов можно использовать для формулировки LNP для доставки конструкций срРНК и конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению.

[0160] В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает один или более нейтральных липидов. Неограничивающие нейтральные липиды, подходящие для композиций и способов по настоящему изобретению, включают

DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. В некоторых вариантах осуществления, LNP по настоящему изобретению включает одно или более ионизируемых липидных соединений, описанных в Публикациях РСТ WO2020252589A1 и WO2021000041A1.

[0161] Ряд других липидов или комбинацию липидов, известных в данной области, можно использовать для получения LNP. Неограничивающие примеры липидов, подходящих для применения для получения LNP, включают DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DP γ PE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (PEG). Дополнительные неограничивающие примеры катионных липидов включают 98N12-5, C12-200, C14-PEG2000, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), ХТС, MD1, 7C1, и комбинацию любых из них. Дополнительные неограничивающие примеры нейтральных липидов включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Неограничивающие примеры модифицированных посредством PEG липидов включают PEG-DMG, PEG-CerC14, и PEG-CerC20.

[0162] В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет от приблизительно 100:1 до приблизительно 3:1, приблизительно от 70:1 до 10:1 или от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет приблизительно от 16:1 до 4:1. В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет приблизительно 20:1. В некоторых вариантах осуществления, массовое соотношение липида к нуклеиновой кислоте в системе доставки на основе LNP составляет приблизительно 8:1. В некоторых вариантах осуществления, наночастицы на основе липидов имеют средний диаметр менее чем приблизительно 1000 нм, приблизительно 500 нм, приблизительно 250 нм, приблизительно 200 нм, приблизительно 150 нм, приблизительно 100 нм, приблизительно 75 нм, приблизительно 50 нм или приблизительно 25 нм. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеют средний диаметр, лежащий в диапазоне приблизительно от 70 нм до 100 нм. В некоторых вариантах осуществления, LNP имеют средний диаметр, лежащий в диапазоне от приблизительно 88 нм до приблизительно 92 нм, от 82 нм до приблизительно 86 нм или от приблизительно 80 нм до приблизительно 95 нм.

[0163] В некоторых вариантах осуществления, композиции по настоящему изобретению формулируют в полимерной наночастице. В некоторых вариантах осуществления, композиции представляют собой иммуногенные композиции, например, композицию, которая может стимулировать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции формулируют в качестве вакцины. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции формулируют в качестве адьюванта. В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции формулируют в качестве биотерапевтического средства например, переносчика для генной доставки различных молекул с биоактивностью. Неограничивающие примеры биотерапевтических средств включают цитокины, хемокины и другие растворимые

иммуномодуляторы, ферменты, агонисты пептидов и белков, антагонисты пептидов и белков, гормоны, рецепторы, антитела и производные антител, факторы роста, факторы транскрипции, и молекулы для выключения/редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции формулируют в качестве адьюванта. В некоторых вариантах осуществления, композиции являются неиммуногенными или минимально иммуногенными (например, композиции, которые минимально стимулируют иммунный ответ у субъекта). В некоторых вариантах осуществления, неиммуногенные или минимально иммуногенные композиции формулируют в качестве биотерапевтического средства.

[0164] В некоторых вариантах осуществления, иммуногенные композиции являются по существу неиммуногенными для субъекта. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции формулируют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутрибрюшинного введения, внутримышечного введения, интратрахеального введения, внутриузлового введения, внутриопухолевого введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального введения, внутриглазного, ректального и перорального введения.

[0165] Фармацевтические композиции, подходящие для применения для инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EL™. (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). В этих случаях, композиция должна являться стерильной и должна являться текучей до той степени, чтобы существовала возможность простого введения через шприц. Она должна являться стабильной в условиях изготовления и хранения, и может быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), и их пригодные смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ, например, додецилсульфата натрия. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п.. Во многих случаях, является обычным включать изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и/или хлорид натрия, в композицию. Длительную абсорбцию пригодных для инъекции композиций можно осуществлять посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0166] Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством введения активного соединения в необходимом количестве в пригодный растворитель с одним или комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей фильтрацией стерилизацией. Как правило, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и необходимые ингредиенты, отличные от перечисленных выше.

[0167] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции по настоящему изобретению формулируют для ингаляции, такие как аэрозоль, спрей, туман, жидкость или порошок. Введение посредством ингаляции можно проводить в форме либо сухих порошков, либо аэрозольных составов, которые вводят путем ингаляции субъекту (например, пациенту) посредством использования любого устройства для ингаляции, например, микрораспылителя, находящегося под давлением дозирующего ингалятора или небулайзера.

[0168] В некоторых вариантах осуществления, композицию формулируют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутримышечного введения, внутриузловое введение, внутривенного введения, внутрибрюшинного введения, перорального введения, интравагинального, внутриопухолевого введения, подкожного введения, внутрисуставного введения или интракраниального введения. В некоторых вариантах осуществления, введенная композиция приводит к модулированной (например, увеличенной или уменьшенной) продукции интерферона у субъекта.

СПОСОБЫ ПО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0169] Введение любой из терапевтических композиций, описанных в настоящем описании, например, конструкций нуклеиновых кислот (например, векторов или молекул срРНК), рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, можно использовать в лечении и/или предотвращении соответствующих нарушений здоровья, таких как пролиферативные нарушения (например, злокачественные опухоли), инфекционные заболевания (например, острые инфекции, хронические инфекции, или вирусные инфекции), редкие заболевания и/или аутоиммунные заболевания, и/или воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот (например, векторы или конструкции срРНК), рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем описании, можно использовать для модуляции, например, вызова или супрессии, иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот (например, векторы или молекулы срРНК), рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем описании, можно включать в лекарственные средства для применения в способах лечения субъекта, который имеет, который, как подозревают, имеет, или который может быть подвержен

высокому риску развития одного или более соответствующих нарушений здоровья или заболеваний. Иллюстративные нарушения здоровья или заболевания могут включать, без ограничения, злокачественные опухоли, иммунные заболевания, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, генотерапию, замещение гена, сердечно-сосудистые заболевания, связанные с возрастом патологии, редкое заболевание, острую инфекцию и хроническую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой пациента под наблюдением терапевта.

[0170] Примеры аутоиммунных заболеваний, подходящих для способов по настоящему изобретению включают, но без ограничения, ревматоидный артрит, остеоартрит, болезнь Стилла, семейную средиземноморскую лихорадку, системную склеродермию, рассеянный склероз, анкилозирующий спондилит, тиреоидит Хашимото, системную красную волчанку, синдром Шегрена, диабетическую ретинопатию, диабетическую васкулопатию, диабетическую невралгию, инсулит, псориаз, очаговую алопецию, тепловую и холодовую аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), пернициозную анемию, острые воспалительные заболевания, аутоиммунный адреналит, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию (CIDP), синдром Ламберта-Итона, склероатрофический лишай, болезнь Лайма, болезнь Грэйвса, болезнь Бехчета, болезнь Меньера, реактивный артрит (синдром Рейтера), синдром Черджа-Стросс, синдром Когана, синдром CREST, обыкновенную пузырчатку и эксфолиативную пузырчатку, буллезный пемфигоид, ревматическую полимиалгию, полимиозит, первичный билиарный цирроз, панкреатит, перитонит, псориатический артрит, ревматическую атаку, саркоидоз, синдром Шегрена, склеродермию, глютенчувствительную целиакию, синдром мышечной скованности, артериит Такаюсу, временную непереносимость глютена, аутоиммунный увеит, витилиго, полихондрит, герпетиформный дерматит (DH) или болезнь Дюринга, фибромиалгию, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, аутоиммунный гепатит, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, миастению гравис, болезни иммунных комплексов, гломерулонефрит, узелковый полиартериит, антифосфолипидный синдром, полигландулярный аутоиммунный синдром, идиопатический пульмонарный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), крапивницу, аутоиммунное бесплодие, ювенильный ревматоидный артрит, саркоидоз и аутоиммунную кардиомиопатию.

[0171] Неограничивающие примеры инфекции, подходящей для способов по настоящему изобретению, включают инфекции вирусами, такими как вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), цитомегаловирус (CMV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), папилломавирус человека (HPV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV2), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), вирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS), вирус гриппа и вирус Эбола. Дополнительные инфекции, подходящие для способов по

настоящему изобретению, включают инфекции внутриклеточными паразитами, такими как *Leishmania*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Plasmodium*, *Brucella*, микобактерии, *Listeria*, *Toxoplasma* и *Trypanosoma*.

[0172] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот (например, векторы или молекулы *ср*РНК), рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции можно использовать в лечении и/или предотвращении иммунных заболеваний, аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, например, таких как гломерулонефрит, воспалительное заболевание кишечника, нефрит, перитонит, псориазический артрит, остеоартрит, болезнь Стилла, семейная средиземноморская лихорадка, системные склеродермия и склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, острое повреждение легких, менингит, энцефалит, увеит, множественная миелома, гломерулонефрит, нефрит, астма, атеросклероз, нарушение адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, диабет с ювенильным началом, болезнь Рейтера, болезнь Бехчета, нефрит иммунных комплексов, IgA-нефропатия, IgM-полиневропатии, иммуноопосредованные тромбоцитопении, гемолитическая анемия, миастения, волчаночный нефрит, волчаночный эритематоз, ревматоидный артрит (RA), анкилозирующий спондилит, пемфигус, болезнь Грэйвса, тиреоидит Хашимото, васкулит мелких сосудов, синдром Оменна, хроническая почечная недостаточность, аутоиммунный тиреоидит, острый инфекционный мононуклеоз, HIV, ассоциированные с вирусом герпеса заболевания, человеческие вирусные инфекции, инфекция коронавируса, другим энтеровирусом, вирусом герпеса, вирусом гриппа, вирусом парагриппа, респираторно-синцитиальным вирусом или аденовирусом, бактериальная пневмония, ранения, сепсис, церебральный инсульт/церебральный отек, ишемически-реперфузионное повреждение и гепатит С.

[0173] Неограничивающие примеры воспаления, подходящего для способов по настоящему изобретению, включают воспалительные заболевания, такие как астма, воспалительное заболевание кишечника (IBD), хронический колит, спленомегалия и ревматоидный артрит.

[0174] Соответственно, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способам модуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту композиции, включающей одно или более из следующего: а) конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению; б) рекомбинантной молекулы РНК по настоящему изобретению; в) рекомбинантной клетки по настоящему изобретению; г) рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению; и е) фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

[0175] В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способам предотвращения и/или лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта, включающим профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, включающей одно или более из следующего: а) конструкции нуклеиновой кислоты по

настоящему изобретению; b) рекомбинантной молекулы РНК по настоящему изобретению; c) рекомбинантной клетки по настоящему изобретению; d) рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению; и e) фармацевтической композиции любого по настоящему изобретению.

[0176] В некоторых вариантах осуществления, нарушение здоровья представляет собой пролиферативное нарушение или микробную инфекцию (например, бактериальную инфекцию, микрогрибковую инфекцию или вирусную инфекцию). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или, как подозревают, имеет состояние, ассоциированное с пролиферативным нарушением или микробной инфекцией (например, бактериальной инфекцией, микрогрибковой инфекцией или вирусной инфекцией).

[0177] В некоторых вариантах осуществления, нарушение здоровья представляет собой редкое заболевание, например, заболевание или состояние, поражающее менее, чем 200000 человек в США, как определено в The Orphan Drug Act (www.fda.gov/patients/rare-diseases-fda), и/или воспалительное и/или аутоиммунное нарушение. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или, как подозревают, имеет состояние, ассоциированное с воспалительным и/или аутоиммунным нарушением, и/или редким заболеванием (например, включая, но без ограничения, семейную средиземноморскую лихорадку или болезнь Стилла с началом во взрослом возрасте).

[0178] В некоторых вариантах осуществления, описанную композицию формулируют таким образом, чтобы она являлась совместимой с предназначенным для нее способом введения. Например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально или посредством ингаляции, но более вероятно, что их будут вводить посредством парентерального способа. Примеры парентеральных способов введения включают, например, внутривенное, внутриузловое, внутрикожное, внутриопухолевое, внутрисуставное, подкожное, чрескожное (местное) введение, введение через слизистые оболочки, интравагинальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, 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 средства для доведения тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. рН можно доводить с использованием кислот или оснований, таких как одно- и/или двухосновный фосфат натрия, соляная кислота или гидроксид натрия (например, до рН приблизительно 7,2-7,8, например, 7,5). Парентеральный препарат можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для множественных доз, изготовленные из стекла или пластика.

[0179] Дозировку, токсичность и терапевтическую эффективность таких рассматриваемых конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно определять посредством стандартных фармацевтических способов в культурах клеток или у экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной в 50% популяции). Соотношение доз, оказывающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс, и его можно выражать как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, имеющие высокие терапевтические индексы, как правило, являются подходящими. В то время как можно использовать соединения, оказывающие токсичные побочные эффекты, следует принимать меры для разработки системы доставки, нацеливающей такие соединения на участок пораженной ткани, чтобы минимизировать потенциальное разрушение неинфицированных клеток и, таким образом, уменьшать побочные эффекты.

[0180] Например, данные, полученные в результате анализов культур клеток и исследований на животных, можно использовать при составлении диапазона доз для применения у человека. Дозы таких соединений, как правило, находятся в рамках диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозу можно менять в рамках этого диапазона, в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого способа введения. Для любого соединения, используемого в способе по настоящему изобретению, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценивать по результатам анализов в культуре клеток. Дозу можно составлять в моделях на животных для достижения диапазона циркулирующих концентраций в плазме, включающего IC₅₀ (например, концентрацию тестируемого соединения, для которой достигают половины максимального ингибирования симптомов), как определено в культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно использовать у человека. Уровни в плазме можно измерять, например, посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0181] Терапевтические композиции, описанные в настоящем описании, например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, можно вводить от одного или более раз в сутки до одного или более раз в неделю; включая один раз на каждые вторые сутки. Специалисту в данной области понятно, что конкретные факторы могут влиять на дозировку и расписание, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, но без ограничения, тяжесть заболевания, виды предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, и другие присутствующие заболевания. Кроме того, лечение субъекта с использованием терапевтически эффективного количества рассматриваемых мультивалентных полипептидов и мультивалентных антител по настоящему изобретению может включать однократное

лечение или может включать серию процедур лечения. В некоторых вариантах осуществления, композиции вводят каждые 8 часов в течение пяти суток, с последующим периодом отдыха 2-14 суток, например, 9 суток, с последующими дополнительными пятью сутками введения каждые 8 часов. Применительно к конструкциями нуклеиновых кислот, рекомбинантным молекулам РНК и рекомбинантным полипептидам, терапевтически эффективное количество конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантной молекулы РНК или рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению (например, эффективная доза) зависит от выбранных конструкции нуклеиновой кислоты, рекомбинантной молекулы РНК, или рекомбинантного полипептида. Например, можно вводить количества однократной 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, одно, два, три, четыре или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК или рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению можно использовать в комбинации.

[0182] Как обсуждали *выше*, терапевтически эффективное количество, в некоторых вариантах осуществления, может представлять собой количество терапевтической композиции, которое может являться достаточным для оказания конкретного эффекта при введении субъекту, такому как субъект, который имеет, как подозревают, имеет, или подвержен риску развития нарушения здоровья, например, заболевания или инфекции. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество включает количество, достаточное для предотвращения или замедления развития симптома заболевания или инфекции, изменения течения симптома заболевания или инфекции (например, но без ограничения, замедления прогрессирования симптома заболевания или инфекции), или обращения симптома заболевания или инфекции. Понятно, что в любом данном случае, соответствующее эффективное количество может определять специалист в данной области с использованием общепринятых экспериментов.

[0183] Эффективность лечения, включающего описанную терапевтическую композицию, для лечения заболевания или инфекции может определять клинический специалист в данной области. Однако, лечение считают эффективным лечением, если по меньшей мере любой один или все из признаков или симптомов заболевания или инфекции улучшаются или облегчаются. Эффективность можно также измерять по отсутствию ухудшения у индивидуума, как оценено по госпитализации или необходимости медицинских вмешательств (например, прогрессирование заболевания или инфекции прекращается, или по меньшей мере замедляется). Способы измерения этих показателей известны специалисту в данной области и/или описаны в настоящем описании. Лечение включает любое лечение заболевания или инфекции у субъекта или у животного (некоторые неограничивающие примеры включают человека или млекопитающего) и включает: (1) ингибирование заболевание или инфекции, например, остановку, или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение заболевания

или инфекции, например, вызов регрессии симптомов; и (3) предотвращение или уменьшение вероятности развития симптомов.

[0184] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель, и в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа. В общем, субъекта можно иммунизировать посредством начальных серий инъекций (или введения посредством одного из других способов, описанных ниже) и впоследствии, проводить бустер-инъекции для увеличения защиты, достигнутой посредством исходных серий введений. Начальные серии инъекций и последующие бустер-инъекции вводят в таких дозах и на протяжении такого периода времени, какие являются необходимыми для стимуляции иммунного ответа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, введенная композиция приводит к увеличению продукции интерферона у субъекта на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100%, по сравнению с продукцией интерферона у субъекта, которому не вводили композицию. В некоторых вариантах осуществления описанных способов, 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 субъекта-человека.

[0185] Как описано выше, фармацевтически приемлемые носители, подходящие для пригодного для инъекции применения, включают стерильные водные растворы (когда являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. В этих случаях, композиция должна являться стерильной и должна являться текучей до той степени, чтобы существовала возможность простого введения через шприц. Композиция должна, кроме того, являться стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.д.), их пригодные смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, асорбиновой кислоты, тимеросала и т.п.

[0186] Стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать посредством введения конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток и/или рекомбинантных полипептидов в необходимом количестве в пригодный растворитель с одним или комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей фильтрацией стерилизацией.

[0187] Когда конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, как описано в настоящем описании, подходящим образом защищены, как описано выше, их можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или усваиваемым съедобным носителем. Конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции и другие ингредиенты можно также заключать в капсулу с твердой или мягкой желатиновой оболочкой, спрессовывать в таблетки или вводить непосредственно в диету индивидуума. Для перорального терапевтического введения, активное соединение можно включать в наполнители и использовать в форме проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, лепешек, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п..

[0188] В некоторых вариантах осуществления, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные молекулы РНК и рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению можно доставлять в клетку или субъекту посредством наночастицы на основе липидов (LNP). В то время как многие люди имеют предсуществующий иммунитет к вирусным частицам, не присутствует предсуществующий иммунитет к LNP. Кроме того, маловероятно возникновение адаптивного иммунного ответа против LNP, что позволяет повторяющееся дозирование LNP.

[0189] Несколько различных ионизируемых катионных липидов были разработаны для использования в LNP. Неограничивающие примеры ионизируемых катионных липидов включают C12-200, MC3, LN16 и MD1, среди прочих. Например, в одном типе LNP, группа GalNAc прикреплена к внешней части LNP и действует в качестве лиганда для поглощения в печень посредством асиалилгликопротеинового рецептора. Любой из этих катионных липидов можно использовать для формулировки LNP для доставки конструкций нуклеиновых кислот и рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению в печень.

[0190] В некоторых вариантах осуществления, LNP относится к любой частице, имеющей диаметр менее чем 1000 нм, 500 нм, 250 нм, 200 нм, 150 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм или 25 нм. Альтернативно, наночастица может иметь размер в диапазоне от 1 до 1000 нм, 1-500 нм, 1-250 нм, 25-200 нм, 25-100 нм, 35-75 нм или 25-60 нм.

[0191] LNP можно изготавливать из катионных, анионных или нейтральных липидов. Нейтральные липиды, такие как фузогенный фосфолипид DOPE или компонент мембраны холестерин, можно включать в LNP в качестве «липидов-помощников» для усиления активности трансфекции и стабильности наночастиц. Ограничения катионных

липидов включают низкую эффективность, приписываемую плохой стабильности и быстрому клиренсу, так же как вызов воспалительных или противовоспалительных ответов. LNP могут также содержать гидрофобные липиды, гидрофильные липиды, или как гидрофобные, так и гидрофильные липиды.

[0192] 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-DPPE, 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 модифицированных посредством PEG липидов являются: PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

[0193] В некоторых вариантах осуществления, липиды можно комбинировать в любом количестве молярных соотношений для получения LNP. Кроме того, полинуклеотид(ы) можно комбинировать с липидом(ами) в широком диапазоне молярных соотношений для получения LNP.

[0194] В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции, описанные в настоящем описании, например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, включают в терапевтические композиции для применения в способах предотвращения или лечения для субъекта, который имеет, который, как подозревают, имеет, или который может быть подвержен высокому риску развития злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания и/или инфекции.

[0195] В некоторых вариантах осуществления, терапевтические композиции, описанные в настоящем описании, например, конструкции нуклеиновых кислот, рекомбинантные клетки, рекомбинантные молекулы РНК, рекомбинантные полипептиды и/или фармацевтические композиции, включают в терапевтические композиции для применения в способах предотвращения или лечения, для субъекта, который имеет, который, как подозревают, имеет, или который может быть подвержен высокому риску 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 виды терапии

[0196] В некоторых вариантах осуществления, композицию, в соответствии с настоящим изобретением, вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в комбинации с по меньшей мере одним из видов дополнительной терапии (например, второй терапии). В некоторых вариантах осуществления, вторая терапия выбрана из группы, состоящей из

химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсином, направленной терапии и хирургии. В некоторых вариантах осуществления, вторая терапия выбрана из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсином или хирургии. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию и вторую терапию проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию проводят в то же самое время, что и вторую терапию. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию и вторую терапию проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления, первую терапию проводят до второй терапии. 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 проводят поочередно. В некоторых вариантах осуществления, первое терапевтическое средство и второе терапевтическое средство вводят совместно в одном составе.

НАБОРЫ

[0197] Также настоящее изобретение относится к различным наборам для практического осуществления способа, описанного в настоящем описании, так же как к письменным инструкциям для их получения и применения. В частности, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к наборам для модуляции иммунного ответа у субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для предотвращения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта. Некоторые другие варианты осуществления относятся к наборам для способов лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к наборам, включающим одно или более из конструкций нуклеиновых кислот (например, векторов и молекул срРНК), рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, как представлено и описано в настоящем описании, так же как письменные инструкции для их получения и применения.

[0198] В некоторых вариантах осуществления, наборы по настоящему изобретению дополнительно включают одно или более средств, которые можно использовать для введения любого из представленных конструкций нуклеиновых кислот (например, векторов и молекул срРНК), рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК, 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), используемых для введения любого из представленных конструкций нуклеиновых кислот (например, векторов и молекул срРНК), рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций субъекту. В некоторых вариантах осуществления, набор может включать одно или более

дополнительных лекарственных средств, которые можно вводить одновременно или последовательно с другими компонентами набора для желательной цели, например, для диагностики, предотвращения или лечения состояния у нуждающегося в этом субъекта.

[0199] 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 разведения, буферов для промывки, контрольных реагентов, контрольных экспрессирующих векторов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов, реагентов, подходящих для продукции *in vitro* представленных конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

[0200] В некоторых вариантах осуществления, компоненты набора могут находиться в отдельных контейнерах. В некоторых других вариантах осуществления, компоненты набора могут содержаться в одном контейнере. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, набор включает одно или более из конструкций нуклеиновых кислот (например, векторов и молекул *ср*РНК), рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК, рекомбинантных полипептидов и/или фармацевтических композиций, как представлено и описано в настоящем описании, в одном контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе), и дополнительное лекарственное средство в другом контейнере (например, в стерильном стеклянном или пластиковом флаконе).

[0201] В другом варианте осуществления, набор включает комбинацию композиций, описанных в настоящем описании, включающих одно или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК и/или рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению, в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, формулированную совместно, необязательно, в фармацевтической композиции, в одном общем контейнере.

[0202] Если набор включает фармацевтическую композицию для парентерального введения субъекту, набор может включать устройство (например, устройство для инъекции или катетер) для проведения такого введения. Например, набор может включать одну или более гиподермических игл или других устройств для инъекции, как обсуждали выше, содержащих одно или более из конструкций нуклеиновых кислот, рекомбинантных клеток, рекомбинантных молекул РНК и/или рекомбинантных полипептидов по настоящему изобретению.

[0203] В некоторых вариантах осуществления, набор может дополнительно включать инструкции для использования компонентов набора для практического осуществления способов, описанных в настоящем описании. Например, набор может включать вкладыш в упаковку, включающий информацию относительно фармацевтических композиций и лекарственных форм в наборе. Как правило, такая

информация помогает пациентам и терапевтам, чтобы использовать вложенные фармацевтические композиции и лекарственные формы эффективно и безопасно. Например, следующая информация относительно комбинации по настоящему изобретению может быть предоставлена на вкладыше: фармакокинетика, фармакодинамика, клинические исследования, параметры эффективности, показания и применение, противопоказания, предупреждения, меры предосторожности, неблагоприятные реакции, передозировка, правильные дозировка и введение, форма выпуска, надлежащие условия хранения, ссылки, информация о производителе/поставщике и патентная информация.

[0204] Инструкции для практического осуществления способов, как правило, записывают на подходящей среде для записи. Например, инструкции могут быть напечатаны на субстрате, таком как бумага или пластик, и т.д. Инструкции могут быть представлены в наборе в форме вкладыша в упаковку, на этикетке контейнера набора или его компонентов (например, связанные с упаковкой или внутренней упаковкой) и т.д. Инструкции могут быть представлены в форме файла электронного хранения данных, присутствующего на подходящей машиночитаемой среде для хранения информации, например, CD-ROM, дискете, флэш-накопителе и т.д. В некоторых случаях, действующие инструкции не присутствуют в наборе, однако, могут быть предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через интернет). Примером этого варианта осуществления является набор, включающий веб-адрес, по которому инструкции можно просматривать и/или с которого инструкции можно скачивать. Как и в случае инструкций, эти средства для получения инструкций могут быть записаны на подходящем субстрате.

[0205] Полное содержание всех публикаций и патентных заявок, упомянутых в настоящем описании, приведено в настоящем описании в качестве ссылки, в такой же степени, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что содержание каждой индивидуальной публикации или патентной заявки приведено в качестве ссылки.

[0206] Не делают допущения, что какая-либо ссылка, процитированная в настоящем описании, составляет известный уровень техники. В обсуждении ссылок указано, что их утверждают их авторы, и заявитель сохраняет право оспаривать правильность и применимость процитированных документов. Следует ясно понимать, что, хотя в настоящем описании приведены ссылки на ряд источников информации, включая статьи в научных журналах, патентные документы и руководства; эта ссылка не составляет допущения, что какой-либо из этих документов составляет часть общедоступного известного уровня техники в данной области.

[0207] Обсуждение общих способов, приведенное в настоящем описании, предназначено только для целей иллюстрации. Другие альтернативные способы и альтернативы станут очевидными специалисту в данной области при просмотре этого описания, и должны быть включены в содержание и сферу действия настоящего изобретения.

[0208] Дополнительные варианты осуществления более подробно описаны в следующих примерах, которые представлены с целью иллюстрации и никаким образом не предназначены для ограничения настоящего описания или формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0209] В практическом осуществлении настоящего изобретения можно использовать, если не указано иное, общепринятые способы молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, которые хорошо известны специалисту в данной области. Такие способы полностью объяснены в литературе, такой как 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 обозначенные в настоящем описании как «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., содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0210] Дополнительные варианты осуществления более подробно описаны в следующих примерах, которые представлены с целью иллюстрации и никаким образом не предназначены для ограничения настоящего описания или формулы изобретения.

ПРИМЕР 1

Конструирование модифицированных альфавирусных векторов

[0211] В этом примере описаны результаты экспериментов, проведенных для конструирования ряда базовых альфавирусных векторов (например, без гетерологичного гена), которые впоследствии использовали для экспрессии представляющего интерес гена (например, гена гемагглютинаина (НА) из вируса гриппа).

[0212] Пустой вектор VEE с универсальным адаптером (**ФИГ. 2А**) конструировали посредством ПЦР амплификации с репликона VEE TC-83 (Genbank L01443), фланкированного 5'-промотором РНК-полимеразы бактериофага Т7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 28) и 3'-поли(А) из 38 остатков, за которым следовала терминаторная последовательность Т7 (5'-

ААССССТСТСТАААСGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 29), за которым следовал нижестоящий участок NotI, в осто́ве плазмиды pYL, с использованием синтетического прямого праймера, содержащего универсальную адаптерную последовательность, содержащую участок SpeI (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTACTAGTGACCGCTACGCCCCAATGACC CGACCAGC-3'), и синтетического обратного праймера, для получения продукта ПЦР с 30 п.о. гомологии на концах, и циркуляризовали посредством способа сборки по Гибсону Gibson Assembly®. Молчащую мутацию A2087G вводили для уничтожения участка SpeI в nsP2. Этот продукт имеет универсальный адаптер вместо структурного гена. Синтетический фрагмент ДНК с фланкирующими гомологичными 30 п.о., содержащий участок SapI ниже поли(A), с гомологичными концами из 30 п.о., вставляли в продукт, линейаризованный посредством расщепления с использованием SpeI и NotI, для получения конечного вектора.

[0213] Пустой вектор CHIKV S27 с универсальным адаптером (**ФИГ. 2B**) конструировали посредством ПЦР амплификации с репликона CHIKV S27 (Genbank AF369024), фланкированного 5'-промотором РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 28) и 3'-поли(A) из 37 остатков, за которым следовала терминаторная последовательность T7 (5'-ААССССТСТСТАААСGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 29), за которым следовал нижестоящий участок NotI, в осто́ве плазмиды pYL, с использованием синтетического прямого праймера, содержащего универсальную адаптерную последовательность, содержащую участок SpeI (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTACTAGTGACCGCTACGCCCCAATGACC CGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 20), и синтетического обратного праймера, для получения продукта ПЦР с 30 п.о. гомологии на концах, и циркуляризовали посредством способа Gibson Assembly®. Этот продукт имеет универсальный адаптер вместо структурного гена. Синтетический фрагмент ДНК с фланкирующими гомологичными 30 п.о., содержащий участок SapI ниже поли(A), с гомологичными концами из 30 п.о., вставляли в продукт, линейаризованный посредством расщепления с использованием SpeI и NotI, для получения конечного вектора.

[0214] Пустой вектор CHIKV DRDE с универсальным адаптером (**ФИГ. 2C**) конструировали посредством ПЦР амплификации с репликона CHIKV DRDE (Genbank EF210157) с 3'-UTR CHIKV S27 (Genbank AF369024) фланкированного 5'-промотором РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 28) и 3'-поли(A) из 37 остатков, за которым следовала терминаторная последовательность T7 (5'-ААССССТСТСТАААСGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 29), за которым следовал нижестоящий участок NotI, в осто́ве плазмиды pYL, с использованием синтетического прямого праймера, содержащего универсальную адаптерную последовательность, содержащую участок SpeI (5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTACTAGTGACCGCTACGCCCCAATGACC

CGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 20), и синтетического обратного праймера, для получения продукта ПЦР с 30 п.о. гомологии на концах, и циркуляризовали посредством способа Gibson Assembly®. Этот продукт имеет универсальный адаптер вместо структурного гена. Синтетический фрагмент ДНК с гомологичными концами из 30 п.о., содержащий участок SapI ниже поли(A), с 30 п.о. гомологии, вставляли в продукт, линейаризованный посредством расщепления с использованием SpeI и NotI, для получения конечного вектора.

[0215] Пустой вектор EEEV FL93-939 с универсальным адаптером (**ФИГ. 2D**) конструировали посредством ПЦР амплификации с репликона EEEV FL93-939 (Genbank EF151502), фланкированного 5'-промотором РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 28) и 3'-поли(A) из 37 остатков, за которым следовала терминаторная последовательность T7 (5'-ААССССТСТСТАААСGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 29), за которым следовал нижестоящий участок NotI, в остове плазмиды pYL, с использованием синтетического прямого праймера, содержащего универсальную адаптерную последовательность, содержащую участок SpeI (5'-СТGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACСТАCTAGTGACCGCTACGССССААТGACC CGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 20) и синтетического обратного праймера, для получения продукта ПЦР с 30 п.о. гомологии на концах, и циркуляризовали посредством способа Gibson Assembly®. Молчащую мутацию A3550C вводили для уничтожения участка SpeI в nsP2. Молчащие мутации G301A, G4516A, и G7399 вводили для уничтожения участков SapI в nsP1, nsP3 и nsP4, соответственно. Этот продукт имеет универсальный адаптер вместо структурного гена. Синтетический фрагмент ДНК с гомологичными концами из 30 п.о., содержащий участок SapI ниже поли(A), с 30 п.о. гомологии, вставляли в продукт, линейаризованный посредством расщепления с использованием SpeI и NotI, для получения конечного вектора.

[0216] Пустой вектор SINV Girdwood с универсальным адаптером (SEQ ID NO: 27) (**ФИГ. 2E**) конструировали посредством ПЦР амплификации с репликона SINV Girdwood (Genbank MF459683), фланкированного 5'-промотором РНК-полимеразы бактериофага T7 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГ-3'; SEQ ID NO: 28) и 3'-поли(A) из 37 остатков, за которым следовала терминаторная последовательность T7 (5'-ААССССТСТСТАААСGGAGGGGTTTTTTT-3'; SEQ ID NO: 29), за которым следовал нижестоящий участок NotI, в остове плазмиды pYL, с использованием синтетического прямого праймера, содержащего универсальную адаптерную последовательность, содержащую участок SpeI (5'-СТGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACСТАCTAGTGACCGCTACGССССААТGACC CGACCAGC-3'; SEQ ID NO: 20), и синтетического обратного праймера, для получения продукта ПЦР с 30 п.о. гомологии на концах, и циркуляризовали посредством способа Gibson Assembly®. Этот продукт имеет универсальный адаптер вместо структурного гена. Молчащую мутацию A5420G вводили для уничтожения участка SapI в Girdwood nsP3.

Синтетический фрагмент ДНК с гомологичными концами из 30 п.о., содержащий участок SapI ниже поли(А), с 30 п.о. гомологии, вставляли в продукт, линеаризованный посредством расщепления с использованием SpeI и NotI, для получения конечного вектора.

[0217] Химерные пустые векторы SINV AR86-Girdwood с универсальными адаптерами (ФИГ. 2F-I) конструировали посредством ПЦР амплификации пустого вектора SINV Girdwood (ФИГ. 2E) для получения продуктов с 30 п.о. концами, гомологичными продуктам ПЦР, амплифицированным с последовательности AR86 (Genbank U38305). Фрагменты комбинировали посредством способа Gibson Assembly® для получения конечных векторов. Для химеры 1 (ФИГ. 2F), nsP1, nsP3 и nsP4 Girdwood заменяли на AR86 nsP1, nsP3 и nsP4, соответственно. Молчащую мутацию A5366G вводили для уничтожения участка SapI в nsP3 AR86. Для химеры 2 (ФИГ. 2G), nsP4 Girdwood заменяли на nsP4 AR86. Для химеры 3 (ФИГ. 2H), nsP3 Girdwood заменяли на nsP3 AR86. Молчащую мутацию A5366G вводили для уничтожения участка SapI в nsP3 AR86. Для химеры 4 (ФИГ. 2I), nsP1 Girdwood заменяли на nsP1 AR86. Последовательности химер 1-4 представлены в SEQ ID NO: 22-25.

ПРИМЕР 2

Конструирование модифицированных альфавирусных векторов с представляющим собой интерес геном

[0218] Альфавирусный вектор на ФИГ. 3А конструировали посредством линеаризации пустого универсального вектора EEEV на ФИГ. 2 посредством расщепления SpeI. Ген гемагглютинина (НА) из вируса гриппа (Genbank AY651334) подвергали перепроектированию кодонов для экспрессии у человека *in silico* и синтезировали (IDT). Синтетический продукт амплифицировали с использованием следующих праймеров, которые добавляют универсальные адаптеры в форме гомологичных концов из 30 п.о. к продукту ПЦР.

[0219] Прямой праймер (5'-GCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACSTATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTGG - 3'; SEQ ID NO: 30).

[0220] Обратный праймер (5'-GCTGGTCGGGTCAATTGGGGCGTAGCGGTCAAATGCAAATTCTGCATTGTAACG-3'; SEQ ID NO: 31),

[0221] Продукт расщепления и продукт ПЦР комбинировали посредством способа Gibson Assembly® для получения в результате конечных векторов.

[0222] Альфавирусные векторы на ФИГ. 3В-Е конструировали из плазмиды, содержащей репликон SINV Girdwood (Genbank MF459683), кодирующий ген НА. Для химеры 1 (ФИГ. 3В), гены nsP1, nsP3, nsP4 заменяли на гены nsP1, nsP3 и nsP4 AR86 (Genbank U38305). Для химеры 2 (ФИГ. 3С), ген nsP4 заменяли на ген nsP4 AR86. Для химеры 3 (ФИГ. 3D), ген nsP3 заменяли на ген nsP3 AR86. Для химеры 4 (ФИГ. 3Е), ген nsP1 заменяли на ген nsP1 AR86. Замены проводили посредством амплификации

продуктов ПЦР с гомологичными концами из 30 п.о. и комбинировали посредством способа Gibson Assembly®. Наблюдали, что никакие конструкции, содержащие ген nsP2 AR86, не являлись способными к репликации.

ПРИМЕР 3

Конструирование модифицированных альфавирусных векторов с удлинённым поли(А)

[0223] Пустой вектор VEE (**ФИГ. 2А**) линейаризовали с использованием SapI и NotI, и синтетический фрагмент ДНК, содержащий последовательность поли(А) с 170 остатками А, за которым следовал участок SapI, терминатор T7, и 30 п.о. гомологии с линейаризованным пустым вектором, комбинировали посредством способа Gibson Assembly®. Выделяли продукт с приблизительно ~120 А, как определено посредством секвенирования по Сенгеру.

ПРИМЕР 4

Оценка минимальной свободной энергии (MFE) 5'-фланкирующего домена и 3'-фланкирующего домена

[0224] Структуры с минимальной свободной энергией (MFE) 5'- и 3'-фланкирующих доменов и их значения ΔG получали *in silico* посредством использования инструмента Mfold для прогнозирования структуры РНК с MFE и расчета ΔG (www.unafold.org/, <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>).

ПРИМЕР 5

Оценка *in vitro* модифицированных альфавирусных векторов

[0225] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки уровней экспрессии конструкций модифицированных альфавирусных векторов, описанных в примерах 1 и 2, и 3 выше, и для исследования любого их различного поведения (например, репликации и экспрессии белка).

[0226] **Список векторов:** репликон VEE с универсальными адаптерами, репликон СНКV S27 с универсальными адаптерами, репликон СНКV DRDE с универсальными адаптерами, репликон EEEV FL93-939 с универсальными адаптерами, SINV Girdwood, химерные репликоны SINV AR86/Girdwood, репликон VEE с универсальными адаптерами и исключительно остатками аденилата в поли(А), и репликон VEE с универсальными адаптерами и исключительно остатками аденилата в длинном поли(А).

[0227] **Анализы:**

[0228] Транскрипция *in vitro*: РНК получали посредством транскрипции *in vitro* с использованием плазмидной ДНК-матрицы, линейаризованной посредством ферментного расщепления. В этих примерах, ДНК либо линейаризуют с использованием NotI, который разрезает ниже терминатора T7, либо линейаризуют с использованием SapI, который разрезает на конце поли(А). Полимеразу бактериофага T7 используют либо для транскрипции *in vitro* с использованием кэпа 5'-ARCA (набор HiScribe™ T7 ARCA mRNA Kit, NEB), либо для транскрипции без кэпа (набор HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit, NEB) с последующим добавлением 5'-кэпа 1 (система Vaccinia Capping System,

mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase, NEB). РНК очищают с использованием экстракции фенолом/хлороформом или очистки на колонке (набор Monarch® RNA Cleanup Kit, NEB). Концентрацию РНК определяют по оптической плотности при 260 нм (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

[0229] Репликация: РНК трансформируют посредством электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 17-20 час после трансформации, клетки фиксируют и пермеабелизируют (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen), и окрашивают с использованием конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела против дцРНК (J2, Scicons) для количественной оценки частоты дцРНК+ клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) дцРНК в индивидуальных клетках посредством флуоресцентной проточной цитометрии.

[0230] Экспрессия белка: РНК трансформируют посредством электропорации в клетки ВНК-21 или Vero (например, 4D-Nucleofector™, Lonza). Через 18-20 час после трансформации, клетки фиксировали и пермеабелизировали (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen), и окрашивали с использованием конъюгированного с APC мышинового моноклонального антитела против НА (2B7, Abcam) для количественной оценки частоты белок НА+ клеток, и средней интенсивности флуоресценции (MFI) белка НА в индивидуальных клетках посредством флуоресцентной проточной цитометрии.

[0231] Дополнительные эксперименты: клетки ВНК-21 или Vero предварительно обрабатывают с использованием кривой титрования рекомбинантного IFN до электропорации РНК, и влияние на репликацию и экспрессию белка для каждого вектора измеряют с использованием вышеуказанных анализов.

ПРИМЕР 6

Оценка in vivo модифицированных альфавирусных векторов

[0232] В этом примере описаны результаты экспериментов in vivo, проведенных для оценки любых дифференциальных иммунных ответов после вакцинации с использованием конструкций модифицированных альфавирусных векторов, описанных в примерах 1 и 2, и 3 выше (например, как не формулированных, так и формулированных с LNP векторов).

[0233] Список векторов: репликон VEE с универсальными адаптерами, репликон СНКV S27 с универсальными адаптерами, репликон СНКV DRDE с универсальными адаптерами, репликон EEEV FL93-939 с универсальными адаптерами, SINV Girdwood, химерные репликоны SINV AR86/Girdwood, репликон VEE с универсальными адаптерами и исключительно остатками аденилата в поли(А), и репликон VEE с универсальными адаптерами и исключительно остатками аденилата в длинном поли(А).

[0234] Анализы:

[0235] Мыши и инъекции. Самок мышей C57BL/6 или BALB/c закупают из Charles River Labs или Jackson Laboratories. На сутки дозирования, между 0,1 и 10 мкг материала

инъектируют внутримышечно, разделенными на обе четырехглавые мышцы. Векторы вводят либо не формулированными, в солевом растворе, либо формулированными с LNP. Животных мониторируют по массе тела и другим общим наблюдениям на протяжении курса исследования. Для исследований иммуногенности, животных подвергают дозированию на сутки 0 и сутки 21. Селезенки собирали на сутки 35, и сыворотку выделяли на сутки 0, 14, и 35. Для исследований экспрессии белка, животных подвергают дозированию на сутки 0, и биолюминесценцию оценивают на сутки 1, 3 и 7. Визуализацию *in vivo* активности люциферазы проводят с использованием системы IVIS в указанных временных точках.

[0236] *Формулирование LNP.* Репликон РНК формулируют в липидные наночастицы с использованием микроструйного смесителя и анализируют по размеру частиц, полидисперсности, с использованием динамического светорассеяния и эффективности инкапсуляции. Молярное соотношение липидов, используемых в формулировании частиц LNP, составляет 30% C12-200, 46,5% холестерина, 2,5% PEG-2К и 16% DOPE.

[0237] ELISpot. Для измерения амплитуды специфических для вируса гриппа ответов Т-клеток, анализ ELISpot IFN γ проводят с использованием набора Mouse IFN γ ELISpot PLUS Kit (HRP) (MabTech), по инструкциям производителя. Кратко, спленоциты выделяют и ресуспендируют до концентрации 5×10^6 клеток/мл в средах, содержащих пептиды, представляющие либо CD4+, либо CD8+ Т-клеточные эпитопы для HPV, РМА/иономицин в качестве положительного контроля, или DMSO в качестве ложной стимуляции.

[0238] *Внутриклеточное окрашивание цитокинов.* Селезенки выделяют в соответствии со способами, описанными для ELISpot, и 1×10^6 клеток добавляют к средам для содержания клеток в общем объеме 200 мкл на лунку. Каждая лунка содержит пептиды, представляющие либо CD4+, либо CD8+ Т-клеточные эпитопы для HPV, РМА/иономицин в качестве положительного контроля, или DMSO в качестве ложной стимуляции. Через 1 час, ингибитор транспорта белков GolgiPlugTM (BD Biosciences) добавляют в каждую лунку. Клетки инкубируют в течение следующих 5 часов. После инкубации, поверхность клеток окрашивают по CD8+ (53-6.7), CD4+ (GK1.5), B220 (B238128), Gr-1 (RB6-8C5), CD16/32 (M93) с использованием стандартных способов. После поверхностного окрашивания, клетки фиксируют и окрашивают по внутриклеточным белкам, по стандартным способам, для IFN γ (RPA-T8), IL-2 (JES6-5H4) и TNF (MP6-XT22). Затем клетки впоследствии анализируют в проточном цитометре, и полученные файлы FCS анализируют с использованием программного обеспечения FlowJo версии 10.4.1.

[0239] *Антитела.* Ответы антител для измерения тотальных специфических для E6/E7 HPV IgG измеряют с использованием наборов для ELISA от Alpha Diagnostic International, по инструкциям производителя.

ПРИМЕР 7

Оценка модифицированных альфавирусных векторов с удлинённым поли(А)

[0240] В этом примере описаны результаты экспериментов *in vitro*, проведенных для оценки активности репликации РНК для конструкций модифицированных альфавирусных срРНК с различной длиной поли(А).

[0241] Пустой вектор VEE линейаризовали с использованием SpeI и NotI (фрагмент 1), продукт ПЦР, содержащий ген гемагглютинаина (НА) из вируса гриппа (Genbank AY651334), получали с концами из 30 п.о., гомологичными фрагменту 1 и фрагменту 3 (фрагменту 2), и синтетический фрагмент ДНК (фрагмент 3), содержащий последовательность поли(А) с различной длиной (например, с 30, 49, 64, 81 или 90 остатками аденилата), за которой следует участок SapI, терминатор Т7, и концы из 30 п.о., гомологичные фрагменту 2 и линейаризованному пустому вектору (фрагменту 1), комбинировали посредством способа сборки трех фрагментов Gibson Assembly®. Длину последовательности поли(А) в полученных плазидах подтверждали посредством секвенирования по Сенгеру. Затем РНК получали посредством транскрипции *in vitro* с использованием плазмидных ДНК-матриц, линейаризованных посредством ферментного расщепления SapI, как описано в примере 5 выше. РНК очищали посредством преципитации LiCl. Впоследствии, целостность РНК оценивали посредством анализа электрофореза в агарозном геле, и результаты обобщены на **ФИГ. 8**.

[0242] Для количественной оценки активности репликации РНК, конструкции срРНК трансформировали посредством электропорации в клетки 8Е5 ВНК-21 (например, 4D-Nucleofector™, Lonza) для каждого образца. Каждую конструкцию срРНК трансформировали в трех повторах в дозах 3, 10, 20, 30, 40 и 50 нг. Через 20 час после трансформации, клетки фиксировали и пермеабелизировали (набор eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, Invitrogen), и окрашивали с использованием конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела против дцРНК (J2, Scicons) для количественной оценки частоты дцРНК+ клеток (клеток, в которых репликация РНК поддается детекции) посредством флуоресцентной проточной цитометрии. Частота дцРНК+ клеток в каждом образце при каждой логарифмически преобразованной дозе РНК для каждой конструкции срРНК показана на **ФИГ. 9**.

[0243] С использованием Prism (программного обеспечения GraphPad), значения $\log(EC_{50})$ рассчитывали для каждой конструкции срРНК посредством установки соответствия данных кривой 4PL с нижним ограничением > 0 . Значения $\log(EC_{50})$ и подвергнутые обратному преобразованию значения EC_{50} показаны в таблице 1. Значения EC_{50} представляют собой дозу РНК, необходимую для половины максимальной частоты репликации РНК.

ТАБЛИЦА 1: Обобщение EC_{50} (доза РНК для половины максимальной активности), рассчитанных по установке соответствия данных, показанных на **ФИГ. 9**, кривой 4PL.

срРНК	Log(EC_{50})	EC_{50} (нг РНК)
160V 30A	0,9809	9,570

496V 49A	0,8366	6,865
202V 64A	0,6616	4,588
498V 81A	0,7908	6,177
497V 90A	0,7610	5,768

[0244] Для лучшей визуализации результатов, поскольку самое низкое значение EC50 функционально эквивалентно самой высокой активности репликации на массу РНК, величина, обратная EC50, показана на ФИГ. 10. Статистический анализ однофакторного ANOVA проведен с использованием Prism (программного обеспечения GraphPad) для определения статистической значимости различий между экспериментальными значениями EC50 и проиллюстрирован на ФИГ. 10, и показан в таблице 2. В этих экспериментах, обнаружено, что конструкции срРНК с самым коротким поли(А)-хвостом, состоящим из 30 остатков аденилата (А), имеют самую низкую активность репликации РНК. Обнаружено также, что конструкции срРНК с медианной длиной поли(А), состоящего из 64 остатков А, имеют самую высокую активность. Как показано на ФИГ. 10, порядок активности являлся следующим: 30А<49А<81А<90А<64А.

[0245] Все конструкции срРНК с длиной поли(А), большей чем 30А, имели значимо более высокую активность, чем эталонная конструкция срРНК, содержащая последовательность поли(А) с 30 остатками А. Конструкции срРНК с 64 остатками А имели значимо более высокую активность, чем конструкции срРНК с 49 остатками А, но конструкции срРНК с более длинными последовательностями поли(А) (например, 81А, 90А) не имели значимо более высокую активность, чем 49А.

[0246] В этих экспериментах, конструкции срРНК с наиболее длинными тестируемыми последовательностями поли(А) (например, 81А, 90А) проявляли тенденцию к более низкой активности, чем конструкции срРНК с медианной длиной 64А, однако, не обнаружено, что активность являлась значимо более низкой, чем активность для 64А. Эти данные позволяют предполагать, что поли(А) из 64А или по меньшей мере из 64А приводит к значимо большей активности для конструкций срРНК.

ТАБЛИЦА 2: Результаты статистического теста однофакторного ANOVA, проведенного для определения значимых различий между значениями Log(EC₅₀), рассчитанными по данным, показанным на ФИГ. 9. ns=не значимо.

Критерий множественного сравнения Тьюки (однофакторный ANOVA)	Среднее разл.	Обобщение	Корректированное значение Р
160V 30A против 496V 49A	0,1443	ns	0,0619
160V 30A против 202V 64A	0,3192	****	<0,0001
160V 30A против 498V 81A	0,1901	**	0,0055
160V 30A против 497V 90A	0,2199	***	0,0008
496V 49A против 202V 64A	0,1749	*	0,0151
496V 49A против 498V 81A	0,0458	ns	0,9108

496V 49A против 497V 90A	0,0756	ns	0,618
202V 64A против 498V 81A	-0,1291	ns	0,1303
202V 64A против 497V 90A	-0,0993	ns	0,3616
498V 81A против 497V 90A	0,0298	ns	0,9805

[0247] В то время как описаны конкретные альтернативы по настоящему изобретению, следует понимать, что различные модификации и комбинации являются возможными и предусмотрены в рамках истинного содержания и объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, не существует намерения ограничения точным рефератом и описанием, представленными в настоящем описании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, где значительная часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вирусные структурные белки, из модифицированного альфавирусного генома или репликона РНК, заменена на синтетическую адаптерную молекулу, имеющую конфигурацию, чтобы способствовать вставке гетерологичной последовательности в модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, и где синтетическая адаптерная молекула имеет формулу I:

[5'-фланкирующий домен]-[участок рестрикции]ⁿ-[3'-фланкирующий домен]

Формула I

, где

- a) n представляет собой целое число от 1 до 6;
- b) участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционной эндонуклеазы; и
- c) каждый из 5'-фланкирующего домена и 3'-фланкирующего домена содержит последовательность нуклеиновой кислоты, как прогнозировано, имеющую минимальную вторичную структуру.

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, где последовательность 5'-фланкирующего домена имеет значение ΔG сворачивания структуры с минимальной свободной энергией (MFE), более высокое, чем предопределенное пороговое значение.

3. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-2, где 5'-фланкирующий домен не содержит последовательность, которая кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля.

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, где 5'-фланкирующий домен содержит кодирующую последовательность для аутопротеолитического пептида.

5. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.4, где аутопротеолитический пептид содержит одну или более последовательности аутопротеолитического расщепления, происходящих из кальций-зависимой сериновой эндопротеазы (фурина), 2A тешовируса-1 свиней (P2A), 2A вируса ящура (FMDV) (F2A), 2A вируса ринита А лошадей (ERAV) (E2A), 2A вируса *Thossea asigna* (T2A), 2A вируса цитоплазматического полиэдроза (VmCPV2A), 2A вируса фляшерии (VmIFV2A), или их комбинацию.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-5, где кодирующая последовательность для аутопротеолитического пептида встроена выше участка(ов) рестрикции.

7. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6, где 5'-фланкирующий домен содержит внутренний участок связывания рибосомы (IRES).

8. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.7, где элемент IRES элемент встроена выше участка(ов) рестрикции.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, где 5'-фланкирующий домен не содержит участок старта трансляции ни в какой рамке считывания.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, где 5'-фланкирующий домен содержит участок старта трансляции или его часть, в качестве последних нуклеотидов 5'-адаптерной последовательности.

11. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, где 5'-фланкирующий домен содержит кодон метионина, в качестве последних трех нуклеотидов 5'-адаптерной последовательности.

12. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-11, где 5'-фланкирующий домен имеет длину от приблизительно 15 нуклеотидов до приблизительно 35 нуклеотидов.

13. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.12, где 5'-фланкирующий домен имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов.

14. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-13, где 5'-фланкирующий домен содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1.

15. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14, где последовательность 3'-фланкирующего домена имеет значение ΔG сворачивания структуры с минимальной свободной энергией (MFE), более высокое, чем предопределенное пороговое значение.

16. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-15, где 5'-фланкирующий домен не содержит последовательность, которая кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля.

17. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16, где 3'-фланкирующий домен содержит стоп-кодон трансляции в качестве первых трех нуклеотидов 3'-адаптерной последовательности.

18. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.17, где стоп-кодон выбран из TAG, TAA или TGA.

19. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-18, где 3'-фланкирующий домен содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

20. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-19, где синтетическая адаптерная молекула содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20.

21. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-20, где участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента, выбранного из рестрикционных ферментов типа I, рестрикционных ферментов типа II, рестрикционных ферментов типа III, рестрикционных ферментов типа IV и рестрикционных ферментов типа V.

22. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.21, где участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента типа II.

23. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.22, где участок рестрикции поддается расщеплению посредством SpeI или его изошизомера.

24. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, содержащий поли(А)-хвост, где поли(А)-хвост не содержит 3'-остатков не-А.

25. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-24, дополнительно содержащая дополнительный участок рестрикции, сконструированный в последовательности, кодирующей поли(А)-хвост альфавирусного генома или репликона РНК.

26. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-24, дополнительно содержащая дополнительный участок рестрикции, встроенный на конце последовательности, кодирующей поли(А)-хвост альфавирусного генома или репликона РНК.

27. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.26, где дополнительный участок рестрикции поддается расщеплению посредством рестрикционного фермента типа IIS или эндонуклеазы хоминга.

28. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.27, где рестрикционный фермент типа IIS представляет собой AcuI, AlwI, Alw26I, BaeI, BbiI, BbsI, BbsI-HF, BbvI, BccI, BceAI, BcgI, BciVI, BcoDI, BfuAI, BmrI, BpmI, BpuEI, BsaI, BsaI-HF, BsaI-HFv2, BsaXI, BseGI, BseRI, BsgI, BsmAI, BsmBI-v2, BsmFI, BsmI, BspCNI, BspMI, BspQI, BsrDI, BsrI, BtgZI, BtsCI, BtsI-v2, BtsIMutI, CspCI, EarI, EciI, Eco31I, Esp3I, FauI, FokI, HgaI, HphI, HpyAV, LpuI, MboII, MlyI, MmeI, MnlI, NmeAIII, PaqCI, PleI, SapI или SfaNI.

29. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.27, где эндонуклеаза хоминга представляет собой I-CeuI, I-SceI, PI-PspI, или PI-SceI.

30. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая модифицированный альфавирусный геном или репликон РНК, содержащий поли(А)-хвост, где удлиненная последовательность, кодирующая поли(А)-хвост, имеет длину более 34 остатков.

31. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.30, где удлиненный поли(А)-хвост имеет длину, лежащую в диапазоне от приблизительно 30 до приблизительно 120 остатков аденилата.

32. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 30-31, где удлиненный поли(А)-хвост имеет длину приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90 и приблизительно 100 остатков аденилата.

33. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31, где модифицированный геном или репликон РНК происходит из вируса, принадлежащего к роду Alphavirus из семейства Togaviridae.

34. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.33, где модифицированный геном или

репликон РНК происходит из альфавируса, принадлежащего к группе VEEV/EEEV или группе SFV или группе SINV.

35. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.34, где альфавирус представляет собой вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус Эверглейдс (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Миддельбург (MIDV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус О'Ньонг-ньонг (ONNV), вирус реки Росс (RRV), вирус леса Барма (BF), вирус Гета (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Майаро (MAYV), вирус Уна (UNAV), вирус Синдбис (SINV), вирус Аура (AURAV), вирус Ватароа (WNAV), вирус Бабанки (BABV), вирус Кызылагач (KYZV), вирус западного энцефалита лошадей (WEEV), вирус Хайлендс-Джи (HJV), вирус Форт-Морган (FMV), Ндуму (NDUV) или вирус Багги Крик.

36. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.35, где альфавирус представляет собой вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус Чикунгунья (CHIKV) или вирус Синдбис (SINV).

37. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-36, дополнительно содержащая одну или более экспрессирующих кассет, где каждая из экспрессирующих кассет содержит промотор, функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты.

38. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.37, где по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет содержит субгеномный (сг) промотор, функционально связанный с гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты.

39. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.38, где сг промотор представляет собой субгеномный промотор 26S.

40. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-39, дополнительно содержащая одну или более нетранслируемых областей (UTR).

41. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.40, где по меньшей мере одна из UTR представляет собой гетерологичную UTR.

42. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-41, где 5'-фланкирующий домен не кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля с последовательностью, локализованной непосредственно выше нее (например, в 5'-UTR сгРНК) или с последовательностью, локализованной непосредственно ниже нее (например, внутри кодирующей последовательности GOI).

43. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-42, где 3'-фланкирующий домен не кодирует последовательность РНК, способную к формированию структуры стебель-петля с последовательностью, локализованной непосредственно выше нее (например, внутри кодирующей последовательности GOI) или с последовательностью, локализованной непосредственно ниже (например, в 3'-UTR).

44. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-43, где 5'-фланкирующий домен и/или 3'-фланкирующий домен не содержит последовательность, имеющую комплементарность с последовательностью, локализованной внутри 3'-UTR.

45. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-43, где 5'-фланкирующий домен и/или 3'-фланкирующий домен не содержит последовательность, имеющую комплементарность с 3'-концом 3'-UTR.

46. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37-45, где по меньшей мере одна из экспрессирующих кассет содержит кодирующую последовательность для представляющего интерес гена (GOI).

47. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.46, где кодирующая последовательность GOI содержит стоп-кодон, расположенный выше 3'-фланкирующего домена синтетической адаптерной молекулы.

48. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 46-47, где GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из терапевтического полипептида, профилактического полипептида, диагностического полипептида, нутрицевтического полипептида, промышленного фермента и репортерного полипептида.

49. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 46-48, где GOI кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из антитела, антигена, иммуномодулятора, фермента, передающего сигналы белка и цитокина.

50. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 46-49, где кодирующая последовательность GOI является оптимизированной для экспрессии на уровне, более высоком, чем уровень экспрессии эталонной кодирующей последовательности.

51. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-50, где конструкция нуклеиновой кислоты встроена в вектор.

52. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.51, где вектор представляет собой вектор на основе самореплицирующейся РНК (срРНК).

53. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-52, где последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-27.

54. Рекомбинантная клетка, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53.

55. Рекомбинантная клетка по п.54, где рекомбинантная клетка представляет собой эукариотическую клетку.

56. Рекомбинантная клетка по п.55, где рекомбинантная клетка представляет собой клетку животного.

57. Рекомбинантная клетка по п.56, где клетка животного представляет собой клетку позвоночного животного или клетку беспозвоночного животного.

58. Рекомбинантная клетка по п.57, где рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

59. Рекомбинантная клетка по п.58, где рекомбинантная клетка выбрана из группы,

состоящей из клетки почки африканской зеленой мартышки (клетки Vero), клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO), клетки A549 человека, клетки шейки матки человека, клетки СHME5 человека, эпидермоидной клетки гортани человека, клетки фибробласта человека, клетки HEK-293 человека, клетки HeLa человека, клетки HepG2 человека, клетки HUH-7 человека, клетки MRC-5 человека, мышечной клетки человека, клетки 3T3 мыши, клетки соединительной ткани мыши, мышечной клетки мыши и клетки почки кролика.

60. Культура клеток, содержащая по меньшей мере одну рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-59 и культуральную среду.

61. Трансгенное животное, содержащее конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53.

62. Трансгенное животное по п.61, где животное представляет собой позвоночное животное или беспозвоночное животное.

63. Трансгенное животное по п.62, где животное представляет собой млекопитающее.

64. Трансгенное животное по п.63, где млекопитающее представляет собой не являющееся человеком млекопитающее.

65. Способ получения рекомбинантной молекулы РНК, включающий (i) выращивание трансгенного животного по любому из пп. 61-64, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки по любому из пп. 54-59 в таких условиях, что продуцируется рекомбинантная молекула РНК.

66. Способ по п.65, где трансгенное животное или рекомбинантная клетка содержит конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 24-53, и при этом последовательность, кодирующую рекомбинантную молекулу РНК, необязательно, расщепляют посредством рестрикционного фермента, способного расщеплять участок рестрикции, сконструированный после конца последовательности, кодирующей поли(А)-хвост.

67. Рекомбинантная молекула РНК, полученная посредством способа по любому из пп. 65-66.

68. Рекомбинантная молекула РНК по п.67, где рекомбинантная молекула РНК имеет усиленную биологическую активность.

69. Способ получения представляющего интерес полипептида, включающий (i) выращивание трансгенного животного, содержащего конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-53, или (ii) культивирование рекомбинантной клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-50, в таких условиях, что продуцируется полипептид, кодированный GOI.

70. Способ продукции представляющего интерес полипептида у субъекта, включающий введение субъекту конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 48-53.

71. Способ по п.70, где субъект представляет собой позвоночное животное или

беспозвоночное животное.

72. Способ по п.71, где субъект представляет собой субъекта-млекопитающего.

73. Способ по п.72, где субъект-млекопитающее представляет собой субъекта-человека.

74. Рекомбинантный полипептид, полученный посредством способа по любому из пп. 69-73.

75. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент и:

а) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53;

б) рекомбинантную молекулу РНК по п.67;

с) рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-59; и/или

д) рекомбинантный полипептид по п.74.

76. Фармацевтическая композиция по п.75, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

77. Фармацевтическая композиция по п.75, содержащая рекомбинантную молекулу РНК по п.67 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

78. Фармацевтическая композиция по п.75, содержащая рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-59 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

79. Фармацевтическая композиция по п.75, содержащая рекомбинантный полипептид по п.74 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

80. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 75-79, где композицию составляют в липосоме, наночастице на основе липидов (LNP) или полимерной наночастице.

81. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 75-80, где композиция представляет собой иммуногенную композицию.

82. Фармацевтическая композиция по п.81, где иммуногенную композицию составляют в качестве биотерапевтического средства.

83. Фармацевтическая композиция по п.81, где иммуногенную композицию составляют в качестве вакцины.

84. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 75-80, где композиция является по существу не иммуногенной для субъекта.

85. Фармацевтическая композиция по п.84, где иммуногенную композицию составляют в качестве биотерапевтического средства.

86. Фармацевтическая композиция по п.84, где иммуногенную композицию составляют в качестве вакцины.

87. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 75-80, где фармацевтическую композицию составляют в качестве адьюванта.

88. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 75-87, где фармацевтическую композицию составляют для одного или более из интраназального введения, чрескожного введения, внутривенного введения, внутримышечного введения, внутриузлового

введения, внутритропухолевого введения, внутрисуставного введения, внутривенного введения, подкожного введения, интравагинального и перорального введения.

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

- a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53;
- b) рекомбинантную молекулу РНК по п.67;
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-59;
- d) рекомбинантный полипептид по п.74; и/или
- e) фармацевтическую композицию по любому из пп. 75-88.

90. Способ профилактики и/или лечения нарушения здоровья у нуждающегося в этом субъекта, включающий профилактическое или терапевтическое введение субъекту композиции, содержащей:

- a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53;
- b) рекомбинантную молекулу РНК по п.67;
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-59;
- d) рекомбинантный полипептид по п.74; и/или
- e) фармацевтическую композицию по любому из пп. 75-88.

91. Способ по любому из пп. 89-90, где нарушение здоровья представляет собой пролиферативное нарушение, воспалительное нарушение, аутоиммунное нарушение или микробную инфекцию.

92. Способ по любому из пп. 89-91, где субъект имеет или, как подозревают, имеет нарушение здоровья, ассоциированное с пролиферативным нарушением, воспалительным нарушением, аутоиммунным нарушением или микробной инфекцией.

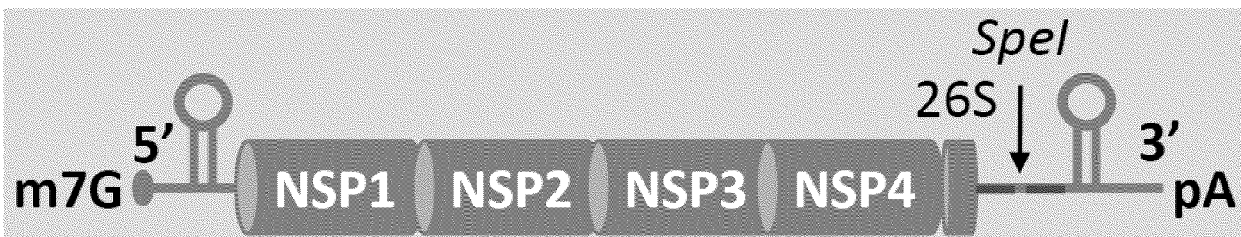
93. Способ по любому из пп. 89-92, где композицию вводят субъекту индивидуально в качестве единственной терапии (монотерапии) или в качестве первой терапии в комбинации с по меньшей мере одним из видов дополнительной терапии.

94. Способ по п.93, где по меньшей мере один из видов дополнительной терапии выбран из группы, состоящей из химиотерапии, радиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, терапии токсином, направленной терапии и хирургии.

95. Набор для модуляции иммунного ответа, для предотвращения и/или для лечения нарушения здоровья или микробной инфекции, содержащий:

- a) конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-53;
- b) рекомбинантную молекулу РНК по п.67;
- c) рекомбинантную клетку по любому из пп. 54-59;
- d) рекомбинантный полипептид по п.74; и/или
- e) фармацевтическую композицию по любому из пп. 75-88.

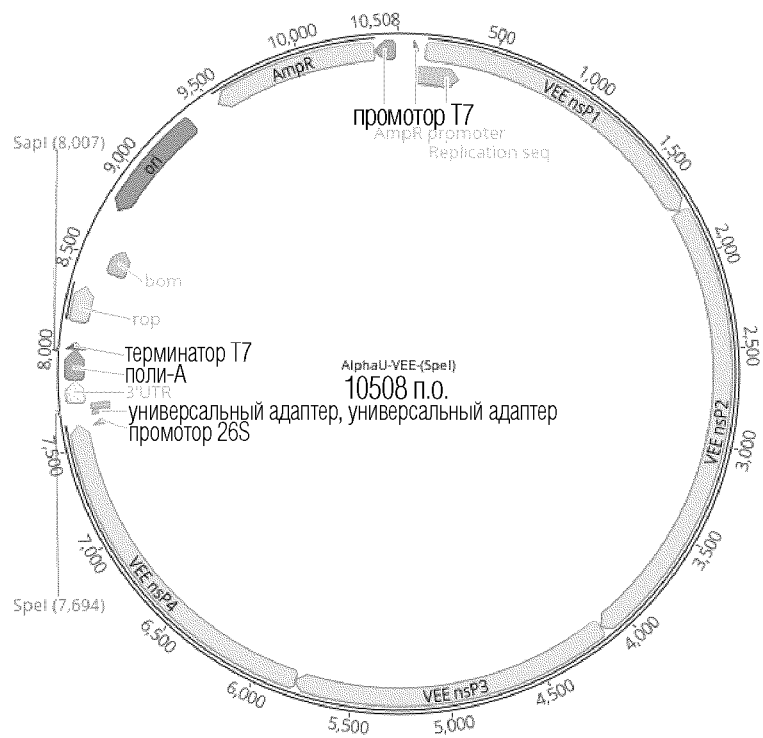
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

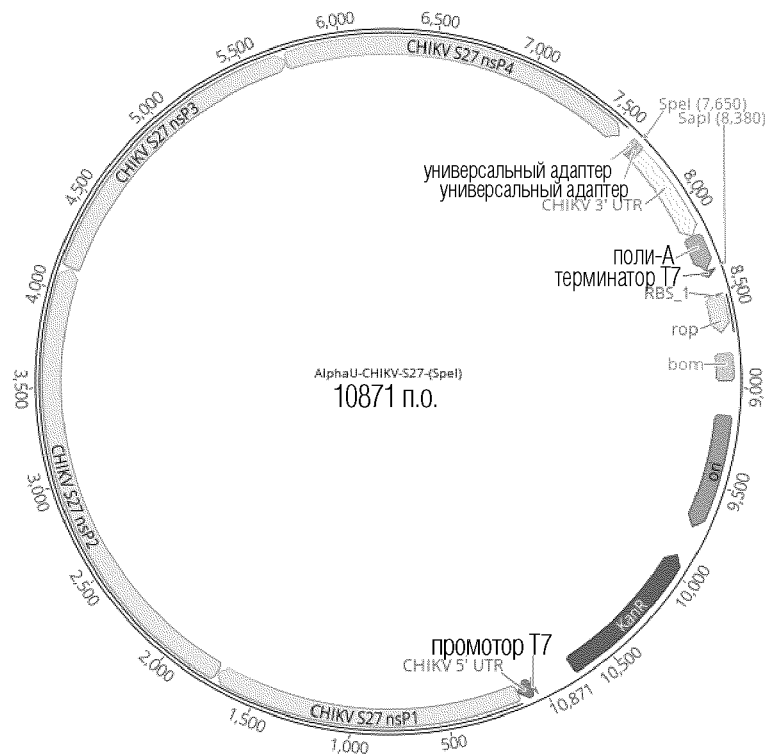


Пустой вектор VEE с универсальным адаптером



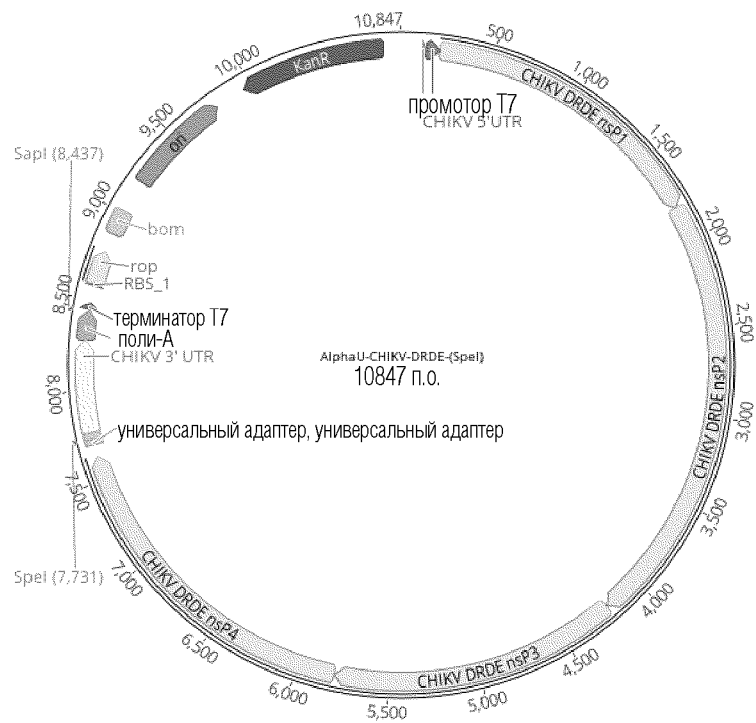
ФИГ. 2А

Пустой вектор CHIKV S27 с универсальным адаптером



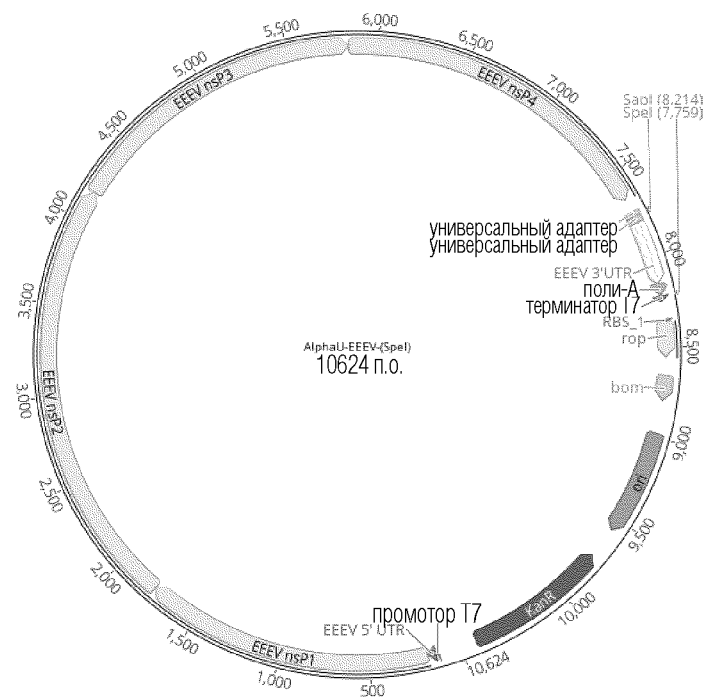
ФИГ. 2В

Пустой вектор CHIKV DRDE
с универсальным адаптером



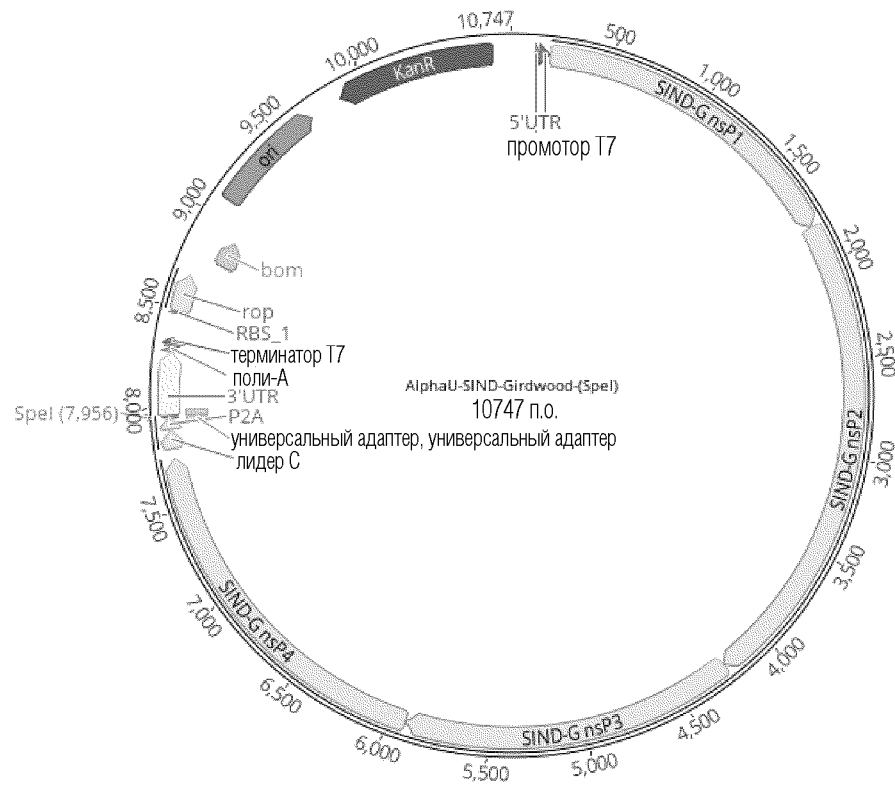
ФИГ. 2С

Пустой вектор EEEV FL93-939
с универсальным адаптером



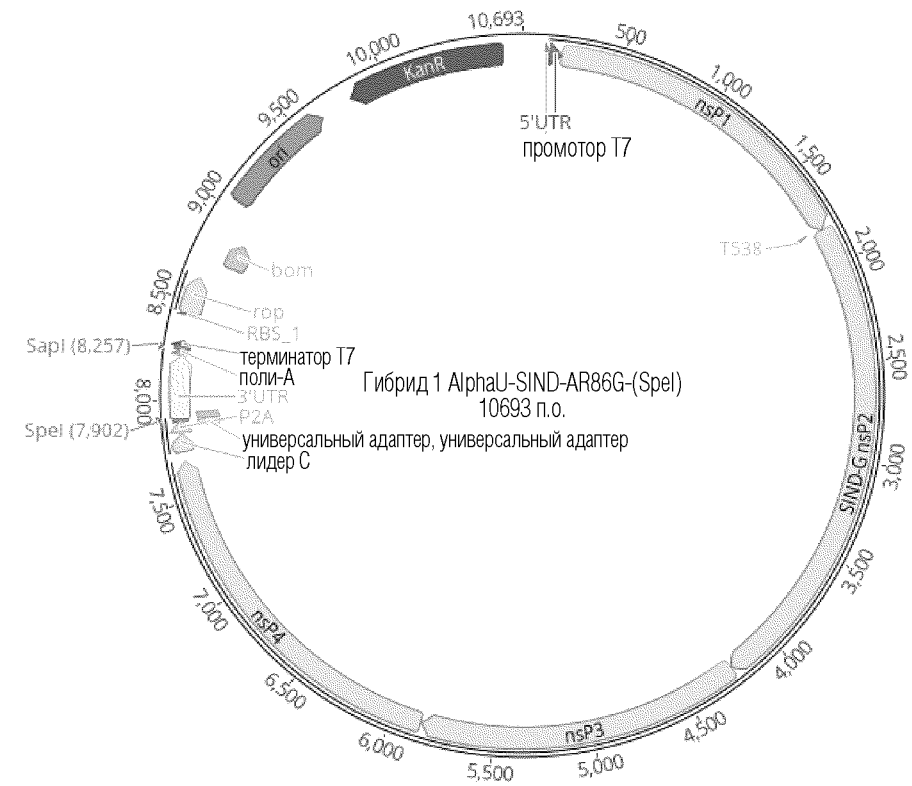
ФИГ. 2D

Пустой вектор SINV Girdwood
с универсальным адаптером



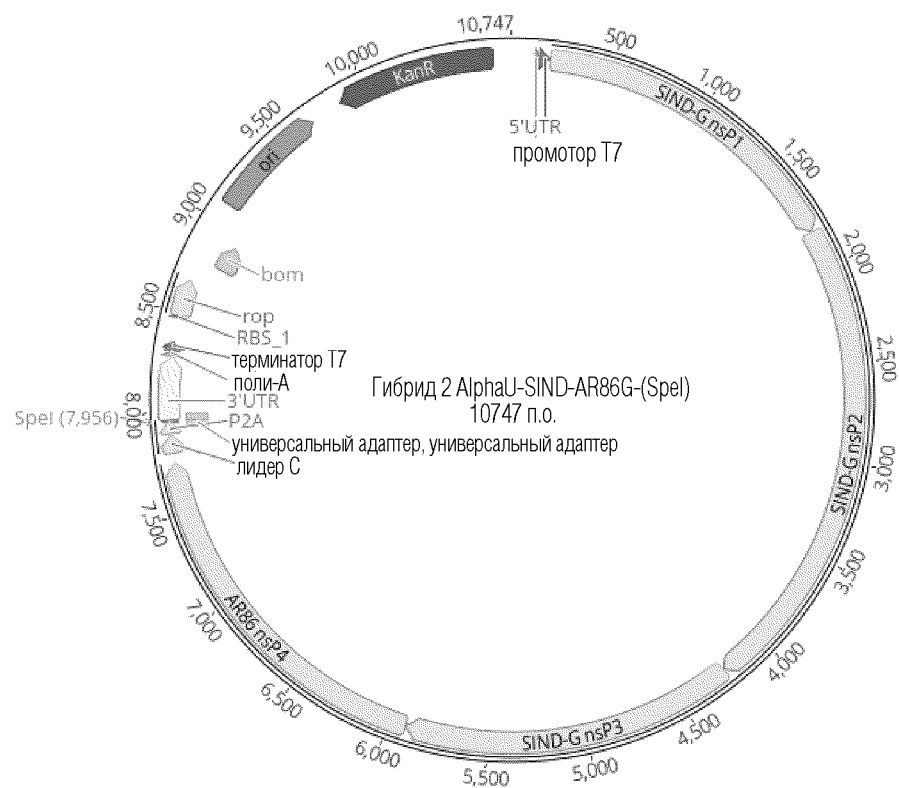
ФИГ. 2Е

Химерный пустой вектор 1 SINV AR86-Girdwood
с универсальным адаптером



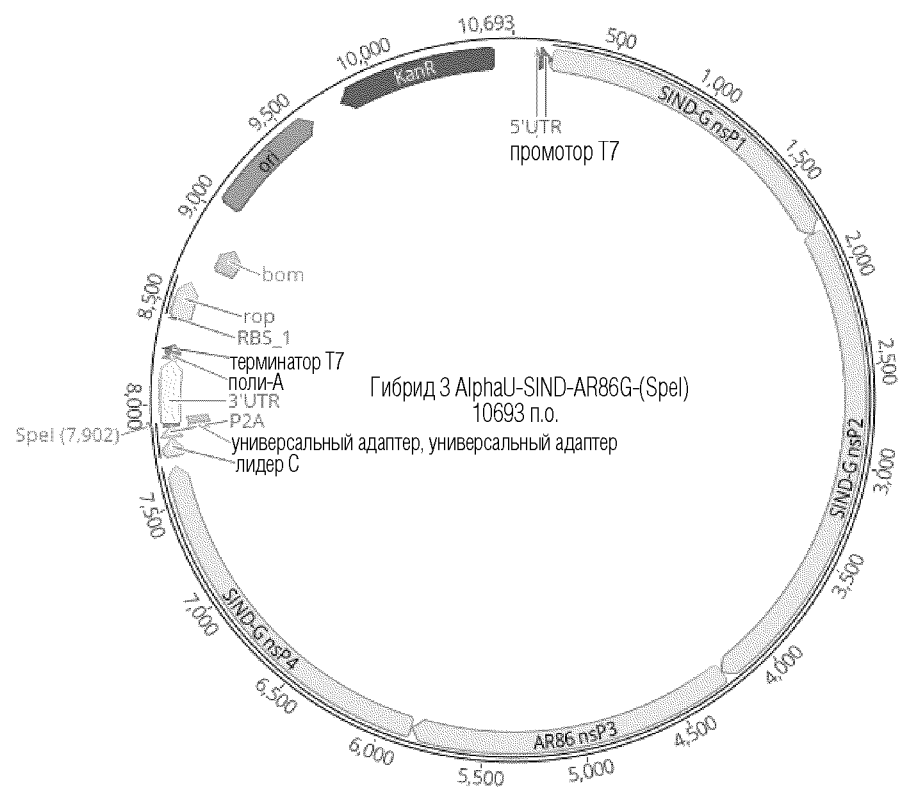
ФИГ. 2F

Химерный пустой вектор 2 SINV AR86-Girdwood
с универсальным адаптером



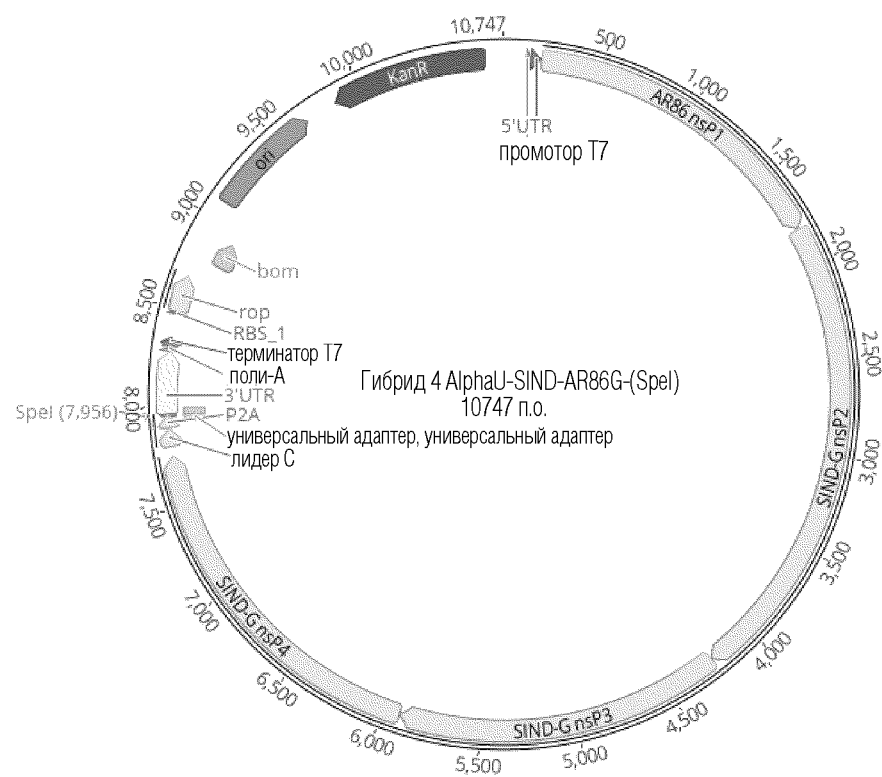
ФИГ. 2G

Химерный пустой вектор 3 SINV AR86-Girdwood
с универсальным адаптером



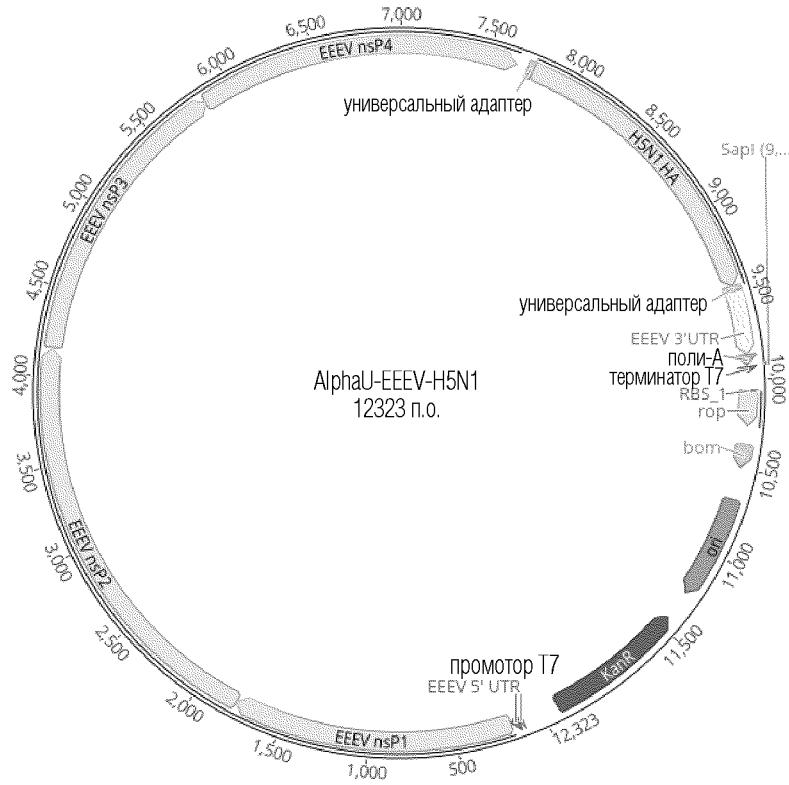
ФИГ. 2H

Химерный пустой вектор 4 SINV AR86-Girdwood
с универсальным адаптером



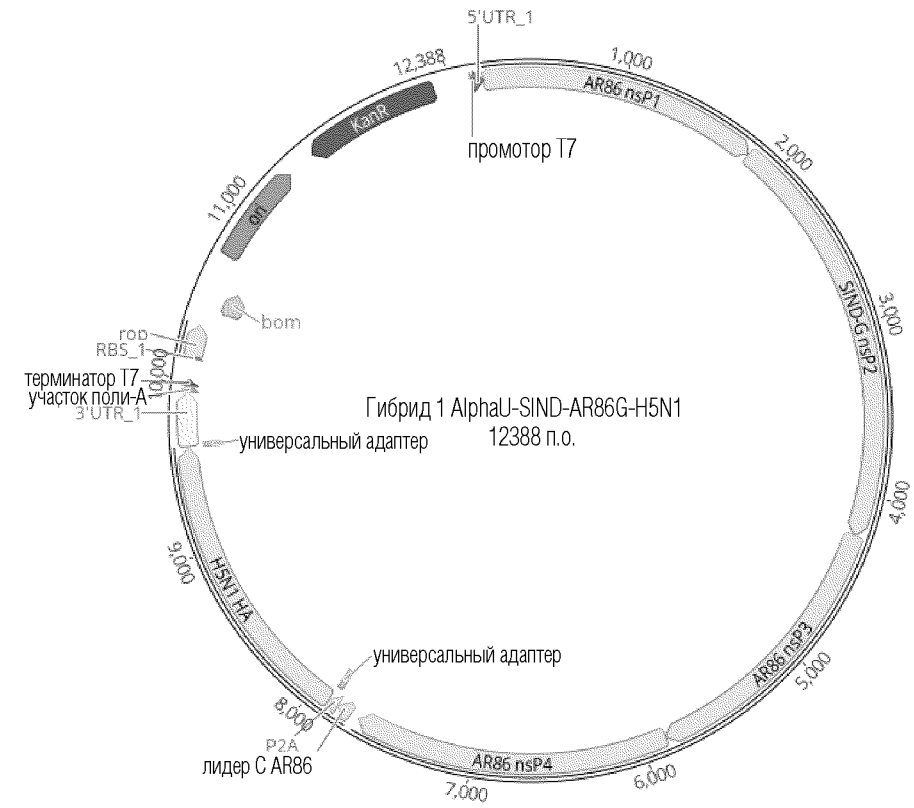
ФИГ. 21

Вектор EEEV FL93-939 с GOI



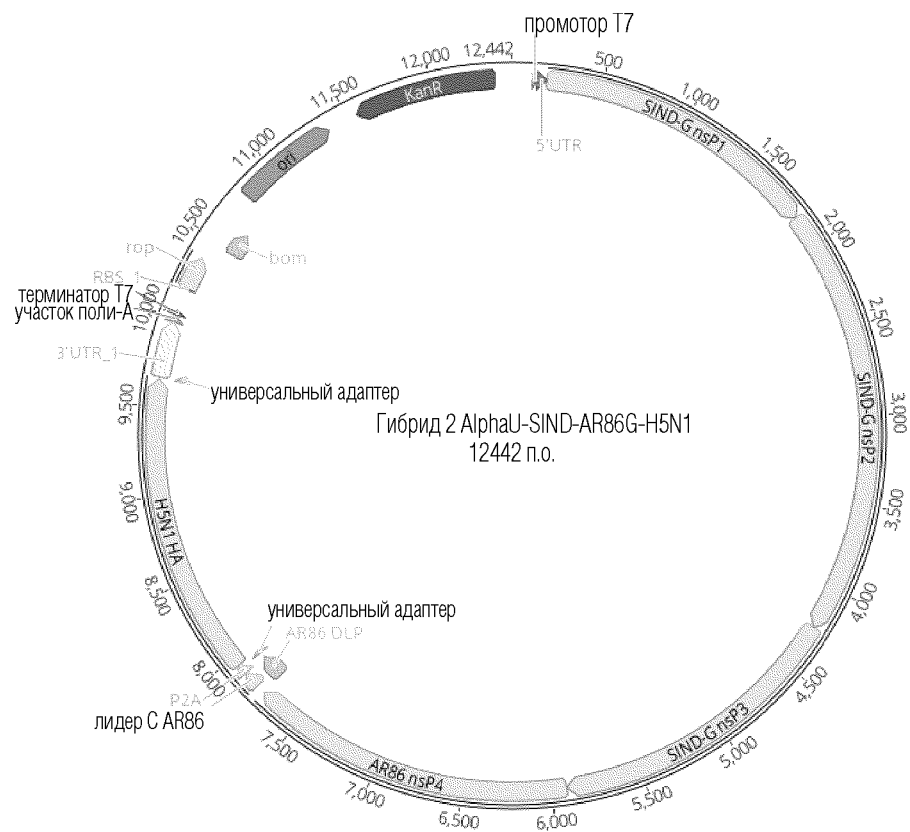
ФИГ. 3А

Гибрид 1 SINV AR86-Girdwood с GOI



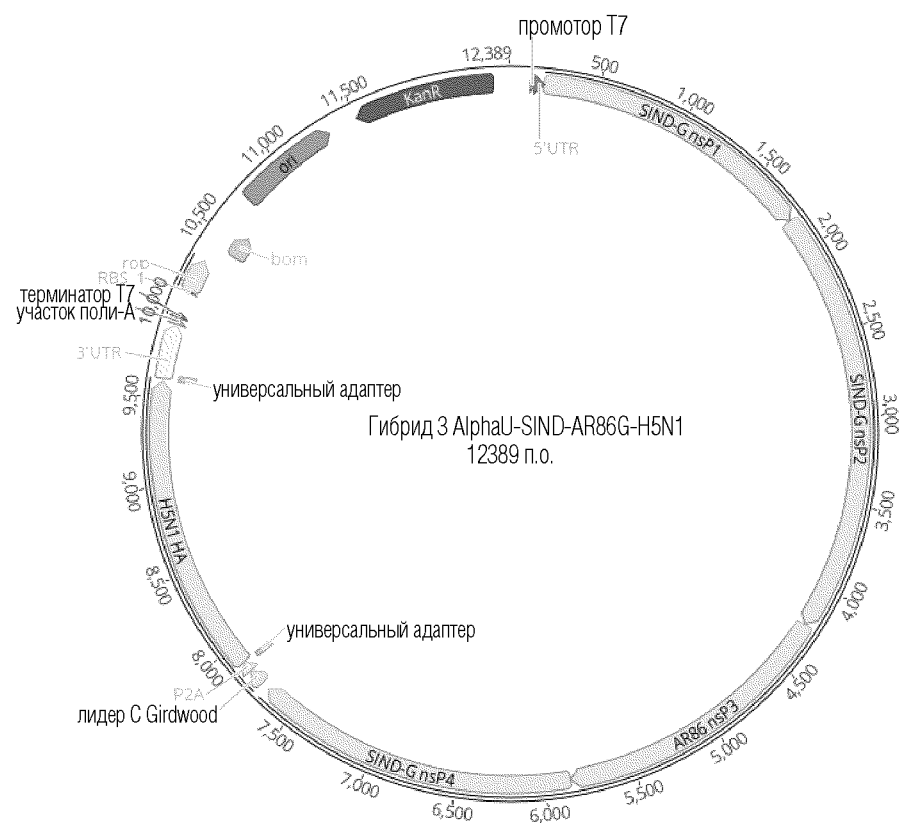
ФИГ. 3В

Гибрид 2 SINV AR86-Girdwood с GOI



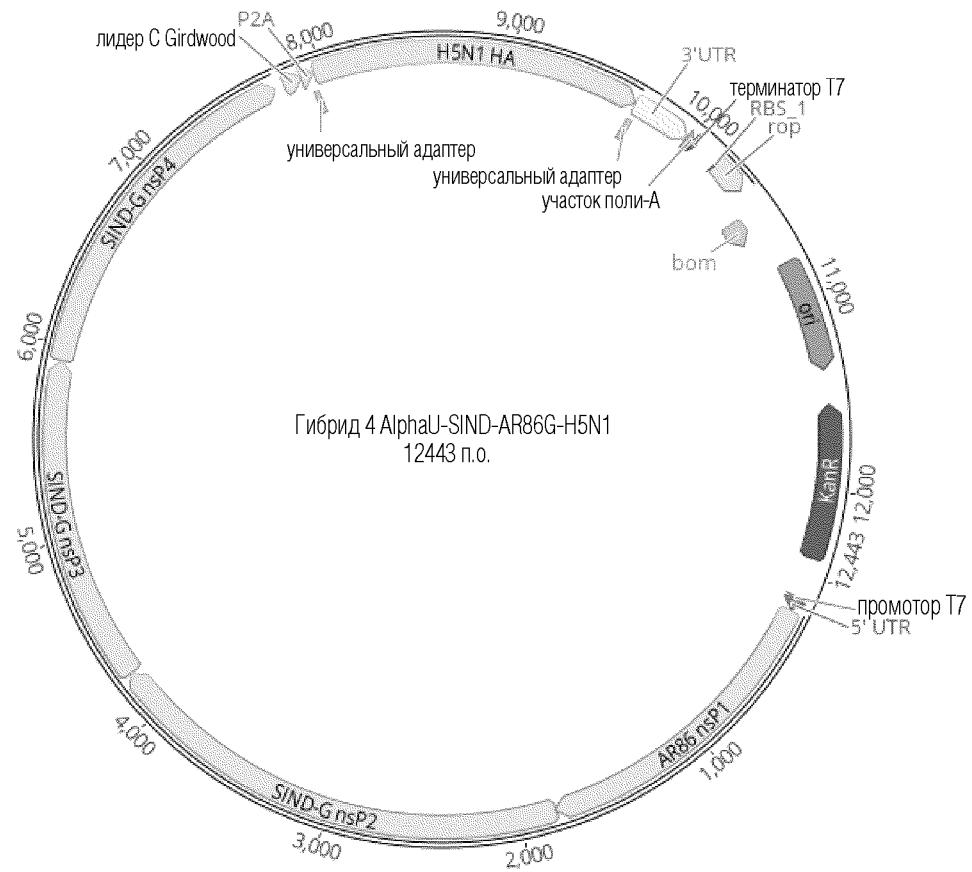
ФИГ. 3С

Гибрид 3 SINV AR86-Girdwood с GOI



ФИГ. 3D

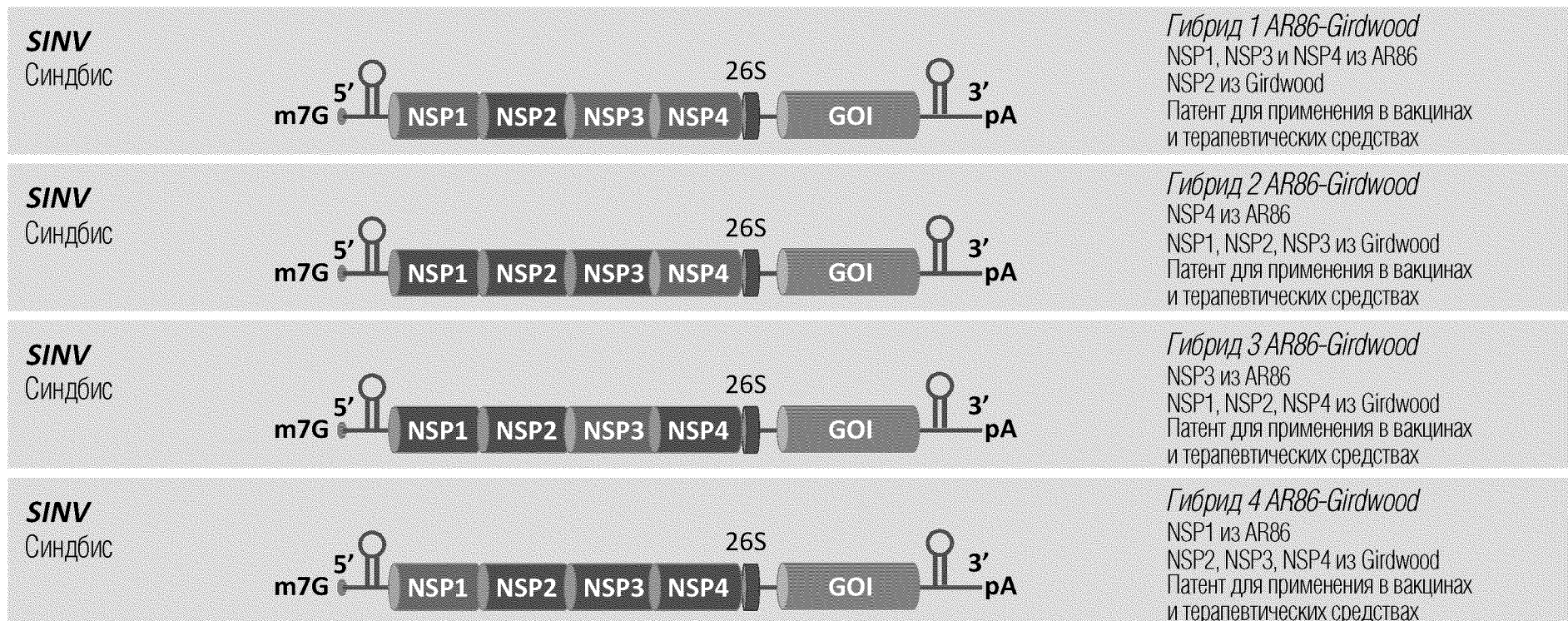
Гибрид 4 SINV AR86-Girdwood с GOI



ФИГ. 3Е

Схема

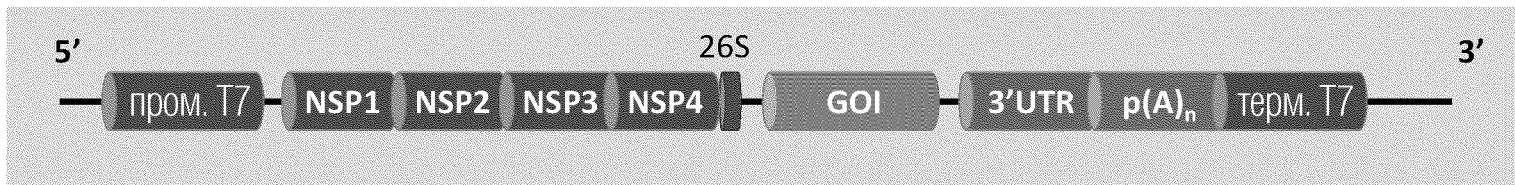
Штамм



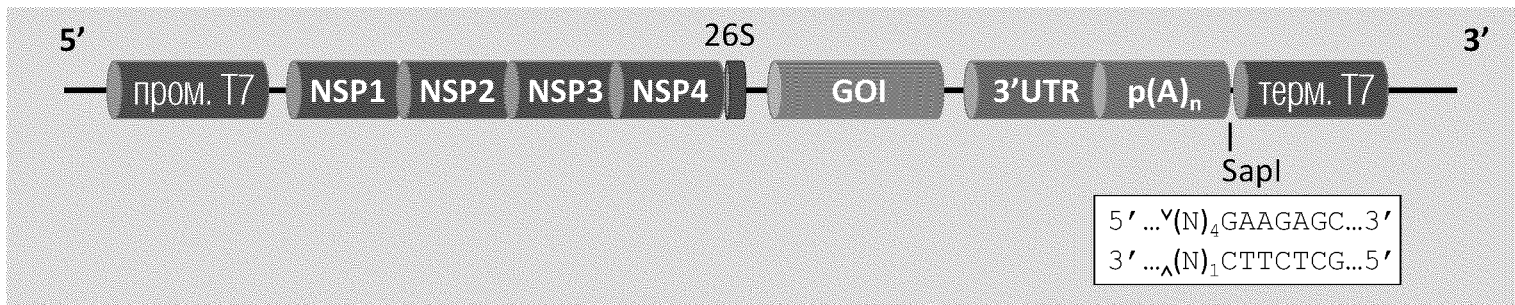
10/17

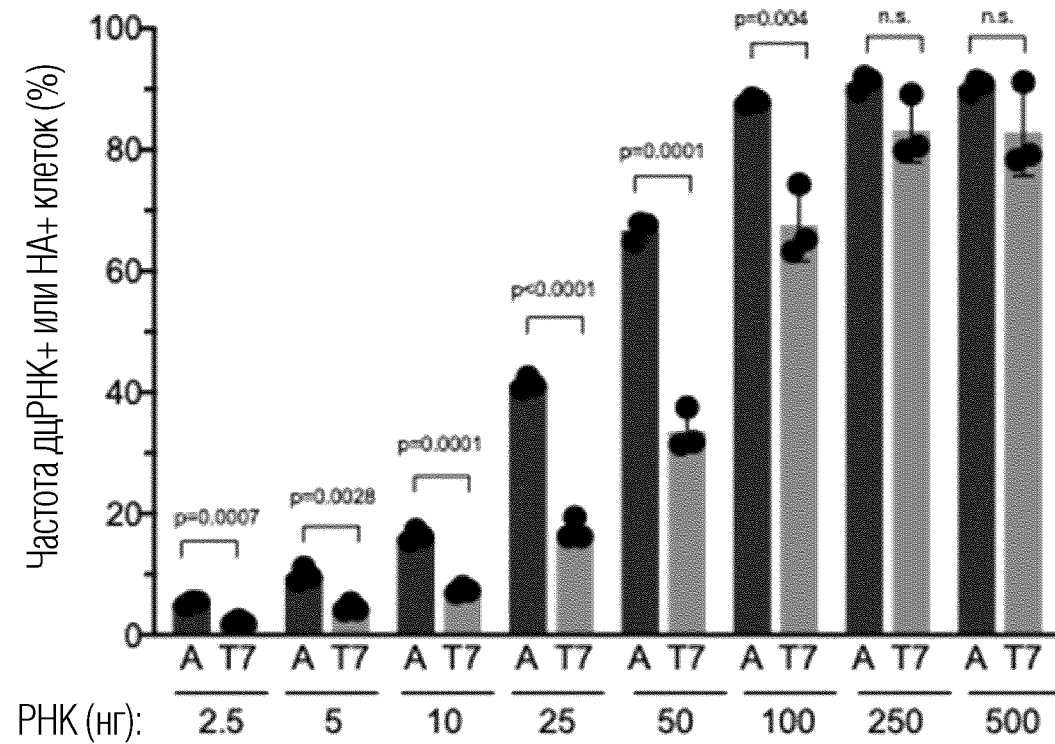
ФИГ. 3F

ФИГ. 4А

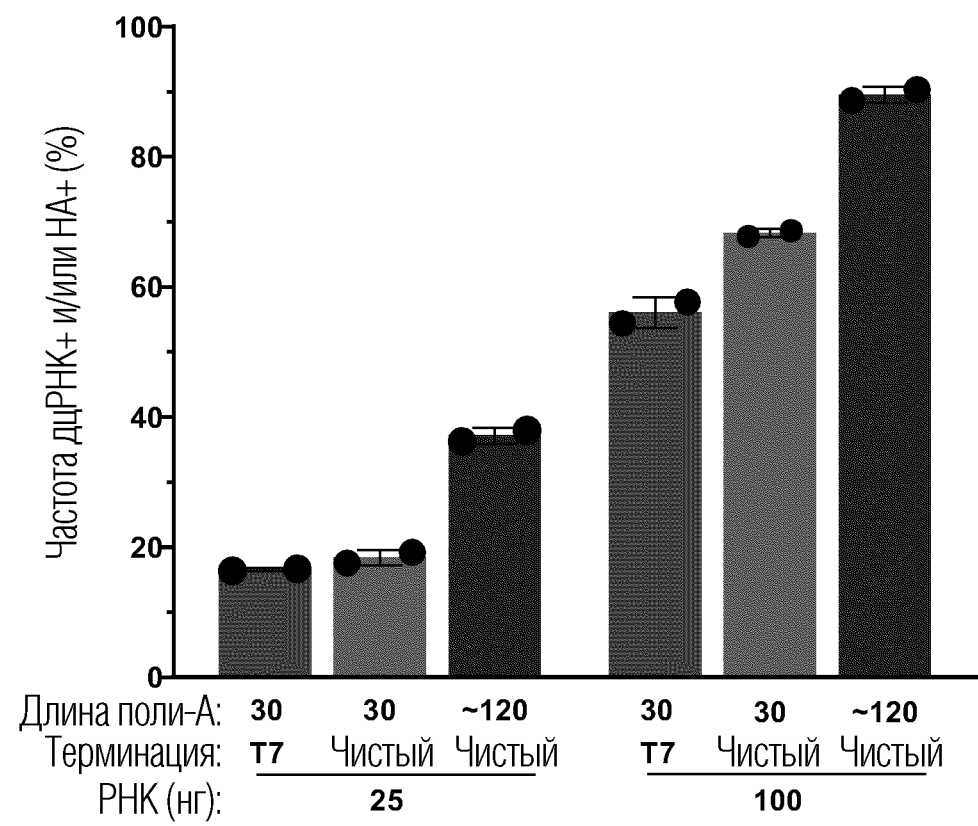


ФИГ. 4В





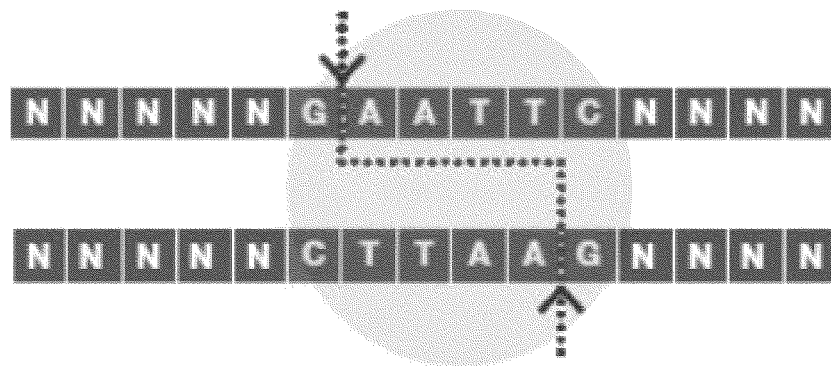
ФИГ. 5



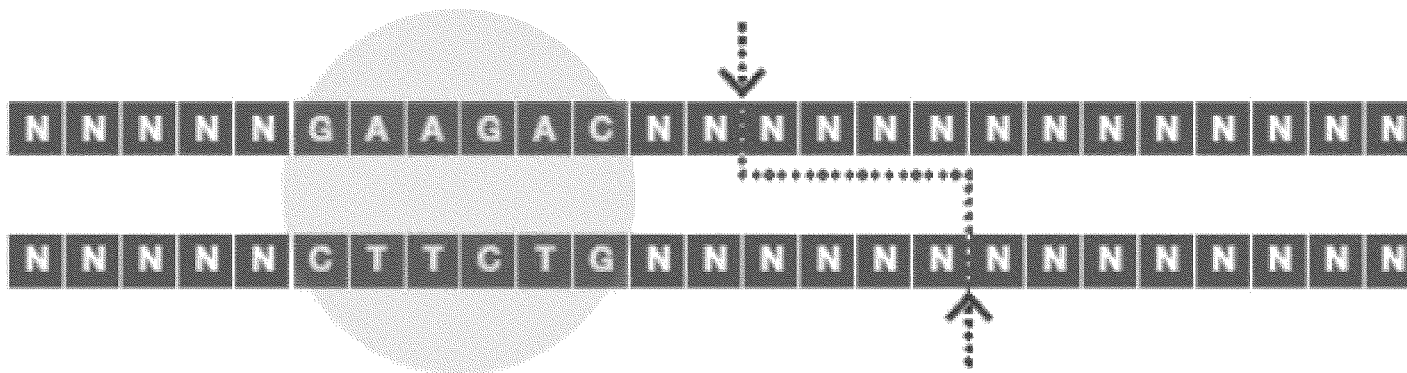
13/17

ФИГ. 6

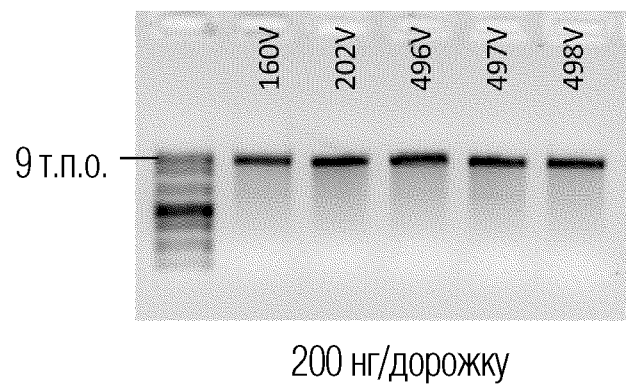
Фермент типа II



Фермент типа IIs



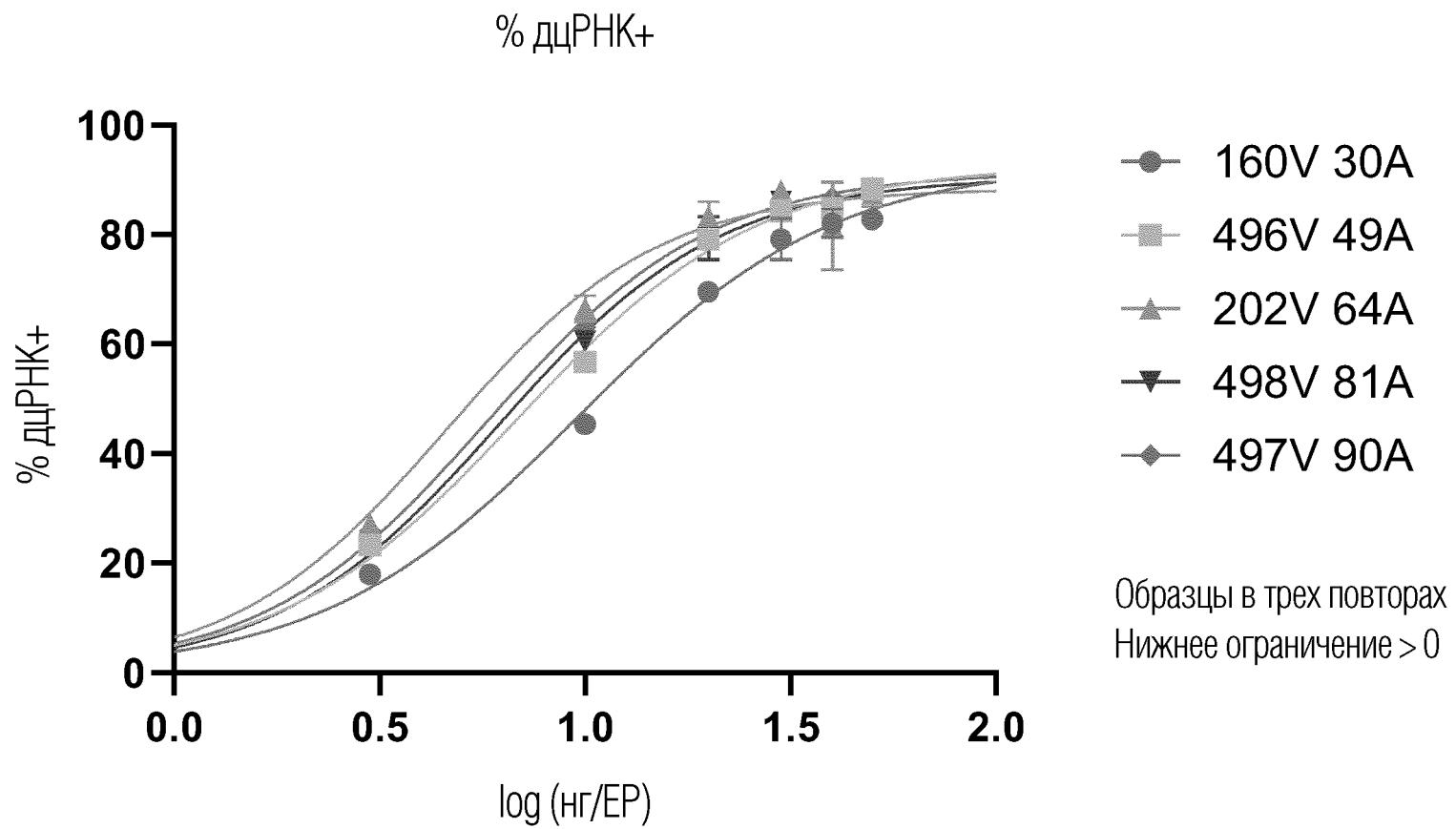
ФИГ. 7



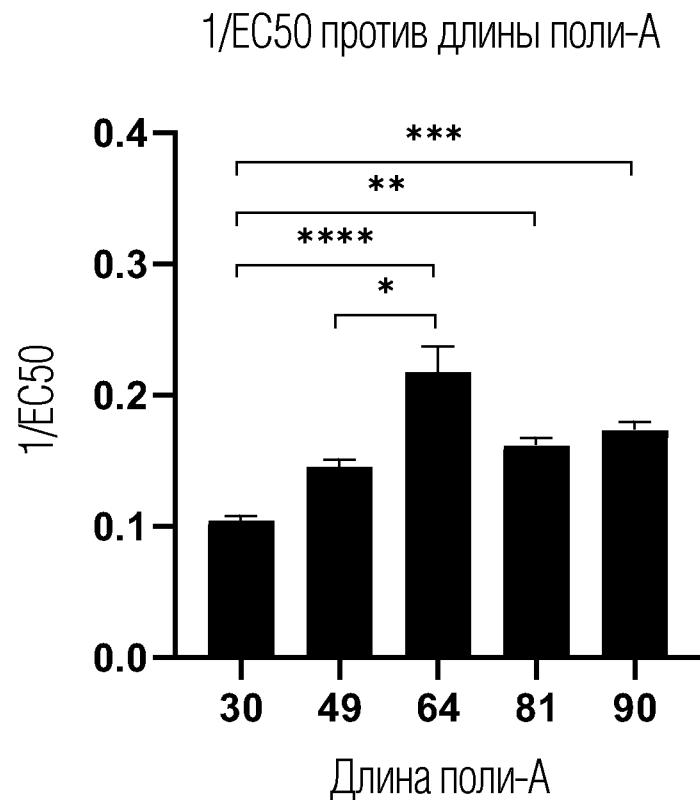
Конструкция	Количество остатков А
160V	30
496V	49
202V	64
498V	81
497V	90

15/17

ФИГ. 8



ФИГ. 9



1/EC50 для лучшей визуализации и сравнения активности срРНК

Статистика:

Однофакторный ANOVA значений $\log(\text{EC50})$ со станд. ошибкой
(критерий множественного сравнения Тьюки)

Значения P:

* = 0.0151

** = 0.0055

*** = 0.0008

**** < 0.0001

ФИГ. 10