



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.10.22

(21) Номер заявки  
202291478

(22) Дата подачи заявки  
2020.11.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)  
*C12N 15/861* (2006.01)  
*C12N 15/863* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ МУТАНТНЫХ CALR И JAK2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

---

(31) 62/936,841; 62/936,846

(32) 2019.11.18

(33) US

(43) 2022.09.05

(86) PCT/IB2020/060713

(87) WO 2021/099906 2021.05.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Аттар Рикардо, Дехарт Джейсон (US),  
Хан Селина (NL), Кришна Вигод,  
Лам Дженифер, Мейн Кристиан (US),  
Сандерс Барбара (NL), Сепульведа  
Мануэль Алехандро, Уилкинсон  
Патрик (US), Цан Роланд (NL)

(74) Представитель:  
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(56) WO-A2-2017211371  
WO-A2-2007047653  
MASAROVA LUCIA ET AL.: "The  
Rationale for Immunotherapy in Myeloproliferative  
Neoplasms", CURRENT HEMATOLOGIC  
MALIGNANCY REPORTS, CURRENT SCIENCE  
INC., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 14, no.  
4, 21 June 2019 (2019-06-21), pages 310-327,

XP036839936, ISSN: 1558-8211, DOI: 10.1007/  
S11899-019-00527-7 [retrieved on 2019-06-21]

WO-A1-2018014008

MEYER H ET AL.: "MAPPING OF  
DELETIONS IN THE GENOME OF THE HIGHLY  
ATTENUATED VACCINIA VIRUS MVA AND  
THEIR INFLUENCE ON VIRULENCE", JOURNAL  
OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR  
GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD,  
GB, vol. 72, 1 January 1991 (1991-01-01), pages  
1031-1038, XP000952390, ISSN: 0022-1317

WO-A1-2018098362

WO-A2-2007104792

HOLMSTRÖM MORTEN O. ET AL.: "High  
frequencies of circulating memory T cells specific  
for calreticulin exon 9 mutations in healthy  
individuals", BLOOD CANCER JOURNAL, vol. 9,  
no. 2, 17 January 2019 (2019-01-17), XP055772862,  
DOI: 10.1038/S41408-018-0166-4, Retrieved from  
the Internet: URL:[http://www.nature.com/articles/  
s41408-018-0166-4](http://www.nature.com/articles/s41408-018-0166-4)>

HOLMSTRÖM M O ET AL.: "The calreticulin  
(CALR) exon 9 mutations are promising targets  
for cancer immune therapy", LEUKEMIA, vol. 32,  
no. 2, 5 July 2017 (2017-07-05), pages 429-437,  
XP055772863, London ISSN: 0887-6924, DOI:  
10.1038/leu.2017.214 Retrieved from the Internet:  
URL:<http://www.nature.com/articles/leu2017214>>

Anonymous: "CALR Exon 9 Mutant  
Peptide Vaccine to Patients With CALR-mutant  
Myeloproliferative Neoplasms: NCT03566446", 25  
June 2018 (2018-06-25), pages 1-5, XP055772869,  
Retrieved from the Internet: URL:[https://  
clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03566446](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03566446) [retrieved  
on 2021-02-05]

(57) Предусмотрены вакцины, полипептиды и полинуклеотиды на основе мутантных последовательностей CALR и JAK2, векторов, клеток-хозяев, вирусов и способы их получения и применения. В настоящем изобретении также предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа и способы лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления начала клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F или CALR, или как мутанта экзона 9 JAK2V617F, так и CALR, при этом способ включает несколько введений любой из композиций, содержащих полинуклеотиды, полипептиды или векторы, раскрытые в данном документе.

---

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Заявка на настоящий патент испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/936841, поданной 18 ноября 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 62/936846, поданной 18 ноября 2019 г., описание каждой из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

### **Перечень последовательностей**

Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и настоящим включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия перечня в формате ASCII, созданная 30 июня 2022 г., называется 103693.002007\_SL.txt и имеет размер 66,656 байт.

### **Область изобретения**

Предусмотрены вакцины, полипептиды и полинуклеотиды на основе мутантных последовательностей кальретикулина (CALR) и Янус-киназы 2 (JAK2), векторов, клеток-хозяев, вирусов и способы их получения и применения.

### **Предпосылки создания изобретения**

Классические миелопролиферативные новообразования (MPN), также называемые BCR-ABL-MPN, являются наиболее частыми заболеваниями среди миелопролиферативных расстройств. MPN характеризуются избыточной выработкой окончательно дифференцированных клеток крови, которые являются полностью функциональными. Классические MPN подразделяют на три состояния: истинную полицитемию (PV), эссенциальную тромбоцитемию (ET) и первичный миелофиброз (PMF), при которых часто возникают связанные с заболеванием осложнения, такие как венозный и артериальный тромбоз, кровоизлияния и трансформация в острый миелоидный лейкоз (AML). Все состояния MPN возникают из одной гемопоэтической стволовой клетки (HSC) с соматической мутацией, которая клонально размножается и дает начало практически всем миелоидным клеткам, а также В- и NK-клеткам. Клональное размножение HSC MPN сопровождается одно- или многолинейной гиперплазией.

PV характеризуется не только избытком эритроцитов и преимущественным поражением эритроидного ростка, но также связана с вариабельной гиперплазией мегакариоцитарного/гранулоцитарного ростков. ET характеризуется повышенным количеством тромбоцитов с мегакариоцитарной гиперплазией, тогда как PMF является более гетерогенным заболеванием, определяемым наличием фиброза костного мозга (в частности, избытка коллагеновых волокон) и мегакариоцитарной гиперплазией. Миелопролиферация при PMF первоначально преобладает в костном мозге, а затем распространяется на экстрамедуллярные участки, такие как селезенка. В начале заболевания часто сложно поставить диагноз, но пересмотренные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) диагностические критерии MPN в 2016 году помогают определить как молекулярные, так и клинические и симптоматические проявления MPN. Однако у многих пациентов наблюдается прогрессирование ET и PV во вторичный миелофиброз (MF). Кроме того, границы между этими тремя расстройствами не могут быть четко установлены, особенно между ET и PMF. Таким образом, могут возникать переходные состояния, описывающие болезненные состояния, такие как префибротический PMF (или ранний PMF), который демонстрирует фенотип ET при постановке диагноза с типичной гистологией костного мозга, но с высокой вероятностью прогрессирования до MF и худшим прогнозом, чем истинная ET.

Более 50% пациентов с MPN имеют мутацию JAK2V617F. Кроме того, мутации в экзоне 9 гена кальретикулина (CALR) обнаруживаются примерно у 60% пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (ET) JAK2 дикого типа или первичным миелофиброзом (PMF).

В 2005 году была обнаружена соматическая мутация G на T в нуклеotide 1849 в экзоне 14 JAK2. Эта мутация приводит к замещению валина на фенилаланин в кодоне 617 (V617F) в псевдокиназном домене JAK2. Эта мутация может быть обнаружена примерно в 70% миелопролиферативных новообразований (MPN): 95% случаев истинной полицитемии (PV) и от 50% до 60% ET и PMF. JAK2V617F часто претерпевает переход от гетерозиготности к гомозиготности из-за возникновения митотической рекомбинации, приводящей к нейтральной по отношению к копиям потере гетерозиготности в области переменного размера на коротком плече хромосомы 9 (9pLOH). JAK2V617F возникает в мультипотентном гемопоэтическом предшественнике, присутствует во всех миелоидных линиях, а также может быть обнаружена в лимфоидных клетках, в основном в В-клетках и клетках-естественных киллерах (NK), а также, реже и на более поздней стадии болезни, в Т-клетках. JAK2V617F в основном ограничивается классическими MPN, за исключением рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом (RARS T). Однако JAK2V617F была обнаружена на очень низком уровне (менее 1%) в нормальной популяции, в том числе у новорожденных. Это одна из наиболее частых мутаций, обнаруживаемых при клональном гематопозе, связанном со старением (клональный гематопоз с неопределенным потенциалом). Наличие мутаций JAK2V71F приводит к конститутивной активации передачи сигналов преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT), что приводит к усилению клеточной пролиферации, активации и аутокринному/паракринному высвобождению. Мутация JAK2V617F также была выявлена у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В 2013 году мутации со сдвигом рамки считывания в экзоне 9 гена CALR были идентифицированы

у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (ЕТ) и первичным миелофиброзом (PMF), у которых отсутствовала мутация V617F в гене JAK2 (JAK2V617F) и мутации в гене рецептора тромбопоэтина (MPL). Было идентифицировано более 50 мутаций со сдвигом рамки считывания, из которых > 85% приводили к идентичному 44-аминокислотному мутантному С-концевому хвосту. Мутация С-концевого хвоста удаляет мотив KDEL (SEQ ID NO: 55), что приводит к потере удержания эндоплазматического ретикулума (ER) и перемещению на мембрану клеточной поверхности. Кроме того, мутантная версия CALR имеет положительно заряженный С-концевой хвост, который нарушает связывание Ca<sup>2+</sup> и ограничивает каноническую функцию. Две наиболее частые мутации CALR соответствуют делеции 52 п. о. (p.L367fs\*46), также называемой типом 1, и вставке 5 п. о. (p.K385fs\*47), также называемой типом 2. Существуют большие различия в частоте между мутациями 1-го и 2-го типа при ЕТ и PMF: при ЕТ мутации 1-го и 2-го типов распределены близко друг к другу (55% против 35%), тогда как при PMF мутации 1-го типа в значительной степени преобладают (75% против 15%). В целом эти результаты указывают на то, что мутантный CALR является онкогенным фактором и что CALRmut индуцирует трансформацию через сигнальный путь MPL-JAK2-STAT.

Пациенты с MPN имеют тяжелое бремя симптомов, опасные для жизни осложнения и риск прогрессирования до острого лейкоза, а также имеют ограниченные возможности лечения. Лечение пациентов с MPN лучше всего разделить на категории наблюдения, медикаментозной терапии и аллогенной трансплантации стволовых клеток (алло-SCT). Медикаментозную терапию саму по себе подразделяют на категории циторедуктивных средств, однокомпонентных ингибиторов JAK и иммуномодулирующего средства интерферона (IFN)- $\alpha$ . Текущим стандартом лечения и единственным одобренным терапевтическим средством, особенно для пациентов с MPN, является низкомолекулярный ингибитор JAK1/2 JAKAFI® (руксолитиниб). JAKAFI® (руксолитиниб) был первым целевым препаратом, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения PMF от среднего до высокого риска, миелофиброза после истинной полицитемии (PPV-MF) и миелофиброза после эссенциальной тромбоцитемии (ЕТ-MF), а также недавно получил одобрение как у пациентов с PV, так и у пациентов с болезнью "трансплантат против хозяина" (GVHD). Эффективность была установлена в исследованиях COMFORT-I и COMFORT-II, показавших значительное уменьшение размера селезенки в качестве основной конечной точки. Однако из-за потери ответа, прогрессирования заболевания и побочных эффектов, связанных с лечением, лечение пришлось отменить примерно 50% пациентов через 3 года и 75% через 5 лет. Терапия JAKAFI® (руксолитиниб) также связана с повышенным риском развития агрессивной В-клеточной лимфомы у пациентов с MF. Действительно, в исследовании 107 пациентов с MF, прекративших лечение JAKAFI® (руксолитиниб), средняя общая выживаемость составила всего 14 месяцев. Несмотря на то, что существует подгруппа пациентов, у которых может быть повышена выживаемость при использовании JAKAFI® (руксолитиниб), у большинства пациентов с MPN заболевание продолжает прогрессировать.

#### **Изложение сущности изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрен полипептид, содержащий по меньшей мере две или более последовательности эпитопов из следующего: эпитоп Янус-киназы 2 (JAK2) SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFCF), эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLYNYGVCFCGDENILVQEFVKFG), эпитоп кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRRTTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) и эпитоп CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRMRMRTK).

В изобретении также предусмотрен полипептид, содержащий два или более повторов SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 повторов SEQ ID NO: 6, разделенной линкерной последовательностью, такой как AAY, RR или DPP, NHAA (SEQ ID NO: 56), HNA, HNL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL или REKR (SEQ ID NO: 59).

В изобретении также предусмотрен полипептид SEQ ID NO: 28 (FCGDENILVAAAYFCGDENILV), содержащий два полипептида SEQ ID NO: 6, связанные неприродной линкерной последовательностью AAY.

В настоящем изобретении также предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, описанные в данном документе, и векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, описанные в данном документе.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа и способы лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F или CALR, или как мутанта экзона 9 JAK2V617F, так и CALR, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, любого из полинуклеотидов, полипептидов или векторов, раскрытых в данном документе.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа и способы лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления начала клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F или CALR, или как мутанта экзона 9 JAK2V617F, так и CALR, при этом способ включает несколько введений любой из композиций,

содержащих полинуклеотиды, полипептиды или векторы, раскрытые в данном документе.

В изобретении также предусмотрено введение антитела к CTLA-4, антитела к PD-1 или антитела к PD-L1 в комбинации с любой из композиций, содержащих полинуклеотиды, полипептиды или векторы, раскрытые в данном документе.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы индуцирования иммунного ответа и способы лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F или CALR, или как мутанта экзона 9 JAK2V617F, так и CALR, причем способ включает введение два или более раз субъекту, нуждающемуся в этом, вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), эпитоп CALR SEQ ID NO: 1 (MKDKQDE-EQRTTRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) и эпитоп CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRMMRTK); где вектор представляет собой Ad26, GAd20, MVA или самореплицирующуюся РНК.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа и способы лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления начала клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F или CALR, или как мутанта экзона 9 JAK2V617F, так и CALR, включают введение два или более раз субъекту, нуждающемуся в этом, вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий два или несколько повторов SEQ ID NO: 6; где вектор представляет собой Ad26, GAd20, MVA или самореплицирующуюся РНК.

В изобретении также предусмотрены способы лечения или предотвращения миелопролиферативного заболевания у субъекта, причем способ включает введение два или более раз субъекту, нуждающемуся в этом, вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), эпитоп CALR SEQ ID NO: 1 (MKDKQDE-EQRTTRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) и эпитоп CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRMMRTK); где вектор представляет собой Ad26, GAd20, MVA или самореплицирующуюся РНК.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показан ответ Т-клеток донора MPN JAK2 V617F+ HLA A02:01+ на эпитопы 1 и 2 mut-JAK2 класса I.

На фиг. 2 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии для выявления ответа IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  как от CD4+, так и от CD8+ Т-клеток. Нормальные донорские дендритные клетки инфицировали векторами аденовируса 26, содержащими либо пустой вектор, либо полинуклеотид, кодирующий LS\_CALR.JAK2 2X9mer SEQ ID NO: 10. Аутологичные CD4/CD8 Т-клетки добавляли к дендритным клеткам через 24 часа после инфицирования. Дендритные клетки и Т-клетки совместно культивировали в течение 11 дней и повторно стимулировали совокупностью пептидов, специфичных для mutCALR.

На фиг. 3 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии для выявления ответа IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  от CD8+ Т-клеток. Нормальные донорские дендритные клетки инфицировали векторами аденовируса 5, содержащими либо пустой вектор, либо полинуклеотид, кодирующий LS\_CALR/JAK2 2X9mer SEQ ID NO: 10. Аутологичные CD8 Т-клетки добавляли к дендритным клеткам через 24 часа после инфицирования. Дендритные клетки и Т-клетки совместно культивировали в течение 11 дней и повторно стимулировали 9-мерными пептидами, специфичными к эпитопу 1 muJAK2 (SEQ ID NO: 5) или эпитопу 2 muJAK2 (SEQ ID NO: 6).

На фиг. 4 показано окрашивание внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии для анализа ответа IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  от CD8+ Т-клеток. Нормальные донорские дендритные клетки инфицировали векторами аденовируса 5, содержащими либо пустой вектор, либо полинуклеотид, кодирующий LS\_CALR.JAK2-30mer SEQ ID NO: 11). Аутологичные CD8 Т-клетки добавляли к дендритным клеткам через 24 часа после инфицирования. Дендритные клетки и Т-клетки совместно культивировали в течение 11 дней и повторно стимулировали 9-мерными пептидами, специфичными к эпитопу 1 mutJAK2 (SEQ ID NO: 5) или эпитопу 2 mutJAK2 (SEQ ID NO: 6).

На фиг. 5 показаны ответы IFN- $\gamma$  при методе иммуноферментных пятен в спленоцитах мышей C57BL/6 или Balb/c, иммунизированных IM с Ad26HEME001 (LS\_CALR\_JAK2-30mer, SEQ ID NO: 11) (n=8/группа) или Ad26.Empty (n=4) в дозе  $10^{10}$  VP, через 2 недели после иммунизации. Спленоциты стимулировали в течение ночи совокупностью 15-мерных пептидов, охватывающей последовательность HEHE001. Количество SFU IFN- $\gamma$  на  $10^6$  спленоцитов определяли с помощью метода иммуноферментных пятен. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирные линии указывают данные анализа, определяемые как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленоцитах ( $43 \text{ SFU}/10^6$  клеток). Статистический анализ был выполнен с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона, значения ниже  $43 \text{ SFU}/10^6$  клеток были установлены в качестве этого порогового значения. VP, вирусная частица; LOD, предел обнаружения.

На фиг. 6 показаны ответы IFN- $\gamma$  при методе иммуноферментных пятен в спленоцитах мышей

C57BL/6 или Balb/c, иммунизированных IM с Ad26HEMEO02 (LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10) (n=8/группа) или Ad26.Empty (n=4) в дозе  $10^{10}$  VP, через 2 недели после иммунизации. Спленциты стимулировали в течение ночи совокупностью 15-мерных пептидов, охватывающей последовательность HEMEO02. Количество SFU IFN- $\gamma$  на  $10^6$  спленцитов определяли с помощью метода иммуноферментных пятен. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирные линии указывают данные анализа, определяемые как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленцитах ( $43 \text{ SFU}/10^6$  клеток). Статистический анализ был выполнен с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона, значения ниже  $43 \text{ SFU}/10^6$  клеток были установлены в качестве этого порогового значения. VP, вирусная частица; LOD, предел обнаружения.

На фиг. 7 показаны ответы IFN- $\gamma$  при методе иммуноферментных пятен в спленцитах мышей C57BL/6, иммунизированных IM с Ad26HEMEO02 (LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10), MVA-HCaJ-9.9 (TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 26) или Ad26.Empty (n=10/группа, за исключением группы 1 [MVA-HCaJ-9.9], в которой было 5 животных, и группы 10 [Ad26.Empty], в которой было 3 животных). На 4 неделе спленциты стимулировали в течение ночи совокупностью пептидов, охватывающей последовательность Ad26HEMEO02. Количество SFU IFN- $\gamma$  на  $10^6$  спленцитов определяли с помощью метода иммуноферментных пятен. Геометрический средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирные линии на графиках указывают данные анализа, определяемые как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленцитах. Для тестирования различий путем сравнения только примированной Ad26HEMEO02 с первичной иммунизацией Ad26HEMEO02 и стимуляцией MVA-HCaJ-9.9 выполняли дисперсионный анализ на данных метода иммуноферментных пятен, преобразованных в  $\log_{10}$ . Пороговыми считали значения ниже  $52 \text{ SFU}/10^6$  клеток. Горизонтальные столбцы соответствуют среднему значению каждой группы. Gr: группа.

На фиг. 8 показаны ответы IFN- $\gamma$  при методе иммуноферментных пятен в спленцитах мышей C57BL/6, иммунизированных IM с Ad26HEMEO02 (LS\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10), MVA-HCaJ-9.9 (TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26) или Ad26.Empty (n=10/группа, за исключением группы 1 [MVA-HCaJ-9.9], в которой было 5 животных, и группы 4 [Ad26.Empty], в которой было 3 животных). На 4 неделе спленциты стимулировали в течение ночи совокупностью пептидов, охватывающей последовательность CALRmut. Количество SFU IFN- $\gamma$  на  $10^6$  спленцитов определяли с помощью метода иммуноферментных пятен. Геометрический средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Пунктирные линии на графиках указывают данные анализа, определяемые как 95% процентиль SFU, наблюдаемый в нестимулированных спленцитах. Для тестирования различий, сравнивая только примированную Ad26HEMEO02 с первичной иммунизацией Ad26HEMEO02 и стимуляцией MVA-HCaJ-9.9, дисперсионный анализ выполняли на данных метода иммуноферментных пятен, преобразованных в  $\log_{10}$ . Значения ниже  $52 \text{ SFU}/10^6$  клеток были установлены в виде порогового значения. Горизонтальные столбцы соответствуют среднему значению каждой группы. Gr: группа.

На фиг. 9 показаны ответы IFN- $\gamma$  при методе иммуноферментных пятен в спленцитах мышей Balb/c, иммунизированных IM с Ad26HEMEO02 (LS\_CALR\_JAK 2-2x9mer; SEQ ID NO: 10), MVA-HCaJ-9.9 (TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26) или Ad26.Empty (n=8/группа). На 4 неделе спленциты выделяли и стимулировали в течение ночи совокупностью пептидов, охватывающей последовательность HEMEO02. Количество SFU IFN- $\gamma$  на  $10^6$  спленцитов определяли с помощью метода иммуноферментных пятен. Средний ответ на группу обозначен горизонтальной линией. Каждая отдельная точка данных вычитается из данных с использованием спленцитов, не стимулированных в течение ночи пептидом, для оценки данных  $\text{SFU}/10^6$  спленцитов. Для тестирования различий при сравнении только примированной Ad26HEMEO02 с первичной иммунизацией Ad26HEMEO02 и стимуляцией MVA-HCaJ-9.9, статистическую значимость оценивали с помощью непарного t-критерия с поправкой Уэльча (неравное стандартное отклонение). SFU: единица, образующая пятно; Ad пустой: Ad26.Empty; только MVA MVA-HCaJ-9.9 (TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26); Ad: Ad26HEMEO02 (LS\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10).

На фиг. 10 показана кинетика индукции IFN- $\gamma$ -продуцирующих человеческих HEMEO02-специфических Т-клеток у нечеловекообразных приматов, иммунизированных Ad26HEMEO02, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10 (Ad) и/или MVA-HCaJ-9.9 TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) отдельно или в комбинации с YERVOY® (ипилидумаб) (Ipi) с течением времени, измеренная с помощью метода иммуноферментных пятен. Измеряли ответы человеческих HEMEO02-специфических Т-клеток на  $10^6$  PBMC с течением времени. Положительный результат анализа определяли как  $\text{SFU}/10^6$  клеток после вычитания фонового ответа  $>50$  и  $\text{SFU}/10^6$  клеток после вычитания фонового ответа  $>2 \times$  средний ответ. Значения, не соответствующие критериям положительности анализа, были скорректированы до  $50 \text{ SFU}/10^6$  клеток. Показаны  $\log_{10}$ -преобразованные данные. Нижняя пунктирная линия была установлена на уровне  $50 \text{ SFU}/10^6$  клеток и соответствовала LOD, тогда как верхняя пунктирная линия была установлена на уровне  $2000 \text{ SFU}/10^6$  клеток и соответствовала ULOQ. Короткие стрелки показывают время иммунизации на группу. Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения. LOD: нижний предел обнаружения; ULOQ: верхний предел количественного обна-

ружения. Gr: группа. Группы из верхней части графика: верхняя линия: Gr4; вторая линия сверху: Gr3, третья линия сверху: Gr2, четвертая линия сверху: Gr1.

На фиг. 11 показана индукция IFN- $\gamma$ -продуцирующих HEME002-специфических Т-клеток у нечеловекообразных приматов, иммунизированных Ad26HEME002, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) и/или MVA-HCalJ-9.9, TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) отдельно или в комбинации с YERVOY® (ипилиумаб) (Ipi) на группу в неделю 2 исследования. Выработку IFN- $\gamma$  оценивали с помощью метода иммуноферментных пятен. Показаны значения после вычитания фона, и значение ниже 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток было установлено равным этому значению (обозначено контурными черными символами). Животные с высоким фоновым ответом >150 SFU/10<sup>6</sup> клеток обозначены серыми символами. Планка указывает среднее значение группы. Статистический анализ был выполнен на полном наборе данных с использованием модели Тобита с критериями отношения правдоподобия и применением корректировки Бонферрони, значимые ответы имеют  $p < 0,05$ . Нижняя пунктирная линия была установлена на уровне 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала LOD, тогда как верхняя пунктирная линия была установлена на уровне 2000 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала ULOQ. Показаны log<sub>10</sub>-преобразованные данные.

На фиг. 12 показана индукция IFN- $\gamma$ -продуцирующих HEME002-специфических Т-клеток у нечеловекообразных приматов, иммунизированных Ad26HEME002, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) и/или MVA-HCalJ-9.9, TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) отдельно или в комбинации с YERVOY® (ипилиумаб) (Ipi) на группу в неделю 2 исследования. Выработку IFN- $\gamma$  оценивали с помощью метода иммуноферментных пятен. Показаны значения после вычитания фона, и значение ниже 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток было установлено равным этому значению (обозначено контурными черными символами). Животные с высоким фоновым ответом >150 SFU/10<sup>6</sup> клеток обозначены серыми символами. Планка указывает среднее значение группы. Статистический анализ был выполнен на полном наборе данных с использованием модели Тобита с критериями отношения правдоподобия и применением корректировки Бонферрони, значимые ответы имеют  $p < 0,05$ . Нижняя пунктирная линия была установлена на уровне 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала LOD, тогда как верхняя пунктирная линия была установлена на уровне 2000 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала ULOQ. Показаны log<sub>10</sub>-преобразованные данные.

На фиг. 13 показана индукция IFN- $\gamma$ -продуцирующих HEME002-специфических Т-клеток у нечеловекообразных приматов, иммунизированных Ad26HEME002, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) и/или MVA-HCalJ-9.9, TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) отдельно или в комбинации с YERVOY® (ипилиумаб) (Ipi) на группу в неделю 6 исследования. Выработку IFN- $\gamma$  оценивали с помощью метода иммуноферментных пятен. Показаны значения после вычитания фона, и значение ниже 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток было установлено равным этому значению (обозначено контурными черными символами). Животные с высоким фоновым ответом >150 SFU/10<sup>6</sup> клеток обозначены серыми символами. Планка указывает среднее значение группы. Статистический анализ был выполнен на полном наборе данных с использованием модели Тобита с критериями отношения правдоподобия и применением корректировки Бонферрони, значимые ответы имеют  $p < 0,05$ . Нижняя пунктирная линия была установлена на уровне 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала LOD, тогда как верхняя пунктирная линия была установлена на уровне 2000 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала ULOQ. Показаны log<sub>10</sub>-преобразованные данные.

На фиг. 14 показана индукция IFN- $\gamma$ -продуцирующих HEME002-специфических Т-клеток у нечеловекообразных приматов, иммунизированных Ad26HEME002, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) и/или MVA-HCalJ-9.9, TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) отдельно или в комбинации с YERVOY® (ипилиумаб) (Ipi) на группу в неделю 10 исследования. Выработку IFN- $\gamma$  оценивали с помощью метода иммуноферментных пятен. Показаны значения после вычитания фона, и значение ниже 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток было установлено равным этому значению (обозначено контурными черными символами). Животные с высоким фоновым ответом >150 SFU/10<sup>6</sup> клеток обозначены серыми символами. Планка указывает среднее значение группы. Статистический анализ был выполнен на полном наборе данных с использованием модели Тобита с критериями отношения правдоподобия и применением корректировки Бонферрони, значимые ответы имеют  $p < 0,05$ . Нижняя пунктирная линия была установлена на уровне 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала LOD, тогда как верхняя пунктирная линия была установлена на уровне 2000 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала ULOQ. Показаны log<sub>10</sub>-преобразованные данные.

На фиг. 15 показана индукция IFN- $\gamma$ -продуцирующих HEME002-специфических Т-клеток у нечеловекообразных приматов, иммунизированных Ad26HEME002, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) и/или MVA-HCalJ-9.9, TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) отдельно или в комбинации с YERVOY® (ипилиумаб) (Ipi) на группу в неделю 16 исследования. Выработку IFN- $\gamma$  оценивали с помощью метода иммуноферментных пятен. Показаны значения после вычитания фона, и значение ниже 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток было установлено равным этому значению (обозначено контурными черными символами). Животные с высоким фоновым ответом >150 SFU/10<sup>6</sup> клеток обозначены серыми символами. Планка указывает среднее значение группы. Статистический анализ был выполнен на полном наборе данных с использованием модели Тобита с критериями отношения правдоподобия и применением корректировки Бонферрони, значимые ответы имеют  $p < 0,05$ . Нижняя пунктирная линия была установлена на уровне 50 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала LOD, тогда как верхняя пунктирная линия была установ-

лена на уровне 2000 SFU/10<sup>6</sup> клеток и соответствовала ULOQ. Показаны log<sub>10</sub>-преобразованные данные.

На фиг. 16 показано, что антитело к CTLA4 ипилимумаб, введенный подкожно, равен введенному внутривенно по примированию антиген-специфических Т-клеточных ответов при NHP. Ипилимумаб вводили в дозе 3 мг/кг внутривенно или подкожно во время иммунизации вектором. Продуцирующие IFN $\gamma$  клетки из 250 тыс. PBMC яванского макака стимулировали в течение ночи пептидами, специфическими по отношению к mutCALR, и анализировали с помощью метода иммуноферментных пятен. Пептидный ответ mutCALR рассчитывали на основе специфического ответа mutCALR - исходные данные. Планка указывает среднее значение группы. Статистический анализ был выполнен на полном наборе данных с использованием модели Тобита с критериями отношения правдоподобия и применением корректировки Бонферрони, значимые ответы имеют  $p < 0,05$ .

На фиг. 17 показано, что включение антитела к PD-1 (ниволумаб 10 мг/кг внутривенно), начиная с 4 недели, в Ad/Ad/MVA + 1 доза (группа 6) или 2 дозы (группа 5) ипилимумаба (п/к) увеличивает величину специфического в отношении mutCALR Т-клеточного ответа по сравнению с животными, получавшими дозу только Ad/Ad/MVA + ипилимумаб (п/к). Ad26: Ad26HEME002, LS\_CALR\_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10; Ipi; ипилимумаб; aPD1: ниволумаб.

На фиг. 18А показано схематическое изображение генома альфа-вируса вируса леса Семлики, однопочечной РНК с положительной чувствительностью, которая кодирует неструктурные полипротеины (nsP1-nsP4; репликаза) на 5'-конце и структурные гены (капсид и гликопротеины) на 3'-конце.

На фиг. 18В показано схематическое изображение иллюстративной самореплицирующейся молекулы РНК (репликона), полученной из репликонов альфавируса, где вирусные структурные гены заменены представляющим интерес геном под транскрипционным контролем субгеномного промотора (SGP). Консервативные элементы последовательности (CSE) на 5'- и 3'-концах действуют как промоторы для транскрипции РНК с минус-цепью и положительной цепью. После доставки репликона в клетку предшественник неструктурного полипротеина (nsP1234) транслируется из транскрибированного *in vitro* репликона. nsP1234 на ранних стадиях аутопротеолитически процессируется до фрагментов nsP123 и nsP4, которые транскрибируют копии репликона с отрицательной цепью. Позже nsP123 полностью процессируется до отдельных белков, которые собираются с репликазой с (+) цепью для транскрипции новых геномных копий с положительной цепью, а также субгеномных транскриптов с (+) цепью, которые кодируют представляющий интерес ген. Субгеномную РНК, а также новую геномную РНК, копируют и полиаденилируют. Неактивные промоторы представляют собой пунктирные стрелки; активные промоторы представляют собой сплошные стрелки.

На фиг. 19 представлена схематическая иллюстрация примера самоамплифицирующейся РНК, полученной из альфа-вируса, который содержит 5'-кэп, неструктурные гены (NSP1-4), субгеномный промотор 26S (серая стрелка), представляющий интерес ген (GOI) и 3'-полиаденилированный хвост. На иллюстрации также показаны пропускающий элемент рибосомы 2А (P2A) и дублированные первые 193 нуклеотида nsP1 ниже 5'-UTR и выше DLP, за исключением стартового кодона.

На фиг. 20 представлена схематическая иллюстрация примера липидной наночастицы (LNP), инкапсулирующей самоамплифицирующуюся РНК, с молярными соотношениями липидных компонентов в процентах, как указано (Geall et al., PNAS, 2012, 109:14604-14609).

На фиг. 21А показано примирование анти-CALR ответов CD4 Т-клеток под действием самореплицирующейся РНК LS.CALR-JAK2-2x9mer. Данные показывают выработку IFN спленоцитами, повторно стимулированными перекрывающейся библиотекой пептидов CALR (незакрашенные столбцы) или ДМСО (серые столбцы), согласно измерению с помощью метода иммуноферментных пятен.

На фиг. 21В показано примирование анти-CALR ответов CD4 Т-клеток под действием самореплицирующейся РНК LS.CALR-JAK2-2x9mer. Данные показывают выработку IFN, TNF $\alpha$  и IL-2 спленоцитами, повторно стимулированными перекрывающимися пептидами CALR, измеренную с помощью проточной цитометрии. Символы представляют отдельных мышей (n=5), столбцы представляют собой среднее значение со стандартным отклонением. \*\*  $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни.

На фиг. 22А показаны липидные наночастицы, составленные из LS.CALR-JAK2-2x9mer самореплицирующейся РНК, примерирующие ответы CD4 Т-клеток антитела к CALR. Мышей Balb/c иммунизировали указанными дозами LNP в составе LS.CALR-JAK2-2x9mer самореплицирующейся РНК, а также несоставленной версией в количестве 20 мкг, и через 14 дней анализировали селезенки. На фиг. показана выработка IFN спленоцитами, повторно стимулированными перекрывающейся библиотекой пептидов CALR (после вычета фона ДМСО), согласно измерению с помощью метода иммуноферментных пятен.

На фиг. 22В показаны липидные наночастицы, составленные из самореплицирующейся РНК LS.CALR-JAK2-2x9mer, примерирующие ответы CD4 Т-клеток против CALR. Данные показывают выработку IFN, TNF $\alpha$  и IL-2 спленоцитами, повторно стимулированными перекрывающимися пептидами CALR, измеренную с помощью проточной цитометрии. Символы представляют отдельных мышей (n=5), столбцы представляют собой среднее значение со стандартным отклонением. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , критерий Манна-Уитни.

На фиг. 23А показаны схемы вакцинации, стимулирующие ответы CD4 Т-клеток против CALR.

Мышей Balb/c примировали, затем стимулировали различными комбинациями Ad26, самореплицирующейся молекулы РНК (репликон) или MVA, как показано на фигуре, после чего анализировали селезенки. На фигуре показана выработка IFN спленocyтaми, повторно стимулированными перекрывающейся библиотекой пептидов CALR (после вычета фона ДМСО), согласно измерению с помощью метода иммуноферментных пятен.

На фиг. 23В показаны схемы вакцинации, стимулирующие ответы CD4 Т-клеток против CALR. Данные показывают выработку IFN, TNF $\alpha$  и IL-2 спленocyтaми, повторно стимулированными перекрывающимися пептидами CALR, измеренную с помощью проточной цитометрии. Символы представляют отдельных мышей, столбцы представляют собой среднее значение со стандартным отклонением. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  критерий Манна-Уитни.

#### Подробное описание

##### Определения.

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в данном документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В данном документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

Термин "около" означает "в пределах приемлемого диапазона ошибки" для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т.е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин "около" означает "в пределах одного среднеквадратичного отклонения" в соответствии с практикой, принятой в данной области, или "в диапазоне до 5%", в зависимости от того, что больше.

Термины "адьювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо и определяются как одно или более веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адьювант используется для усиления иммунного ответа на вакцины по изобретению.

Термин "альтернативный каркас" относится к одноцепочечному белковому каркасу, который содержит структурированную сердцевину, связанную с переменными доменами с высокой конформационной толерантностью. Переменные домены допускают изменение, внесенное без ущерба для целостности каркаса, и, следовательно, переменные домены можно конструировать и выбирать для связывания со специфическим антигеном.

Термин "антигенпрезентирующая клетка" (АПК) относится к любой клетке, которая представляет на своей поверхности антиген в сочетании с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС) - либо с МНС класса I, либо с МНС класса II, либо с обеими молекулами.

Термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, в том числе мышьиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающие свойства родительского полноразмерного антитела. Примерами антигенсвязывающих фрагментов являются определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и/или 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и/или 3, VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), состоящие либо из одного домена VH, либо из одного домена VL. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются в виде отдельных цепей с образованием одновалентного антигенсвязывающего сайта, например одноцепочечного Fv (scFv) или диатела; они описаны, например, в международной патентной публикации № WO 1998/44001, международной патентной публикации № WO 1988/01649, международной патентной публикации № WO 1994/13804 или международной патентной публикации № WO 1992/01047.



Переходные термины "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" предназначены для обозначения их по существу общепринятых патентных значений; т.е. (i) термин "содержащий", который является синонимом терминам "включающий", "содержащий" или "характеризующийся", является включающим или неограниченным и не исключает дополнительные, неуказанные элементы или стадии способа; (ii) "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный в формуле изобретения; и (iii) "состоящий по существу из" ограничивает объем формулы изобретения конкретными материалами или стадиями "и тем, что не оказывает существенного влияния на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и)" заявленного изобретения. Варианты осуществления, описанные в отношении фразы "содержащий" (или его эквивалентов), обеспечивают такое же значение, как варианты осуществления, описанные независимо друг от друга в отношении фразы "состоящий из" и "состоящий по существу из".

"CALR" относится к кальретикулину человека. Белок CALR человека содержит аминокислотную последовательность, как показано, например, под номером доступа UniProt P27797.

"Нисходящая петля" или "мотив DLP" относится к полинуклеотидной последовательности, содержащей по меньшей мере одну петлю-на-стебле РНК, которая при размещении ниже стартового кодона открытой рамки считывания (ORF) обеспечивает повышенную трансляцию ORF по сравнению с идентичной в остальном конструкцией без мотива DLP.

Термины "усилить" или "индуцировать" в отношении иммунного ответа относятся к повышению масштаба и/или эффективности иммунного ответа или увеличению длительности иммунного ответа. Термины используются взаимозаменяемо с термином "усиливаться".

"Последовательность эпитопа", как используется в данном документе, относится к части полипептида или аминокислотной последовательности, например, к части первичной, вторичной, третичной или четвертичной структуры полипептида или аминокислотной последовательности, которая распознается иммунной системой, например, антитела, В-клетки (например, В-лимфоциты) и/или Т-клетки.

Термин "экспрессионный вектор" относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин "вспомогательный элемент" относится к любому полинуклеотидному или полипептидному элементу, функционально связанному с полинуклеотидом или полипептидом, и включает промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, стоп-кодона, белковые метки, такие как гистидиновая метка, и т. п.

Термин "гетерологичный" относится к двум или более полинуклеотидам или двум или более полипептидам, не находящимся в одинаковых отношениях друг к другу в природе.

Термин "иммуногенный фрагмент" относится к полипептиду, который распознается цитотоксическими Т-лимфоцитами, хелперными Т-лимфоцитами или В-клетками, когда фрагмент находится вместе с молекулами МНС класса I или МНС класса II.

Термин "внутри рамки считывания" относится к рамке считывания кодонов в первом полинуклеотиде, которая совпадает с рамкой считывания кодонов во втором полинуклеотиде, которые связаны вместе с образованием гетерологичного полинуклеотида. Полинуклеотид внутри рамки считывания кодирует полипептид, кодируемый как первым полинуклеотидом, так и вторым полинуклеотидом.

Термин "иммуногенный" относится к полипептиду, который содержит один или более иммуногенных фрагментов.

Термин "иммунный ответ" относится к любому ответу на иммуногенный полипептид, или полинуклеотид, или фрагмент иммунной системы субъекта, относящегося к позвоночным. Примеры иммунных ответов включают местные и системные клеточные ответы, а также гуморальный иммунитет, такой как ответы цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), включая антиген-специфическую индукцию CTL CD8+, ответы хелперных Т-клеток, включая пролиферативные Т-клеточные ответы и высвобождение цитокинов, и В-клеточные ответы, включая выделение антител.

Выражение "в комбинации с" означает, что два или более терапевтических средства вводят субъекту вместе в смеси, одновременно в виде отдельных средств или последовательно в виде отдельных средств в любом порядке.

Термин "выделенный" относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин "выделенное" относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены с большей чистотой, такой как 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% чистотой.

"JAK2" относится к Янус-киназе 2 человека. Белок JAK2 человека содержит аминокислотную последовательность, как показано, например, под номером доступа UniProt 0060674.

"Мутант CALR" относится к CALR, несущему одну или более мутаций экзона 9.

"Мутант JAK2" относится к JAK2, несущей мутацию V617F.

Термин "не встречающийся в природе" относится к молекуле, которая не существует в природе.

"Функционально связанные" последовательности включают в себя как последовательности управления экспрессией, которые примыкают к нуклеотидным последовательностям, которые они регулируют, так и регуляторные последовательности, которые действуют в транс-конфигурации или на расстоянии, позволяющем управлять регулируемой нуклеотидной последовательностью.

Термин "филадельфийская хромосома", или "Ph-хромосома", относится к хорошо известной хромосомной транслокации между хромосомами 9 и 22, которая приводит к образованию онкогенного составного гена BCR-ABL с конститутивной тирозинкиназной активностью. Транслокация приводит к тому, что часть гена BCR хромосомы 22q11 сливается с частью гена ABL хромосомы 9q34, и результат обозначается как t(9;22)(q34;q11) в соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры человека (ISCN). В зависимости от точного месторасположения слияния молекулярный вес получающегося составного белка может находиться в диапазоне от 185 до 210 кДа. Термин "филадельфийская хромосома" распространяется на все составные белки BCR-ABL, образованные в результате (9;22)(q34;q11) транслокации.

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Примеры полинуклеотидов включают РНК и ДНК.

Термин "полипептид" или "белок" относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида.

Термины "предотвращать", "предотвращающий", "предотвращение" или "профилактика" заболевания или расстройства означают предотвращение возникновения у субъекта расстройства.

Термины "примирование/стимулирование" или "режим примирования/стимулирования" относятся к способу лечения субъекта, включающему примирование Т-клеточного ответа первой вакциной с последующей стимуляцией иммунного ответа второй вакциной. Первая вакцина и вторая вакцина, как правило, различаются. Такие иммунизации с использованием режима примирования-бустирования вызывают иммунные ответы большей интенсивности и охвата, чем это возможно при примировании и бустировании одной и той же вакциной. На этапе примирования иницируются клеточная память, а на этапе бустирования происходит расширение вторичного иммунного ответа. Бустирование может происходить один или несколько раз.

Термин "рекомбинантный" относится к полинуклеотидам, полипептидам, векторам, вирусам и другим макромолекулам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами.

Термин "рефрактерный" относится к заболеванию, которое не реагирует на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин "рецидивирующий" относится к повторному возникновению заболевания или признаков и симптомов заболевания после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин "репликон" относится к вирусной нуклеиновой кислоте, которая способна направлять генерацию собственных копий и включает РНК, а также ДНК. Например, для получения одноцепочечного РНК-транскрипта, составляющего репликон артеривируса, можно использовать версии двухцепочечной ДНК геномов артеривируса. Как правило, репликон вируса содержит весь геном вируса.

"Репликон РНК" (или "самореплицирующаяся РНК", или "самореплицирующаяся молекула РНК", или "srRNA") относится к молекуле РНК, которая содержит всю генетическую информацию, необходимую для направления собственной амплификации или саморепликации в допустимой клетке. Для управления собственной репликацией молекула РНК: 1) кодирует полимеразу, репликазу или другие белки, которые могут взаимодействовать с белками, происходящими из вируса или клетки-хозяина, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, катализируя процесс амплификации РНК; и 2) содержит цис-действующие последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции РНК, кодируемой репликоном. Самореплицирующуюся РНК, как правило, получают из геномов РНК-вирусов с положительной цепью и ее можно использовать в качестве основы для введения инородных последовательностей в клетки-хозяева путем замены вирусных последовательностей, кодирующих структурные или неструктурные гены, или вставки инородных последовательностей, кодирующих структурные или неструктурные гены, на 5'-конце или 3'-конце. Инородные последовательности могут быть введены в субгеномные области альфа-вирусов. Самореплицирующаяся молекула РНК может быть упакована в рекомбинантные вирусные частицы, такие как рекомбинантные альфа-вирусные частицы, или альтернативно доставлена хозяину с помощью липидных наночастиц (LNP). Самореплицирующаяся РНК может составлять по меньшей мере 1 т. п. н., или по меньшей мере 2 т. п. н., или по меньшей мере 3 т. п. н., или по меньшей мере 4 т. п. н., или по меньшей мере 5 т. п. н., или по меньшей мере 6 т. п. н., или по меньшей мере 7 т. п. н., или по меньшей мере 8 т. п. н., или по меньшей мере 10 т. п. н., или по меньшей мере 12 т. п. н., или по меньшей мере 15 т. п. н., или по меньшей мере 17 т. п. н., или по меньшей мере 19 т. п. н., или по меньшей мере 20 т. п. н., или может составлять 100 п. о.-8 т. п. н. или 500 п. о.-8 т. п. н. или 500

п. о.-7 т. п. н. или 1-7 т. п. н. или 1-8 т. п. н. или 2-15 т. п. н. или 2-20 т. п. н. или 5-15 т. п. н. или 5-20 т. п. н. или 7-15 т. п. н. или 7-18 т. п. н. или 7-20 т. п. н. по размеру. Самореплицирующиеся РНК описаны, например, в WO 2017/180770, WO 2018/075235 и WO 2019143949A2.

Термины "специфически связывается", "специфическое связывание", "специфически связывает" или "связывает" относятся к связыванию белковой молекулы с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем у других антигенов. Как правило, белковая молекула связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации ( $K_D$ ) около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, например около  $5 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-9}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-10}$  М или менее, около  $1 \times 10^{-11}$  М или менее или около  $1 \times 10^{-12}$  М или менее, как правило, со значением  $K=$ , которое по меньшей мере в сто раз ниже его значения  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В контексте молекул, описанных в данном документе, "специфическое связывание" относится к связыванию белковой молекулы с мутантными полипептидами CALR/JAK2, мутантными полипептидами CALR или мутантными полипептидами JAK2 отдельно или в комплексе с HLA без обнаруживаемого связывания с CALR дикого типа или JAK2 отдельно или в комплексе с HLA.

"Субгеномная РНК" относится к молекуле РНК, имеющей меньшие длину или размер, чем геномная РНК, из которой она была получена. Вирусная субгеномная РНК может быть транскрибирована из внутреннего промотора, последовательности которого находятся в геномной РНК или ее комплементе. Транскрипция субгеномной РНК может быть опосредована кодируемой(ыми) вирусом полимеразой(ами), связанной(ыми) с кодируемыми клеткой-хозяином белками, рибонуклеопротеином(ами) или их комбинацией. Многочисленные РНК-вирусы генерируют субгеномные мРНК (sgRNA) для экспрессии их 3'-проксимальных генов. Вирусная субгеномная РНК может быть транскрибирована из внутреннего промотора, последовательности которого находятся в геномной РНК или ее комплементе. Транскрипция субгеномной РНК может быть опосредована кодируемой(ыми) вирусом полимеразой(ами), связанной(ыми) с кодируемыми клеткой-хозяином белками, рибонуклеопротеином(ами) или их комбинацией.

Термин "субгеномный репликон" относится к вирусной нуклеиновой кислоте, которая содержит что-либо меньшее, чем полный комплемент генов и других признаков вирусного генома, но все же способна направлять создание своих копий. Например, субгеномные репликоны артеривируса могут содержать большинство генов неструктурных белков вируса, но в них отсутствует большинство генов, кодирующих структурные белки. Субгеномные репликоны способны направлять экспрессию всех вирусных генов, необходимых для репликации вирусного субгенома (репликация субгеномного репликона), без продукции вирусных частиц.

Термин "пациент" включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин "не относящееся к человеку животное" включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины "индивид" и "пациент" в настоящем документе могут применяться взаимозаменяемо.

Термины "лечить", "лечение" или "терапия" заболевания или расстройства, такого как рак, относятся к достижению одной или более следующих целей: уменьшение тяжести и/или продолжительности расстройства, замедление нарастания выраженности симптомов, характерных для этого расстройства, ограничение или предотвращение рецидива расстройства у субъектов, которые ранее страдали расстройством, либо ограничение или предотвращение рецидива симптомов у субъектов с ранее проявлявшимися симптомами расстройства.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к некоторому количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств, которые включают, например, улучшенное самочувствие субъекта.

"Вакцина" относится к композиции, которая содержит один или несколько иммуногенных полипептидов, полинуклеотиды, кодирующие иммуногенные полипептиды или их фрагменты, векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие иммуногенные полипептиды, или любую их комбинацию, преднамеренно вводимую для индуцирования приобретенного иммунитета у реципиента (например, субъекта).

Термин "вектор" относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы, или может быть перемещен между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или селективные маркеры, функция которых состоит в том, чтобы способствовать удвоению или сохранению таких полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биоло-

гические компоненты, способные к удвоению вектора. Содержащий вектор полинуклеотид может представлять собой молекулы ДНК или РНК или их гибрид.

Термин "вирусный вектор" относится к конструкции вектора, которая включает по меньшей мере один полинуклеотидный элемент вирусного происхождения и может быть упакована в частицу вирусного вектора.

Термины "вариант", "мутант" или "измененный" относятся к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

Полипептиды.

В данном документе раскрыты полипептиды, содержащие последовательности эпитопа мутантного CALR и мутантной JAK2, которые могут вызывать иммунный ответ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRRRMMRTKMRMRRRTRRKMRKMSPAR-PRTSCLQGWTE) или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий последовательности эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2; и эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4. Последовательности эпитопа SEQ ID NO: 1, 2 и 4 могут присутствовать в любом порядке и могут быть разделены линкером. Иллюстративные линкерные последовательности включают AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSYS (SEQ ID NO: 58), SSL или REKR (SEQ ID NO: 59).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий последовательности эпитопа Янус-киназы 2 (JAK2) SEQ ID NO: 6 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6, эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1, и эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2. Последовательности эпитопа SEQ ID NO: 6, 1 и 2 могут присутствовать в любом порядке и могут быть разделены линкером. Иллюстративные линкерные последовательности включают AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSYS (SEQ ID NO: 58), SSL или REKR (SEQ ID NO: 59).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предусмотрен полипептид, содержащий последовательности эпитопа Янус-киназы 2 (JAK2) SEQ ID NO: 6 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6, эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5, эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1, и эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2. Последовательности эпитопа SEQ ID NO: 6, 5, 1 и 2 могут присутствовать в любом порядке и могут быть разделены линкером, таким как AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSYS (SEQ ID NO: 58), SSL или REKR (SEQ ID NO: 59).

В настоящем изобретении также предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотные последовательности одной или нескольких из следующего: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31 или их иммуногенный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6. В изобретении также предусмотрен полипептид, содержащий два или более повторов SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит 2, 3, 4, 5 или более 5 повторов SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления повторы SEQ ID NO: 6 могут быть разделены линкером. Иллюстративные линкерные последовательности включают AAY, RR или DPP, HNAА (SEQ ID NO: 56), HNA, HNL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL или REKR (SEQ ID NO: 59).

В некоторых вариантах осуществления линкеры, раскрытые в данном документе, могут содержать сайт расщепления протеазой, так что полипептиды могут расщепляться *in vivo* у субъекта на пептидные фрагменты, содержащие последовательности эпитопов, что приводит к усилению иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению могут дополнительно содержать лидерную последовательность или последовательность энхансера Т-клеток (TCE) на N-конце. Лидерные последовательности могут увеличивать экспрессию и/или увеличивать иммунологический ответ. Примеры лидерных последовательностей включают  $\alpha$ -цепь рецептора TCR лимфоцитов T<sup>2</sup> (HAVT20) (MАСPGFLWALVISTC LEFSMA; SEQ ID NO: 8), сигнальную последовательность убиквитина на (Ubiq) (MQIFVKTLTGKITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGV; SEQ ID NO: 54), или последовательность энхансера (TCE) Т-клеток, такую как пептидный фрагмент длиной 28 аа, из инвариантной цепи рыбы-мандарина (MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV; SEQ ID NO: 29). Считается, что лидерные последовательности могут способствовать усилению иммунного ответа на описанные в данном документе эпитопы.

Полинуклеотиды.

В настоящем изобретении также предусмотрены полинуклеотиды, которые кодируют любой из полипептидов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, который содержит по меньшей мере две или более последовательности эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPAR-  
PRTSCREACLQGWTE), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предусмотрен полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2; и эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4. Последовательности эпитопа SEQ ID NO: 1, 2 и 4 могут присутствовать в любом порядке и могут быть разделены линкером.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа Янус-киназы 2 (JAK2) SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6, эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1, и эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2. Последовательности эпитопа SEQ ID NO: 6, 1 и 2 могут присутствовать в любом порядке и могут быть разделены линкером.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа Янус-киназы 2 (JAK2) SEQ ID NO: 6 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6, эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5, эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1, и эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2. Последовательности эпитопа SEQ ID NO: 6, 5, 1 и 2 могут присутствовать в любом порядке и могут быть разделены линкером.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6.

В изобретении также предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий два или более повторов SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий 2, 3, 4, 5 или более 5 повторов SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления повторы SEQ ID NO: 6 могут быть разделены линкером.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид выбран из группы, состоящей из:

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 16, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 18, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 19, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 20, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 26, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26; и

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК представляет собой мРНК или самореплицирующуюся РНК.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит промотор, энхансер, сайт полиаденилирования, последовательность Козак, стоп-кодон или любую их комбинацию.

Способы создания полинуклеотидов в соответствии с настоящим описанием известны в данной области и включают в себя химический синтез, ферментативный синтез (например, транскрипцию *in vitro*), ферментативное или химическое расщепление более длинного предшественника, химический синтез более мелких фрагментов полинуклеотидов с последующим лигированием фрагментов или использованием известных способов ПЦР. Синтезированная полинуклеотидная последовательность может быть сконструирована с помощью соответствующих кодонов для желаемой аминокислотной последовательности. Как правило, предпочтительные кодоны могут быть выбраны для предполагаемого хозяина, в котором для экспрессии будет применяться последовательность.

Векторы.

В изобретении также предусмотрены векторы, содержащие любой из раскрытых в данном документе полинуклеотидов. В изобретении также предусмотрены векторы, содержащие полинуклеотид, кодирующий любой из раскрытых в данном документе полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPAR-PRTSCREACLQGWTE), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность

последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации.

Вектор может быть вектором, предназначенным для экспрессии полинуклеотида по настоящему изобретению в любом хозяине, таком как бактерия, дрожжи или млекопитающее. Как правило, приемлемые экспрессионные векторы могут реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры, такие как вызывающие резистентность к ампициллину, резистентность к гигромицину, резистентность к тетрациклину, резистентность к канамицину или резистентность к неомицину, чтобы обеспечивать обнаружение таких клеток, трансформированных или трансдуцированных желаемыми последовательностями ДНК. Примерами векторов являются плазмиды, космиды, фаги, вирусные векторы или искусственные хромосомы.

Подходящими векторами, которые могут применяться, являются бактериальные: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia).

В изобретении предусмотрен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по настоящему изобретению. В изобретении также предусмотрен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид по изобретению.

В изобретении также предусмотрен вирусный вектор, содержащий любой из полинуклеотидов по изобретению.

В изобретении также предусмотрен вирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любой из полипептидов по изобретению.

Вирусные векторы получают из вирусных геномов природного происхождения, которые, как правило, модифицируют так, чтобы они были неспособны к репликации, т.е. не реплицировались. Нереплицирующимся вирусам необходимо предоставление белков в транс-конфигурации для репликации. Как правило, эти белки стабильно или временно экспрессируются в линии вирусных продуцирующих клеток, тем самым допуская репликацию вируса. Таким образом, вирусные векторы являются, как правило, инфекционными и нереплицирующимися. Вирусные векторы могут представлять собой аденовирусные векторы, векторы на основе адено-ассоциированного вируса (AAV) (например, AAV 5-го типа и 2-го типа), векторы аденовируса человекообразных обезьян (GAd), альфавирусные векторы (например, вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEE), вирус Синдбис (SIN), вирус леса Семлики (SFV) и химеры VEE-SIN), векторы на основе вируса герпеса (например, векторы, полученные из цитомегаловирусов, таких как цитомегаловирус резуса (RhCMV)), векторы на основе аренавируса (например, векторы на основе вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV)), векторы на основе вируса кори, векторы на основе поксвируса (например, вирус осповакцины, модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), NYVAC (производное от штамма осповакцины Копенгаген) и векторы на основе авипоксвируса: векторы на основе каннарипокса (ALVAC) и вируса оспы кур (FPV)), векторы на основе вируса везикулярного стоматита, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, вирусоподобные частицы и бактериальные споры.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор получают из аденовируса, поксвируса, альфа-вируса, адено-ассоциированного вируса, ретровируса или самореплицирующейся молекулы РНК.

Аденовирусные векторы.

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор получен из аденовируса.

Аденовирусные векторы могут быть получены из аденовируса человека (Ad), а также из аденовирусов, которые инфицируют другие виды, такие как бычий аденовирус (например, бычий аденовирус 3, BAdV3), аденовирус собаки (например, CAdV2), аденовирус свиньи (например, PAdV3 или 5) или аденовирус человекообразных обезьян, таких как шимпанзе (Pan), горилла (Gorilla), орангутан (Pongo), бонобо (Pan paniscus) и обычный шимпанзе (Pan troglodytes). Как правило, аденовирусы человекообразных обезьян природного происхождения выделяют из образцов кала соответствующих человекообразных обезьян.

Векторы на основе аденовируса человека могут быть получены из различных аденовирусных серотипов, например, из серотипов аденовируса человека hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49 или hAd50 (серотипы также обозначены как Ad5, Ad7, Ad11, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 или Ad50).

Векторы на основе аденовирусов человекообразных обезьян (GAd) могут быть получены из различных аденовирусных серотипов, например из серотипов аденовируса человекообразных обезьян GAd20, Gad19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2 или PanAd3.

Аденовирусные векторы известны в данной области. Последовательности большинства человеческих и не относящихся к человеку аденовирусов известны, а другие могут быть получены с помощью



стандартных процедур. Пример геномной последовательности Ad26 представлен в каталоге GenBank Accession под № EF153474 и под SEQ ID NO: 1 в международной патентной публикации № WO 2007/104792. Пример геномной последовательности Ad35 представлен на Фиг. 6 в международной патентной публикации № WO 2000/70071. Векторы на основе Ad26 описаны, например, в международной патентной публикации № WO 2007/104792. Векторы на основе Ad35 описаны, например, в патенте США № 7,270,811 и международной патентной публикации № WO 2000/70071. Векторы на основе ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd63 и ChAd82 описаны в WO 2005/071093. Векторы на основе PanAd1, PanAd2, PanAd3, ChAd55, ChAd73, ChAd83, ChAd146 и ChAd147 описаны в международной патентной публикации № WO 2010/086189.

Аденовирусные векторы конструируют так, чтобы они включали по меньшей мере одну функциональную делецию или полное удаление продукта гена, необходимого для репликации вируса, такого как одна или более аденовирусных областей E1, E2 и E4, тем самым делая аденовирус неспособным к репликации. Делеция области E1 может содержать делеции E1A, E1B 55K, E1B 21K или любой их комбинации. Аденовирусы с недостаточной репликацией размножают путем получения белков, кодируемых удаленной(ыми) областью(ями), транс-продуцирующими клетками с использованием плазмид хелперов или конструирования продуцирующей клетки для экспрессии необходимых белков. Аденовирусные векторы также могут иметь делецию в области E3, которая является несущественной для репликации, и, следовательно, такая делеция не обязательно должна быть дополненной. Аденовирусный вектор в соответствии с настоящим описанием может содержать функциональную делецию или полное удаление области E1 и по меньшей мере части области E3. Аденовирусный вектор в соответствии с настоящим описанием может дополнительно содержать функциональную делецию или полное удаление области E4 и/или области E2. Подходящими для использования продуцирующими клетками являются клетки сетчатки человека иммортализованные E1, например, клетки 911 или PER.C6 (см., например, патент США № 5994128), преобразованные E1 амниоциты (см., например, EP 1230354), E 1-преобразованные клетки A549 (см., например, международную патентную публикацию № WO 1998/39411, патент США № 5891690); Примерами векторов, которые могут быть использованы, являются Ad26, содержащие функциональную кодирующую область E1, достаточную для репликации вируса, делецию в кодирующей области E3 и делецию в кодирующей области E4, при условии, что открытая рамка считывания 6/7 E4 не удалена (см., например, патент США № 9750801).

В некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор аденовируса человека (Ad). В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad5. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad11. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad7. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad26. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad34. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad3 5. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad48. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad49. В некоторых вариантах осуществления вектор Ad получают из Ad50.

В некоторых вариантах осуществления аденовирусный вектор представляет собой вектор аденовируса человекообразных обезьян (GAd). В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd20. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из Gad19. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd21. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd25. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd26. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd27. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd28. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd29. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd30. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из GAd31. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd3. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd4. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd5. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd6. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd7. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd8. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd9. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd9. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd10. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd11. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd16. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd17. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd19. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd20. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd22. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd24. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd30. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd31. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd32. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd31. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd33. В

некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd37. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd38. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd44. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd55. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd63. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd68. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd73. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd82. В некоторых вариантах осуществления вектор GAd получают из ChAd83. GAd19-21 и GAd25-31 описаны в международной патентной публикации № WO 2019/008111 и представляют собой линии с высокой иммуногенностью и без ранее существовавшего иммунитета в общей популяции людей. Полинуклеотидная последовательность генома GAd20 описана в международной патентной публикации № WO 2019/008111.

Полинуклеотиды в соответствии с настоящим описанием могут быть вставлены в сайт или область (область вставки) вектора, которые не влияют на вирусную жизнеспособность полученного рекомбинантного вируса. Полинуклеотиды в соответствии с настоящим описанием могут быть вставлены в удаленную область E1 в параллельной (транскрибированной от 5' к 3') или антипараллельной (транскрибированной в направлении от 3' к 5' относительно основной цепи вектора) ориентации. Кроме того, соответствующие регуляторные элементы транскрипции, которые способны направлять экспрессию полипептида или полипептида по настоящему изобретению в клетках-хозяевах млекопитающих, для применения которых получен вектор, могут быть функционально связаны с полипептидом или полипептидом по настоящему изобретению.

Рекомбинантные аденовирусные частицы могут быть получены и размножены в соответствии с любой общепринятой методикой в данной области техники (например, международная патентная публикация № WO1996/17070) с использованием комплементарной клеточной линии или вируса хелперов, который поставляет в транс-конфигурации отсутствующие вирусные гены, необходимые для репликации вируса. Линии клеток 293, PER.C6, E1 A549 и 911 обычно используются для делеций комплемента E1. Были созданы другие клеточные линии, комплементарные дефектным векторам (Yeh, et al., 1996, J. Virol. 70: 559-565; Kroughak and Graham, 1995, Human Gene Ther. 6: 1575-1586; Wang, et al., 1995, Gene Ther. 2: 775-783; Lusky, et al., 1998, J. Virol. 72: 2022-203; EP 919627 и международная патентная публикация № WO 1997/04119). Аденовирусные частицы могут быть выделены из супернатанта культуры, а также из клеток после лизиса и при необходимости дополнительно очищены в соответствии со стандартными методиками (например, хроматография, ультрацентрифугирование, как описано в международной патентной публикации № WO 1996/27677, международной патентной публикации № WO1998/00524, международной патентной публикации № WO 1998/26048 и в международной патентной публикации № WO 2000/50573). Конструирование и способы размножения аденовирусных векторов также описаны, например, в патенте США № 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913.

В данном документе предусмотрен вирусный вектор, содержащий любой из полинуклеотидов согласно настоящему изобретению, причем вектор получен из hAd26 (также называемого Ad26).

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 16 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 17 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 18 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 19 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 20 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 21 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 22 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 23 или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления вектор Ad26 содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 24 или





В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления вектор GAd20 содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31.

Векторы на основе поксвируса

Поксвирусные (Poxviridae) векторы могут быть получены из вируса натуральной оспы (вариолы), вируса осповакцины, вируса коровьей оспы или вируса оспы обезьян. Примерами вирусов осповакцины являются вирус осповакцины Копенгаген (W), аттенуированный вирус осповакцины Нью-Йорк (NYVAC), ALVAC, TROVAC или модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA).

MVA происходит из кожного штамма осповакцины Анкара (вирус хориоаллантоисной осповакцины Анкара (CVA)), который сохранялся в Институте вакцинации, Анкара, Турция многие годы и использовался в качестве основы для вакцинации людей. Однако в связи с часто серьезными поствакцинальными осложнениями, связанными с вирусами осповакцины (VACV), предпринималось несколько попыток получить более ослабленную, более безопасную вакцину против вируса натуральной оспы.

MVA получали с помощью 516 последовательных пассажей на фибробластах куриного эмбриона вируса CVA (Meyer et al., J. Gen. Virol., 72: 1031-1038 (1991) и патент США № 10,035,832). Вследствие этих длительных пассажей полученный вирус MVA удалил около 31 т. п. н. из геномной последовательности и, следовательно, описывался как высоко рестриктированный к птичьим клеткам (Meyer, H. et al., Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038, 1991; Meisinger-Henschel et al., Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara, J. Gen. Virol. 88, 3249-3259, 2007.) Сравнение генома MVA с его родительским геномом (CVA) позволило выявить 6 основных делеций геном-

ной ДНК (делеции I, II, III, IV, V и VI) с полным количеством пар оснований 31,000. (Meyer et al., J. Gen. Virol. 72:1031-8 (1991)). В различных моделях на животных было показано, что полученный в результате MVA был в значительной степени невирулентный (Mayr, A. & Danner, K. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions, Dev. Biol. Stand. 41: 225-34, 1978). Поскольку для ослабления MVA использовали множество пассажей, существует ряд различных штаммов или изолятов в зависимости от числа пассажей в клетках CEF, таких как MVA 476 MG/14/78, MVA-571, MVA-572, MVA-574, MVA-575 и MVA-BN. MVA 476 MG/14/78 описан, например, в международной патентной публикации № WO 2019/115816A1. Штамм MVA-572 депонирован в Европейской коллекции культур клеток животных ("ECACC"), Агентство по защите здоровья, Отдел микробиологии, Porton Down, Salisbury SP4 OJG, United Kingdom (Великобритания), под номером депонирования ECACC 94012707 от 27 января 1994 г. Штамм MVA-575 депонирован в ECACC под номером депонирования ECACC 00120707 от 7 декабря 2000 года; Штамм MVA-Bavarian Nordic (MVA-BN) депонирован в ECACC под номером депонирования V00080038 от 30 августа 2000 г. Геномные последовательности MVA-BN и MVA-572 доступны в GenBank (учетные номера DQ983238 и DQ983237 соответственно). Геномные последовательности других штаммов MVA могут быть получены с использованием стандартных способов секвенирования.

Векторы и вирусы согласно настоящему изобретению могут быть получены из любого штамма MVA или дополнительных производных штамма MVA. Дополнительным примером штамма MVA является депонированный VR-1508, депонированный в Американской коллекции типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния. 20108, США.

Термин "производные" MVA относится к вирусам, показывающим по существу такие же характеристики, как и у исходного MVA, но показывающим различия в одной или более частях их геномов.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA получают из MVA 476 MG/14/78. В некоторых вариантах осуществления вектор MVA получают из MVA-571. В некоторых вариантах осуществления вектор MVA получают из MVA-572. В некоторых вариантах осуществления вектор MVA получают из MVA-574. В некоторых вариантах осуществления вектор MVA получают из MVA-575. В некоторых вариантах осуществления вектор MVA получают из MVA-BN.

Полинуклеотид в соответствии с настоящим описанием может быть вставлен в сайт или область (область вставки) вектора MVA, которые не влияют на вирусную жизнеспособность полученного рекомбинантного вируса. Такие области можно легко идентифицировать путем тестирования сегментов вирусной ДНК на области, которые обеспечивают рекомбинантное образование, не оказывая существенного влияния на вирусную жизнеспособность рекомбинантного вируса. Ген тимидинкиназы (ТК) представляет собой область вставки, которая может применяться и присутствовать во многих вирусах, например во всех исследованных геномах поксвирусов. Кроме того, MVA содержит 6 сайтов естественной делеции, каждый из которых может быть использован в качестве мест вставки (например, делеция I, II, III, IV, V и VI; см., например, патент США № 5185146 и патент США № 6.440,442. В качестве места вставки можно также использовать одну или более межгенных областей (IGR) MVA, таких как IGRIGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 и IGR 148/149 (см., например, патентные публикации США №2018/0064803). Дополнительные подходящие места вставки описаны в международной патентной публикации № WO 2005/048957.

Рекомбинантные поксвирусные частицы, такие как гMVA, получают, как описано в данной области (Piccini, et al., 1987, Methods of Enzymology 153: 545-563; патент США № 4,769,330; патент США № 4,772,848; патент США № 4,603,112; патент США № 5,100,587 и патент США № 5,179,993). В примере способа последовательность ДНК для вставки в вирус может быть помещена в конструкт плазмиды *E. coli*, в который была вставлена ДНК, гомологичная участку ДНК MVA. Отдельно вставляемую последовательность ДНК может быть лигирована с промотором. Связь промотор-ген может быть расположена в конструкте плазмиды так, чтобы связь промотор-ген фланкировалась с обоих концов ДНК, гомологичной последовательности ДНК, фланкирующей область ДНК MVA, содержащую несущественный локус. Полученный в результате конструкт плазмиды может быть амплифицирован путем размножения внутри бактерий *E. coli* и выделен. Выделенная плазида, содержащая вставляемую последовательность гена ДНК, может быть трансфицирована в клеточную культуру, например фибробластов куриного эмбриона (CEF), одновременно с инфицированием культуры MVA. Рекомбинация между гомологичной ДНК MVA в плазмиде и вирусным геномом соответственно может генерировать MVA, модифицированный посредством присутствия чужеродных последовательностей ДНК. Частицы гMVA могут быть выделены из супернатанта культуры или из культивированных клеток после этапа лизиса (например, химический лизис, замораживание/размораживание, осмотический шок, обработка ультразвуком и т. п.). Для удаления загрязняющего вируса дикого типа можно использовать последовательные циклы очистки бляшкообразования. Затем вирусные частицы могут быть очищены с помощью методик, известных специалистам в данной области (например, хроматографические способы или ультрацентрифугирование на хлориде цезия или градиенте сахарозы).

В данном документе предусмотрен вирусный вектор, содержащий любой из полинуклеотидов по настоящему изобретению, причем вектор получен из MVA.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид SEQ ID NO: 16 или



меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления вектор MVA содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31.

Самореплицирующиеся молекулы РНК.

Самореплицирующаяся РНК может быть получена из альфа-вируса. Альфа-вирусы могут принадлежать к группе VEEV/EEEV, группе SF или группе SIN. Неограничивающие примеры альфа-вирусов группы SF включают вирус леса Семлики, вирус О'Ньонг-Ньонг, вирус Росс-Ривер, вирус Мидделбурга, вирус Чикунгунья, вирус леса Барма, вирус Getah, вирус Маяро, вирус Сагияма, вирус Бебару и вирус Уна. Неограничивающие примеры альфа-вирусов группы SIN включают вирус Синдбис, вирус Гирдвуд С. А., южноафриканский арбовирус № 86, вирус Окельбо, вирус Aura, вирус Бабанки, вирус Whataroa и вирус Кызылагач. Неограничивающие примеры альфа-вирусов группы VEEV/EEEV включают вирус восточного энцефалита лошадей (EEEV), вирус венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вирус эверглейд (EVEV), вирус Мукамбо (MUCV), вирус Пиксуна (PIXV), вирус Мидделбурга (MIDV), вирус Чикунгунья (CHIKV), вирус О'Ньонг-Ньонг (ONNV), вирус Росс-Ривер (RRV), вирус леса Бармах (BF), вирус Getah (GET), вирус Сагияма (SAGV), вирус Бебару (BEBV), вирус Маяро (MAYV) и вирус Уна (UNAV).

Самореплицирующиеся молекулы РНК могут быть получены из геномов альфа-вирусов, что означает, что они имеют некоторые структурные характеристики геномов альфа-вирусов или сходны с ними. Самореплицирующиеся молекулы РНК могут быть получены из модифицированных геномов альфа-вируса.

Самореплицирующиеся молекулы РНК могут быть получены из вируса восточного энцефалита лошадей (EEEV), вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV), вируса эверглейда (EVEV), вируса Мукамбо (MUCV), вируса леса Семлики (SFV), вируса Пиксуна (PIXV), вируса Мидделбурга (MIDV), вируса Чикунгунья (CHIKV), вируса О'Ньонг-Ньонг (ONNV), вируса Росс-Ривер (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 Highland J (HJV), вируса Форт-Моргана (FMV), вируса Ндumu (NDUV) и вируса Багги-Крик. Подходят как вирулентные, так и авирулентные штаммы альфа-вируса. В некоторых вариантах осуществления репликон РНК альфа-вируса относится к вирусу Синдбис (SIN), вирусу леса Семлики (SFV), вирусу Росс-Ривер (RRV), вирусу венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) или вирусу восточного энцефалита лошадей (EEEV).



В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК, полученная из альфа-вируса, представляет собой вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV).

Самореплицирующиеся молекулы РНК могут содержать последовательности РНК (или кодируемые аминокислотные последовательности) генома альфа-вируса дикого типа Нового Света или Старого Света. Любая из самореплицирующихся молекул РНК, описанных в данном документе, может содержать последовательности РНК, "полученные из" или "на основе" последовательностей генома альфа-вируса дикого типа, что означает, что они имеют по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 65%, или по меньшей мере 68%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%, или 80-99%, или 90-100%, или 95-99%, или 95-100%, или 97-99%, или 98-99% идентичность последовательности с последовательностью РНК (которая может быть соответствующей последовательностью РНК) из генома РНК альфа-вируса дикого типа, который может быть геномом альфа-вируса Нового Света или Старого Света.

Самореплицирующиеся молекулы РНК содержат всю генетическую информацию, необходимую для управления собственной амплификацией или саморепликацией в перmissive клетке. Для управления собственной репликацией самореплицирующиеся молекулы РНК кодируют полимеразу, репликазу или другие белки, которые могут взаимодействовать с белками, происходящими из вируса или клетки-хозяина, нуклеиновыми кислотами или рибонуклеопротеинами, чтобы катализировать процесс амплификации РНК; и содержат *cis*-действующие последовательности РНК, необходимые для репликации и транскрипции РНК, кодируемой репликоном. Таким образом, репликация РНК приводит к образованию множества дочерних РНК. Эти дочерние РНК, а также коллинеарные субгеномные транскрипты могут быть транслированы для обеспечения экспрессии интересующего гена *in situ* или могут быть транскрибированы для получения дополнительных транскриптов с тем же смыслом, что и доставленная РНК, которые транслируются для обеспечения экспрессии *in situ* интересующего гена. Общими результатами этой последовательности транскрипций является огромное увеличение количества введенных репликонов РНК, и поэтому интересующий кодируемый ген становится основным полипептидным продуктом клеток.

В геноме альфа-вирусов есть две открытые рамки считывания (ORF), неструктурные (ns) и структурные гены, ns ORF кодирует белки (nsP1-nsP4), необходимые для транскрипции и репликации вирусной РНК, продуцируются в виде полипротеина и являются механизмом репликации вируса. Структурная ORF кодирует три структурных белка: основной нуклеокапсидный белок С и оболочечные белки Р62 и Е1, которые связываются в виде гетеродимера. Поверхностные гликопротеины вируса, закрепленные на мембране, отвечают за распознавание рецепторов и проникновение в клетки-мишени посредством слияния мембран. Четыре гена ns-белка кодируются генами в 5'-двух третях генома, в то время как три структурных белка транслируются с субгеномной мРНК, коллинеарной 3'-трети генома. Типичное изображение генома альфа-вируса показано на фиг. 18А.

Самореплицирующиеся молекулы РНК можно использовать в качестве основы для введения чужеродных последовательностей в клетки-хозяева путем замены вирусных последовательностей, кодирующих структурные гены, или путем вставки чужеродных последовательностей 5' или 3' последовательностей, кодирующих структурные гены. Их можно сконструировать для замены вирусных структурных генов ниже репликазы, которые находятся под контролем субгеномного промотора, интересующими генами (GOI), например, полинуклеотид, кодирующий полипептид по настоящему изобретению. При трансфекции репликаза, которая транслируется немедленно, взаимодействует с 5'- и 3'-концами геномной РНК и синтезирует комплементарные копии геномной РНК. Они действуют как матрицы для синтеза новых положительно-цепочечных, кэпированных и полиаденилированных геномных копий и субгеномных транскриптов (фиг. 18В). Амплификация в конечном итоге приводит к очень высокому количеству копий РНК, до  $2 \times 10^5$  копий на клетку. Результатом является равномерная и/или повышенная экспрессия GOI (например, полинуклеотида, кодирующего полипептид по настоящему изобретению), который может повлиять на эффективность вакцины или терапевтическое воздействие лечения. Таким образом, вакцины на основе самореплицирующихся молекул РНК могут иметь очень низкую дозировку из-за очень большого количества генерируемых копий РНК по сравнению с обычным вирусным вектором. Одно из существенных достоинств композиций и способов, раскрытых в данном документе, заключается в том, что эффективность вакцины может быть повышена у лиц, находящихся в хроническом или остром состоянии иммунной активации.

Самореплицирующиеся молекулы РНК по настоящему изобретению, содержащие РНК, кодирующую полипептиды эпитопа 2 CALR/JAK2 или JAK2 согласно настоящему изобретению, можно использовать в качестве терапевтических средств путем их доставки субъекту, страдающему миелопролиферативными новообразованиями, с использованием различных технологий, включая вирусные векторы, как описано в данном документе или другие технологии доставки, также описанные в данном документе.

В изобретении предусмотрена самореплицирующаяся молекула РНК, содержащая всю генетическую информацию, необходимую для управления собственной амплификацией или саморепликацией в перmissive клетке.





В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит последовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности, или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 31.

Любая из вышеуказанных самореплицирующихся молекул РНК может дополнительно содержать одно или более из следующего:

один или несколько неструктурных генов nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4; по меньшей мере одно из мотива DLP, 5' UTR, 3'UTR и поли-А; и субгеномного промотора.

В некоторых вариантах осуществления, например, самореплицирующаяся молекула РНК может содержать одно или более из следующего:

один или несколько неструктурных генов nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4; по меньшей мере одно из мотива DLP, 5' UTR, 3'UTR и поли-А; и субгеномный промотор; и

РНК, кодирующая аминокислоты SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 31, и функционально связана с субгеномным промотором.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит последовательность РНК, кодирующую белок или пептид; 5' - и 3' -нетранслируемые области альфа-вируса; Последовательности РНК, кодирующие аминокислотные последовательности, полученные из неструктурных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 альфа-вируса Нового Света VEEV; субгеномного промотора, функционально связанного с трансляцией последовательности РНК, кодирующей белок, и регулирующего ее; 5'-кэпа и 3'-поли-А-хвоста; положительной смысловой одноцепочечной РНК; DLP из вируса Синдбис выше неструктурного белка 1 (nsP1); элемент пропуска рибосомы 2A и нуклеотидного повтора nsP1 ниже от 5'-UTR и выше DLP.

В некоторых вариантах осуществления молекулы самореплицирующейся РНК могут составлять по меньшей мере 1 т. п. н., или по меньшей мере 2 т. п. н., или по меньшей мере 3 т. п. н., или по меньшей мере 4 т. п. н., или по меньшей мере 5 т. п. н., или по меньшей мере 6 т. п. н., или по меньшей мере 7 т. п. н., или по меньшей мере 8 т. п. н., или по меньшей мере 10 т. п. н., или по меньшей мере 12 т. п. н., или по меньшей мере 15 т. п. н., или по меньшей мере 17 т. п. н., или по меньшей мере 19 т. п. н., или по меньшей мере 20 т. п. н., или могут составлять 100 п. о.-8 т. п. н. или 500 п. о.-8 т. п. н. или 500 п. о.-7 т. п. н. или 1-7 т. п. н. или 1-8 т. п. н. или 2-15 т. п. н. или 2-20 т. п. н. или 5-15 т. п. н. или 5-20 т. п. н. или 7-15 т. п. н. или 7-18 т. п. н. или 7-20 т. п. н. по размеру.

Любая из описанных выше самореплицирующихся молекул РНК может дополнительно включать последовательность, кодирующую пептид аутопротеазы (например, аутокаталитический саморасщепляющийся пептид), где последовательность, кодирующая аутопротеазу, необязательно функционально связана выше со второй последовательностью нуклеиновой кислоты.

Как правило, любой сайт протеолитического расщепления, известный в данной области техники, может быть включен в молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и может представлять собой, например, последовательности протеолитического расщепления, которые расщепляются протеазой после выработки. Другие подходящие сайты протеолитического расщепления также включают последовательности протеолитического расщепления, которые могут быть расщеплены после добавления внешней протеазы. Используемый в данном документе термин "аутопротеаза" относится к "саморасщепляющемуся" пептиду, который обладает аутопротеолитической активностью и способен отщеплять себя от большего полипептидного фрагмента. Аутопротеаза была впервые идентифицирована в вирусе ящура (FMDV), члене группы пикорнавирусов; впоследствии было идентифицировано несколько аутопротеаз, таких как, например, "2A-подобные" пептиды из вируса ринита лошадей А (E2A), тешовируса-1 свиней (P2A) и вируса *Thosa asigna* (T2A), и их активность в протеолитическом расщеплении была показана также в различных эукариотических системах *ex vitro* и *in vivo*. Таким образом, понятие аутопротеаз доступно специалистам в данной области техники, поскольку было идентифицировано множество встречающихся в природе систем аутопротеаз. Хорошо изученными системами аутопротеаз являются, например, вирусные протеазы, белки развития (например, *HerR*, белки хеджехог), домен аутопротеазы *RumA*, *UmuD* и т. д.). Неограничивающие примеры аутопротеазных пептидов, подходящих для композиций и способов по настоящему изобретению, включают пептидные последовательности свиного тешовируса-1 2A (P2A), вируса ящура 2A (F2A), вируса ринита А лошадей (ERAV) 2A (E2A), вируса *Thesa asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроса 2A (VmCPV2A), вирус Флашерия 2A (VmIFV2A) или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность аутопротеазного пептида функционально связана ниже мотива DLP и выше первого и второго полинуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления аутопротеазный пептид содержит или состоит из пептидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из свиного тешовируса-1 2A (P2A), вируса ящура 2A (F2A), вируса ринита А лошадей (ERAV) 2A (E2A), вируса *Thesa asigna* 2A (T2A), вирус цитоплазма-

тического полиэдроза 2А (BmCPV2A), вирус Флашерия 2А (BmIFV2A) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления аутопротеазный пептид включает пептидную последовательность свиного тешовируса-1 2А (P2A).

В некоторых вариантах осуществления аутопротеазный пептид выбран из группы, состоящей из свиного тешовируса-1 2А (P2A), вируса ящура 2А (F2A), вируса ринита А лошадей (ERAV) 2А (E2A), вируса *Thesa asigna* 2А (T2A), вируса цитоплазматического полиэдроза 2А (BmCPV2A), вируса Флашерия 2А (BmIFV2A) или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления аутопротеазный пептид представляет собой свиной тешовирус-1 2А (P2A).

Включение пептида P2A в репликоны модифицированной вирусной РНК по настоящему изобретению позволяет высвобождать белок, кодируемый GOI (например, полипептид CALR-JAK2 или эпитоп 2 JAK2 по настоящему изобретению) из слияния капсид-GOI.

В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, пептидная последовательность 2А (P2A) свиного тешовируса-1 сконструирована в рамке считывания сразу после последовательности DLP и в рамке считывания непосредственно перед всеми GOI.

Любая из описанных выше самореплицирующихся молекул РНК может дополнительно включать мотив нисходящей петли (DLP) кодирующей последовательности.

Некоторые вирусы имеют последовательности, способные образовывать одну или несколько структур "петля-на-стебле", которые регулируют, например, увеличение экспрессии капсидных генов. Эхансер вирусного капсида, используемый в данном документе, относится к регуляторному элементу, содержащему последовательности, способные образовывать такие структуры "петля-на-стебле". В некоторых примерах структуры "петля-на-стебле" образованы последовательностями внутри кодирующей последовательности капсидного белка и называются последовательностями нисходящей петли (DLP). Как раскрыто в данном документе, эти структуры "петля-на-стебле" или их варианты можно использовать для регуляции, например, повышения уровня экспрессии представляющих интерес генов. Например, эти структуры "петля-на-стебле" или их варианты можно использовать в рекомбинантном векторе (например, в гетерологичном вирусном геноме) для усиления транскрипции и/или трансляции кодирующей последовательности, функционально связанной с ним ниже.

Известно, что репликация альфа-вируса в клетках-хозяевах индуцирует двухцепочечную РНК-зависимую протеинкиназу (PKR). PKR фосфорилирует эукариотический фактор инициации трансляции 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). Фосфорилирование eIF2 $\alpha$  блокирует инициацию трансляции мРНК и тем самым препятствует завершению продуктивного цикла репликации вирусов. Заражение клеток вирусом Синдбис индуцирует PKR, что приводит к фосфорилированию eIF2 $\alpha$ , при этом вирусная субгеномная мРНК эффективно транслируется, в то время как трансляция всех других клеточных мРНК ограничена. Эффективная трансляция вирусной субгеномной мРНК в вирусе Синдбис возможна благодаря наличию стабильной петли шпильки РНК (или мотива DLP), расположенной ниже кодона инициатора AUG дикого типа для вирусного капсидного белка (например, капсидного эхансера). Сообщалось, что структура DLP может задерживать рибосому на AUG дикого типа, и это поддерживает трансляцию субгеномной мРНК без потребности в функциональном eIF2 $\alpha$ . Таким образом, субгеномные мРНК вируса Синдбис (SINV), как и других альфа-вирусов, эффективно транслируются даже в клетках с высокоактивной PKR, что приводит к полному фосфорилированию eIF2 $\alpha$ .

Структура DLP была впервые охарактеризована в мРНК вируса Синдбис 26S (SINV), а также обнаружена в вирусе леса Семлики (SFV). Сообщается, что аналогичные структуры DLP присутствуют у по меньшей мере 14 других представителей рода альфа-вирусов, включая Новый Свет (например, MAYV, UNAV, EEEV (NA), EEEV (SA), AURAV) и Старый Свет (SV, SFV, BEBV, RRV, SAG, GETV, MIDV, CHIKV и ONNV). Предсказанные структуры этих мРНК альфа-вируса 26S были сконструированы на основании данных SHAPE (селективное 2'-гидроксилацилирование и удлинение праймера) (Toribio et al., *Nucleic Acids Res.* May 19; 44(9):4368-80, 2016), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки). Стабильные структуры "петля-на-стебле" были обнаружены во всех случаях, кроме CHIKV и ONNV, тогда как MAYV и EEEV показали более низкую стабильность DLP (Toribio et al., 2016, см. выше). Самая высокая активность DLP была зарегистрирована для тех альфа-вирусов, которые содержали наиболее стабильные структуры DLP.

Например, представители рода альфа-вирусов могут сопротивляться активации противовирусной РНК-активируемой протеинкиназы (PKR) за счет нисходящей петли (DLP), присутствующей внутри вирусных транскриптов 26S, что позволяет иницировать трансляцию этих мРНК независимо от eIF2. Нисходящая петля (DLP) расположена ниже AUG в мРНК SINV 26S и у других представителей рода альфа-вирусов.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут включать последовательность, кодирующую интересующий ген (GOI), функционально связанную с мотивом(ами) DLP, и/или последовательность, кодирующую мотивы DLP.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК по настоящему изо-

бретению содержит нисходящую петлю (DLP). В некоторых вариантах осуществления нисходящая петля (DLP) содержит по меньшей мере одну структуру РНК-стебель-петля.

В некоторых случаях активность DLP зависит от расстояния между мотивом DLP и иницирующим кодоном AUG (AUGi). Расстояние AUG-DLP в мРНК альфавируса 26S настроено на топологию ES6S-области рибосомной 18S рРНК таким образом, что позволяет разместить AUGi в Р-сайте 40S-субъединицы, задержанной DLP, что позволяет включать Met-tRNA без участия eIF2. В случае вируса Синдбис мотив DLP обнаруживается в первых ~150 нуклеотидах субгеномной РНК Синдбис. Шпилька расположена ниже иницирующего кодона AUG капсида Синдбис (AUG в нуклеотиде 50 субгеномной РНК Синдбис) и приводит к остановке рибосомы, так что для инициации трансляции используется правильный капсидный ген AUG. Предыдущие исследования сравнения последовательностей и структурного анализа РНК выявили эволюционную консервацию DLP в SINV и предсказали существование эквивалентных структур DLP у многих представителей рода альфа-вирусов (см., например, Ventoso, J. *Virology* 9484-9494, Vol. 86, September 2012).

Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, считается, что размещение мотива DLP выше кодирующей последовательности для любого GOI обычно приводит к слитому белку N-концевых капсидных аминокислот, которые кодируются в области шпильки с белком, кодируемым GOI, поскольку инициация происходит на AUG капсида, а не на AUG GOI.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит нисходящую петлю, расположенную выше неструктурного белка 1 (nsP1).

В некоторых вариантах осуществления нисходящая петля расположена перед неструктурным белком 1 (nsP1) и соединена с nsP1 с помощью элемента пропуска рибосомы 2A (P2A) тешовируса-1 свиньи.

Содержащая DLP самореплицирующаяся РНК по настоящему изобретению может быть подходящей для придания устойчивости к врожденной иммунной системе у субъекта. Немодифицированные репликоны РНК чувствительны к исходному состоянию врожденной иммунной системы клеток, в которые они вводятся. Если клетки/индивидуумы находятся в высокоактивном состоянии врожденной иммунной системы, это может отрицательно сказаться на характеристиках репликона РНК (например, на репликацию и экспрессию GOI). Путем разработки DLP для контроля инициации трансляции белка, особенно неструктурных белков, влияние существовавшего ранее состояния активации врожденной иммунной системы на влияние эффективной репликации репликона РНК устраняется или уменьшается. Результатом является более однородная и/или усиленная экспрессия GOI, которая может повлиять на эффективность вакцины или терапевтическое воздействие лечения.

Мотив DLP самореплицирующейся РНК по настоящему изобретению может обеспечивать эффективную трансляцию мРНК в клеточной среде, где трансляция клеточной мРНК ингибируется. Когда DLP связан с трансляцией генов неструктурных белков вектора репликона, белки репликазы и транскриптазы способны инициировать функциональную репликацию в PKR-активированной клеточной среде. Когда DLP связан с трансляцией субгеномных мРНК, возможна устойчивая экспрессия GOI, даже если клеточная мРНК ограничена активацией врожденного иммунитета. Соответственно, разработка самореплицирующихся РНК, содержащих структуры DLP, которые помогают управлять трансляцией как генов неструктурных белков, так и субгеномных мРНК, обеспечивает мощный способ преодоления активации врожденного иммунитета.

Примеры вектора самореплицирующейся РНК, содержащего мотив DLP, описаны в публикации заявки на патент США 2018/0171340 и публикации международной заявки на патент WO 2018106615, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Любая из описанных выше самореплицирующихся молекул РНК может дополнительно содержать неструктурные гены nsP1, nsP2, nsP3 и/или nsP4. В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК не кодирует функциональный вирусный структурный белок.

Геномы альфа-вирусов кодируют неструктурные белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, которые продуцируются как единый полипротеиновый предшественник, иногда обозначаемый P1234 (или nsP1-4, или nsP1234), и который расщепляется на зрелые белки посредством протеолитического процессинга (фиг. 18B). nsP1 может иметь размер около 60 кДа, может обладать метилтрансферазной активностью и участвовать в реакции эпированья вируса. nsP2 имеет размер около 90 кДа и может обладать хеликазной и протеазной активностью, в то время как nsP3 имеет размер около 60 кДа и содержит три домена: макродомен, центральный (или уникальный для альфа-вируса) домен и гипервариабельный домен (HVD). nsP4 имеет размер около 70 кДа и содержит основной каталитический домен РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp). После инфицирования геномная РНК альфа-вируса транслируется с образованием полипротеина P1234, который расщепляется на отдельные белки.

Геномы альфа-вирусов также кодируют три структурных белка: основной нуклеокапсидный белок С и оболочечные белки Р62 и Е1, которые связываются в виде гетеродимера. Структурные белки находятся под контролем субгеномного промотора и могут быть заменены представляющим интерес геном (GIO).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в самореплицирующейся РНК может отсутствовать (или не содержаться) последовательность(и) по меньшей мере одного (или всех)

структурных белков вируса (например, нуклеокапсидного белка С и оболочечных белков Р62, 6К и Е1). В этих вариантах осуществления последовательности, кодирующие один или несколько структурных генов, могут быть заменены одной или несколькими последовательностями, такими как, например, кодирующая последовательность по меньшей мере одного белка или пептида (или другого представляющего интерес ген (GOI)), например, полипептиды CALR/JAK2 или полипептиды эпитопа 2 JAK2 по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления в самореплицирующейся РНК отсутствуют последовательности, кодирующие структурные белки альфа-вируса; или не кодируют (или, необязательно, любые другие) структурные белки альфа-вируса. В некоторых вариантах осуществления самореплицирующиеся молекулы РНК дополнительно лишены части или всей кодирующей области одного или нескольких структурных белков вируса. Например, в системе экспрессии альфа-вируса может отсутствовать часть или вся кодирующая последовательность для одного или нескольких белков вирусного капсида С, гликопротеина Е1, гликопротеина Е2, белка Е3 и белка 6К.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК не содержит кодирующих последовательностей по меньшей мере одного из структурных белков вируса. В этих случаях последовательности, кодирующие структурные гены, могут быть заменены одной или несколькими последовательностями, такими как, например, кодирующая последовательность для GOI, например, полинуклеотиды эпитопа 2 CALR/JAK2 или JAK2 по фиг. 18 изобретения.

В изобретении также предусмотрена самореплицирующаяся молекула РНК, содержащая неструктурные гены nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, при этом самореплицирующаяся молекула РНК не кодирует функциональный вирусный структурный белок.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена самореплицирующаяся молекула РНК, содержащая последовательность, кодирующую по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре неструктурных вирусных белка (например, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Белки nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, кодируемые репликоном, являются функциональными или биологически активными белками.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит последовательность, кодирующую часть по меньшей мере одного неструктурного вирусного белка. Например, самореплицирующиеся молекулы РНК могут включать около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% или диапазон между любыми двумя из этих значений кодирующей последовательности для по меньшей мере одного неструктурного вирусного белка. В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК может включать последовательность, кодирующую значительную часть по меньшей мере одного неструктурного вирусного белка. Используемый в данном документе термин "существенная часть" последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей неструктурный вирусный белок, содержит достаточное количество последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей неструктурный вирусный белок, чтобы обеспечить предполагаемую идентификацию этого белка либо путем ручной оценки последовательности специалистом в данной области техники или компьютерным автоматическим сравнением и идентификацией последовательностей с использованием таких алгоритмов, как BLAST (см., например, в "Basic Local Alignment Search Tool"; Altschul S F et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1993).

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК может включать всю кодирующую последовательность для по меньшей мере одного неструктурного белка. В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК включает по существу всю кодирующую последовательность для нативных вирусных неструктурных белков. В определенных вариантах осуществления один или более неструктурных вирусных белков получают из того же вируса.

В некоторых вариантах осуществления нисходящую петлю DLP самореплицирующейся молекулы РНК, расположенной выше неструктурного белка 1 (nsP1), получают из вируса Синдбис.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит последовательности nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4, полученные из венесуэльского вируса энцефалита лошадей (VEEV), и мотив DLP, полученный из вируса Синдбис (SIN).

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующиеся молекулы РНК также имеют субпоследовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из макродомена альфа-вируса nsP3, и субпоследовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, полученную из центрального домена альфа-вируса nsP3. Самореплицирующиеся молекулы РНК также могут иметь субпоследовательность РНК, кодирующую аминокислотную последовательность, которая полностью получена из гипервариабельного домена альфа-вируса nsP3 Старого Света; или могут иметь аминокислотную последовательность, имеющую часть, полученную из гипервариабельного домена альфа-вируса nsP3 Нового Света, и часть, полученную из гипервариабельного домена альфа-вируса nsP3 Старого Света, т.е. гипервариабельный домен (HVD) может представлять собой гибридную или химерную последовательность Нового Света/Старого Света.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующиеся молекулы РНК могут иметь последовательность РНК, кодирующую аминокислотные последовательности, полученные из белковых после-

довательностей nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4 альфа-вируса дикого типа Нового Света. В других вариантах осуществления один или более неструктурных белков получают из различных вирусов.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК может иметь последовательность РНК, кодирующую макродомен nsP3, полученный из альфа-вируса nsP3 дикого типа, и центральный домен nsP3, полученный из альфа-вируса nsP3 дикого типа. В различных вариантах осуществления макро- и центральный домен(-ы) могут быть получены из альфа-вируса дикого типа nsP3 Нового Света или могут быть получены из белка альфа-вируса nsP3 дикого типа Старого Света. В других вариантах осуществления макродомен может быть получен из макродомена альфа-вируса дикого типа Нового Света и центральный домен может быть получен из центрального домена альфа-вируса дикого типа Старого Света или наоборот. Различные домены могут иметь любую последовательность, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит неструктурные белки VEEV nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4.

Накопленные экспериментальные данные продемонстрировали, что репликация/амплификация VEEV и других геномов альфа-вируса и их дефектная интерферирующая (DI) РНК определяются тремя промоторными элементами: (i) консервативный элемент 3'-концевой последовательности (3' CSE) и следующий поли(A)-хвост; (ii) 5'-UTR, которая функционирует как ключевой промотор для синтеза РНК как с отрицательной, так и с положительной цепью; и (iii) элемент из 51 нуклеотида консервативной последовательности (51-nt CSE), который расположен в последовательности, кодирующей nsP1, и функционирует как энхансер репликации генома альфа-вируса (Kim et al., PNAS, 2014, 111: 10708-10713 и ссылки в них).

Любая из описанных выше самореплицирующихся молекул РНК может дополнительно включать немодифицированную 5'-нетранслируемую область (5'UTR).

Преыдушие исследования показали, что во время инфекций, вызванных вирусами VEEV и Синдбис, только небольшая часть вирусных неструктурных белков (nsPs) локализуется совместно с промежуточными продуктами репликации dsRNA. Таким образом, оказывается, что большая часть nsP не участвует в репликации РНК (Gorchakov R, et al. (2008) A new role for ns polyprotein cleavage in Sindbis virus replication. *J Virol* 82(13):6218-6231). Это дало возможность использовать малоиспользуемые ns-белки для амплификации субгеномных РНК, кодирующих представляющие интерес белки, которые обычно транскрибируются с субгеномного промотора и далее не амплифицируются.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент nsP1 самореплицирующейся молекулы РНК по настоящему изобретению дублируется ниже 5'-UTR и выше DLP.

В некоторых вариантах осуществления первые 193 нуклеотида nsP1 дублированы ниже 5'-UTR и выше DLP.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит модифицированную 5'-нетранслируемую область (5'-UTR). Например, модифицированная 5'-UTR может содержать одну или несколько нуклеотидных замен в положениях 1, 2, 4 или их комбинацию. Предпочтительно модифицированная 5'-UTR содержит нуклеотидную замену в положении 2, более предпочтительно модифицированная 5'-UTR имеет замену U->G в положении 2. Примеры таких самореплицирующихся молекул РНК описаны в публикации заявки на патент США 2018/0104359 и публикации международной заявки на патент WO 2018075235, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления UTR могут представлять собой последовательности UTR альфа-вируса дикого типа Нового Света или Старого Света или последовательность, полученную из любой из них. 5'-UTR может иметь любую подходящую длину, например около 60 нуклеотидов, или 50-70 нуклеотидов, или 40-80 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR также может иметь консервативные первичные или вторичные структуры (например, одну или несколько структур петля-настебле) и может участвовать в репликации альфа-вируса или репликона РНК. 3'-UTR может составлять до нескольких сотен нуклеотидов, например, это может быть 50-900, или 100-900, или 50-800, или 100-700, или 200-700 нуклеотидов. 3'-UTR также может иметь вторичные структуры, например, ступенчатая петля, за которой может следовать полиаденилатный путь или поли-А-хвост.

5'- и 3'-нетранслируемые области могут быть функционально связаны с любой другой последовательностью, кодируемой репликоном. UTR могут быть функционально связаны с промотором и/или последовательностью, кодирующей белок или пептид, путем предоставления последовательностей и интервалов, необходимых для распознавания и транскрипции других кодируемых последовательностей.

GOI, например полинуклеотиды CALR/JAK2 или эпитопа 2 JAK2, согласно настоящему изобретению, могут экспрессироваться под контролем субгеномного промотора. В некоторых вариантах осуществления вместо нативного субгеномного промотора субгеномная РНК может быть помещена под контроль внутреннего участка посадки рибосомы (IRES), полученного из вирусов энцефаломиокардита (EMCV), вирусов вирусной диареи крупного рогатого скота (BVDV), полиовирусов, вирусов ящура (FMD), энтеровируса 71 или вирусов гепатита С. Субгеномные промоторы имеют длину от 24 нуклеотидов (вирус Синдбис) до более 100 нуклеотидов (вирус некротического пожелтения жилок свеклы) и



обычно находятся выше начала транскрипции.

Самореплицирующиеся молекулы РНК могут иметь 3'-поли-А-хвост. Он также может включать последовательность распознавания поли-А-полимеразы (например, AAUAAA) вблизи своего 3'-конца.

В тех случаях, когда самореплицирующаяся молекула РНК должна быть упакована в рекомбинантную альфа-вирусную частицу, она может содержать одну или несколько последовательностей, так называемых сигналов упаковки, которые служат для инициации взаимодействий со структурными белками альфа-вируса, что приводит к образованию частиц. В некоторых вариантах осуществления альфа-вирусные частицы содержат РНК, полученную из одного или нескольких альфа-вирусов; и структурные белки, где по меньшей мере один из указанных структурных белков получен из двух или более альфа-вирусов.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК содержит вектор, полученный из VEEV, в котором структурные вирусные белки (например, нуклеокапсидный белок С и оболочечные белки Р62, 6К и Е1) удалены и заменены кодирующей последовательностью полипептидов CARL JAK2 или эпитопа 2 JAK2 по настоящему изобретению.

Другие вирусные векторы и рекомбинантные вирусы.

Вирусный вектор, содержащий полинуклеотид согласно настоящему изобретению, может быть получен из человеческих аденоассоциированных вирусов, таких как AAV-2 (аденоассоциированный вирус типа 2). Привлекательной особенностью AAV векторов является то, что они не экспрессируют каких-либо вирусных генов. Единственными вирусными последовательностями ДНК, включенными в AAV векторы, являются инвертированные концевые повторы (ITR) длиной 145 п. н. Таким образом, как и при иммунизации депротенизированной ДНК, единственным экспрессируемым геном является ген антигена или химерного антигена. Кроме того, известно, что AAV векторы трансдуцируют как делящиеся, так и не делящиеся клетки, такие как дендритные клетки, полученные из моноцитов периферической крови человека, со стойкой экспрессией трансгена, а также с возможностью перорального и интраназального введения для создания иммунитета слизистых оболочек. Более того, необходимое количество ДНК, по-видимому, намного меньше на несколько порядков величины, с максимальными ответами при дозах от  $10^{10}$  до  $10^{11}$  частиц или копий ДНК в отличие от доз в 50 мкг или приблизительно 1015 копий депротенизированной ДНК. AAV векторы упаковывают путем совместной трансфекции подходящей клеточной линии (например, человеческие клетки 293) ДНК, содержащейся в конструктах, кодирующих химерный белок AAV ITR, и хелперной плазмиды AAV ACG2, содержащей кодирующую область AAV (гены AAV *gag* и *cap*) без ITR. Затем клетки инфицируют аденовирусом Ad5. Векторы могут быть очищены от клеточных лизатов с помощью способов, известных в данной области (например, такого как ультрацентрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия), и проверены на отсутствие выявляемых репликационно-компетентных AAV или аденовирусов (например, с помощью биоанализа цитопатического эффекта).

Вирусный вектор, содержащий полинуклеотид согласно настоящему изобретению, также включает ретровирусные векторы. Ретровирусы представляют собой класс интегративных вирусов, которые реплицируются с использованием кодируемой вирусом обратной транскриптазы для репликации вирусного РНК-генома в двухцепочечную ДНК, интегрированную в хромосомную ДНК инфицированных клеток (например, клетки-мишени). Такие векторы включают векторы, полученные из вирусов мышинного лейкоза, особенно Moloney (Gilboa, et al., 1988, Adv. Exp. Med. Biol. 241: 29) или штаммы Friend FB29 (международная патентная публикация № WO 1995/01447). Как правило, ретровирусный вектор лишен всех или части вирусных генов *gag*, *pol* и *env* и сохраняет 5' и 3' LTR и последовательность капсидирования. Эти элементы могут быть модифицированы для повышения уровня экспрессии или стабильности ретровирусного вектора. Такие модификации включают замену ретровирусной последовательности капсидирования одним из ретротранспозонов, таких как VL30 (см., например, патент США № 5747323).

Полинуклеотиды, кодирующие полипептид в соответствии с настоящим описанием, могут быть вставлены ближе к 3'-концу от последовательности капсидирования, например, в противоположном направлении относительно ретровирусного генома. Ретровирусные частицы получают в присутствии вируса хелпера или в соответствующей дополнительной (упаковочной) клеточной линии, которая содержит интегрированные в ее геном ретровирусные гены, для которых ретровирусный вектор является дефектным (например, *gag/pol* и *env*). Такие клеточные линии описаны в известном уровне техники (Miller and Rosman, 1989, BioTechniques 7: 980; Danos and Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460; Marowitz, et al., 1988, Virol. 167: 400). Продукт гена *env* отвечает за связывание вирусной частицы с вирусными рецепторами, присутствующими на поверхности клетки-мишени, и, таким образом, определяет диапазон хозяев ретровирусной частицы. Таким образом, упаковочную линию клеток, такую как клетки PA317 (ATCC CRL 9078) или 293E16 (W097/35996), содержащие амфотропный белок оболочки, можно использовать для инфицирования человеческих и других видов клеток-мишеней. Ретровирусные частицы выделяют из супернатанта культуры и могут необязательно дополнительно очищать в соответствии со стандартными методиками (например, хроматография, ультрацентрифугирование).

Регуляторные элементы.

Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды по настоящему изобретению, могут быть функцио-

нально связаны с одним или более регуляторными элементами в векторе. Регуляторные элементы могут содержать промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, репрессоры и т. п. Используемый в данном документе термин "функционально связанный" следует понимать в его самом широком приемлемом контексте и он относится к соединению полинуклеотидных элементов в функциональной взаимосвязи. Полинуклеотид является "функционально связанным", когда он находится в функциональной взаимосвязи с другим полинуклеотидом. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности.

Некоторые из широко используемых энхансерных и промоторных последовательностей в экспрессионных векторах и вирусных векторах представляют собой, например, промоторы человеческого цитомегаловируса (hCMV), ранний/поздний промотор осповакцины P7.5, CAG, SV40, мышинового CMV (mCMV), EF-1 и hPGK. Благодаря своей высокой эффективности и умеренному размеру приблизительно 0,8 т.п.н. промотор hCMV представляет собой один из наиболее часто используемых промоторов. Промотор hPGK характеризуется малым размером (прибл. 0,4 т.п.н.), но он менее эффективен, чем промотор hCMV. С другой стороны, промотор CAG, состоящий из элемента раннего энхансера цитомегаловируса, промотора, первого экзона и интрона гена бета-актина курицы и акцептора сплайсинга гена бета-глобулина кролика, может направлять очень сильную экспрессию гена, сопоставимую с промотором hCMV, но его большой размер делает его менее подходящим для вирусных векторов, где ограничения пространства могут быть важными проблемами, например, для аденовирусных векторов (AdV), аденоассоциированных вирусных векторов (AAV) или лентивирусных векторов (LV).

Дополнительными промоторами, которые могут быть использованы, являются основной немедленно-ранний промотор Aotine Herpesvirus 1 (промотор AoHV-1), описанный в международной патентной публикации № WO 2018/146205. Промотор может быть функционально связан с последовательностью репрессорного оператора, с которой может связываться репрессорный белок, чтобы подавлять экспрессию промотора в присутствии репрессорного белка. В некоторых вариантах осуществления последовательность репрессорного оператора представляет собой последовательность TetO или последовательность CuO (см., например, US9790256).

В некоторых случаях может быть желательно экспрессировать по меньшей мере два отдельных полипептида из одного вектора. В данном случае каждый полинуклеотид может быть функционально связан с одной и той же или разными промоторными и/или энхансерными последовательностями, или можно использовать хорошо известные бицистронные экспрессионные системы, например, с использованием внутреннего сайта посадки рибосом (IRES) из вируса энцефаломиокардита. Альтернативно можно использовать двунаправленные синтетические промоторы, такие как промотор hCMV-rhCMV и другие промоторы, описанные в международной патентной публикации № WO 2017/220499. Сигналы полиаденилирования могут быть получены из SV40 или бычьего гормона роста (BGH).

Векторы самореплицирующейся РНК, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид по настоящему изобретению, могут дополнительно содержать любые регуляторные элементы для установления обычной(ых) функции(й) вектора, включая, но не ограничиваясь этим, репликацию и экспрессию полипептида по настоящему изобретению, кодируемого полинуклеотидной последовательностью вектора. Регуляторные элементы включают, но не ограничиваются ими, промотор, энхансер, сигнал полиаденилирования, стоп-кодон трансляции, элемент связывания рибосомы, терминатор транскрипции, маркеры селекции, начало репликации и т. д. Вектор может содержать один или несколько кассет экспрессии. "Кассета экспрессии" является частью вектора, который управляет клеточным механизмом для получения РНК и белка. Кассета экспрессии обычно содержит три компонента: промоторную последовательность, открытую рамку считывания и 3'-нетранслируемую область (UTR), необязательно содержащую сигнал полиаденилирования. Открытая рамка считывания (ORF) представляет собой рамку считывания, которая содержит кодирующую последовательность представляющего интерес белка (например, полипептидов по настоящему изобретению) от стартового кодона до стоп-кодона. Регуляторные элементы кассеты экспрессии могут быть функционально связаны с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей представляющие интерес полипептиды. Любые компоненты, подходящие для использования в описанной в данном документе кассете экспрессии, можно использовать в любой комбинации и в любом порядке для получения векторов применения.

Вектор может содержать промоторную последовательность, предпочтительно в кассете экспрессии, для контроля экспрессии полипептидов согласно настоящему изобретению. Термин "промотор" используется в его обычном смысле и относится к нуклеотидной последовательности, которая инициирует транскрипцию функционально связанной нуклеотидной последовательности. Промотор расположен на той же цепи рядом с нуклеотидной последовательностью, которую он транскрибирует. Промоторы могут быть конститутивными, индуцируемыми или репрессируемыми. Промоторы могут быть природными или синтетическими. Промотор может быть получен из источников, включая вирусы, бактерии, грибы, растения, насекомых и животных. Промотор может быть гомологичным промотором (т.е. полученным из того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичным промотором (т.е. полученным из другого вектора или генетического источника). Предпочтительно промотор расположен выше полинуклеотида, кодирующего полипептиды по настоящему изобретению, внутри кассеты экспрессии. Напри-

мер, в самореплицирующейся РНК промотор может быть субгеномным промотором альфа-вируса.

В самореплицирующейся РНК вектор может дополнительно содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые стабилизируют экспрессируемый транскрипт, усиливают ядерный экспорт транскрипта РНК и/или улучшают транскрипционно-трансляционное сочетание. Примеры таких последовательностей включают сигналы полиаденилирования и энхансерные последовательности. Сигнал полиаденилирования обычно расположен ниже кодирующей последовательности представляющего интерес белка (например, полипептидов по настоящему изобретению) в касете экспрессии вектора. Энхансерные последовательности представляют собой регуляторные последовательности ДНК, которые при связывании с факторами транскрипции усиливают транскрипцию ассоциированного гена. Энхансерная последовательность предпочтительно расположена выше последовательности полинуклеотидов, кодирующей полипептиды по настоящему изобретению, но ниже последовательности промотора внутри касеты экспрессии вектора.

Можно использовать любую энхансерную последовательность, известную специалистам в данной области техники в связи с настоящим изобретением. Любой из компонентов или последовательностей самореплицирующегося вектора РНК по настоящему изобретению может быть функционально связан с любыми другими компонентами или последовательностями. Компоненты или последовательности самореплицирующейся молекулы РНК могут быть функционально связаны для экспрессии по меньшей мере одного белка или пептида (или биотерапевтического средства) в клетке-хозяине или подвергнутом лечению организме и/или для способности реплика к саморепликации. Промотор или UTR, функционально связанные с кодирующей последовательностью, способны влиять на транскрипцию и экспрессию кодирующей последовательности, когда присутствуют соответствующие ферменты.

Промотор не обязательно должен быть смежным с кодирующей последовательностью, пока он функционирует, чтобы направлять ее экспрессию. Таким образом, функциональная связь между последовательностью РНК, кодирующей белок или пептид, и регуляторной последовательностью (например, промотором или UTR) представляет собой функциональную связь, которая обеспечивает экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. Функционально связанные могут также относиться к последовательностям, таким как последовательности, кодирующие RdRp (например, nsP4), nsP1-4, UTR, промоторы и другие последовательности, кодирующие реплика РНК, которые связаны таким образом, что они обеспечивают транскрипцию и трансляцию биотерапевтической молекулы и/или репликацию реплика. UTR могут быть функционально связаны путем предоставления последовательностей и интервалов, необходимых для распознавания и трансляции рибосомой других кодируемых последовательностей.

Молекула является функциональной или биологически активной, если она проявляет по меньшей мере 50% той же активности, что и ее природная (или дикого типа) соответствующая молекула, но функциональная молекула также может проявлять по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или 100% той же активности, что и у ее природной (или дикого типа) соответствующей молекулы. Самореплицирующиеся молекулы РНК также могут кодировать аминокислотную последовательность, полученную из аминокислотной последовательности альфа-вируса дикого типа или основанную на ней, что означает, что они имеют по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 65%, или по меньшей мере 68%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100%, или 80-99%, или 90-100%, или 95-99%, или 95-100%, или 97-99%, или 98-99% идентичности с аминокислотной последовательностью (которая может быть соответствующей последовательностью), кодируемой геномом РНК альфа-вируса дикого типа, который может быть геномом альфа-вируса Нового Света или Старого Света. Последовательности, полученные из других последовательностей, могут быть до 5%, или до 10%, или до 20%, или до 30% длиннее или короче исходной последовательности. В любом из вариантов осуществления идентичность последовательности может составлять по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или 100% для любой нуклеотидной последовательности, кодирующей (или содержащей аминокислотную последовательность) сайт связывания G3BP или FXR на ней. Эти последовательности также могут быть до 5%, или до 10%, или до 20%, или до 30% длиннее или короче исходной последовательности.

Клетки-хозяева.

В изобретении также предусмотрена клетка-хозяин, содержащая любой из указанных выше векторов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является прокариотической или эукариотической клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клеточную линию PER.C6, PER.C6 TetO, фибробласт куриного эмбриона (CEF), CHO, HEK293, HT-1080, HKB-11, CAP, HuH-7 или Age1.

Композиции.

В изобретении также предусмотрены композиции, содержащие любой из полинуклеотидов, любой из полипептидов и любой из векторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиции могут содержать вектор, содержащий любой из нуклеотидов, раскрытых в данном документе, причем вектор выбран из Ad26, GAd20, MVA или самореплицирующейся молекулы РНК.

Любая из описанных выше композиций может включать или может быть включена в состав фармацевтической композиции, содержащей композицию и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. "Фармацевтически приемлемый" относится к вспомогательному веществу, которое в применяемых дозировках и концентрациях не вызывает нежелательных или вредных эффектов у субъектов, которым его вводят, и включает носитель, буферы, стабилизаторы или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Определенные свойства носителя или другого материала могут зависеть от пути введения, например, внутримышечным, подкожным, пероральным, внутривенным, кожным, интрамукозальным (например, в слизистую кишечника), интраназальным или интробрюшинным путем. Могут быть включены жидкие носители, такие как вода, керосин, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. В качестве примера состава представлен мировой стандарт аденовируса (Hoganson et al, 2002): 20 мМ трис pH 8, 25 мМ NaCl, 2,5% глицерина; или 20 мМ трис, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ NaCl, сахаразы 10% мас./об., полисорбата-80 0,02% мас./об.; или 10-25 мМ цитратного буфера с pH 5,9-6,2, 4-6% (мас./мас.) гидроксипропил-бета-циклодекстрина (HBCD), 70-100 мМ NaCl, 0,018-0,035% (мас./мас.) полисорбата-80 и необязательно 0.3-0.45% (мас./мас.) этанола. Можно использовать множество других буферных растворов, и известны примеры подходящих составов для хранения и фармацевтического введения очищенных фармацевтических препаратов.

Композиция может содержать один или несколько адъювантов. Примеры таких адъювантов включают, но не ограничиваются ими, неорганические адъюванты (например, неорганические соли металлов, такие как фосфат алюминия или гидроксид алюминия), органические адъюванты (например, сапонины или сквален), адъюванты на масляной основе (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), липосомы или биоразлагаемые микросферы), виросомы, бактериальные адъюванты (например, монофосфориллипид А или мурамиловые пептиды), синтетические адъюванты (например, неионные блок-сополимеры, аналоги мурамиловых пептидов или синтетический липид А) или синтетические полинуклеотидные адъюванты (например, полиаргинин или полилизин). Другие неограничивающие примеры адъювантов включают QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuver, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, квасцы и MF59.

Другие адъюванты, которые могут быть использованы, включают лектины, факторы роста, цитокины и лимфокины, такие как альфа-интерферон, гамма-интерферон, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), гранулоцитарно-колониестимулирующий фактор (GCSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухоли (TNF), эпидермальный фактор роста (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 или агонисты TLR, и адъюванты в виде частиц (например, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS).

Наночастицы.

В некоторых вариантах осуществления композиции могут содержать наночастицы. Любой из полинуклеотидов по настоящему изобретению может быть присоединен к наночастицам или контактировать с ними для доставки субъекту. Доставка любых полинуклеотидов или полипептидов согласно настоящему изобретению с использованием наночастиц может устранить необходимость включения вируса или адъюванта в композицию вакцины. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут представлять собой ДНК или РНК. Наночастицы могут содержать сигналы иммунной опасности, которые способствуют эффективной индукции иммунного ответа на пептиды. Наночастицы могут индуцировать активацию и созревание дендритных клеток (DC), необходимых для устойчивого иммунного ответа. Наночастицы могут содержать не собственные компоненты, которые улучшают поглощение наночастиц и, следовательно, пептидов клетками, такими как антигенпрезентирующие клетки.

Диаметр наночастиц обычно составляет от около 1 нм до около 100 нм, например от около 20 нм до около 40 нм. Наночастицы со средним диаметром от 20 до 40 нм могут облегчать поглощение наночастицы цитозолем (см., например, WO 2019/135086). Примерами наночастиц являются полимерные наночастицы, неорганические наночастицы, липосомы, липидные наночастицы (LNP), иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), вирусоподобные частицы (VLP) или самособирающийся белок. Наночастицы могут представлять собой наночастицы фосфата кальция, наночастицы кремния или наночастицы золота. Полимерные наночастицы могут содержать один или более синтетических полимеров, таких как поли(d,l-лактида-ко-гликолид) (PLG), поли(d,l-лактид-ко-гликолевая кислота) (PLGA), поли(L-глутаминовая кислота) (g-PGA) или поли(этиленгликоль) (PEG), или полистирол, или один или более природных полимеров, таких как полисахарид, например пуллулан, альгинат, инулин и хитозан. Применение полимерных наночастиц может быть выгодным благодаря свойствам полимеров, которые могут быть включены в наночастицу. Например, перечисленные выше натуральные и синтетические полимеры могут обладать хорошей биосовместимостью и биоразлагаемостью, нетоксичностью и/или способностью к переработке с получением желаемых форм и размеров. Полимерная наночастица может также образовывать гидрогелевые наночастицы, гидрофильные трехмерные полимерные сети с благоприятными свойствами, включая гибкий размер ячейки, большую площадь поверхности для мультивалентной конъюгации,

высокое содержание воды и высокую сорбционную емкость для антигенов. Полимеры, такие как поли-L-молочная кислота (PLA), PLGA, PEG, и полисахариды подходят для формирования гидрогелевых наночастиц. Неорганические наночастицы, как правило, имеют жесткую структуру и содержат оболочку, в которой инкапсулирован антиген, или ядро, к которому может быть ковалентно присоединен антиген. Ядро может содержать один или более атомов, таких как золото (Au), серебро (Ag), атомы меди (Cu), Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd или Au/Ag/Cu/Pd или фосфат кальция (CaP).

В некоторых вариантах осуществления наночастицы могут быть липосомами. Липосомы, как правило, образуются из биоразлагаемых нетоксичных фосфолипидов и содержат самособирающуюся фосфолипидную бислойную оболочку с водным ядром. Липосомы могут представлять собой однослойную везикулу, содержащую один фосфолипидный бислой, или многослойную везикулу, содержащую несколько concentрических фосфолипидных оболочек, разделенных слоями воды. Как следствие, липосомы можно оптимизировать для включения либо гидрофильных молекул в водное ядро, либо гидрофобных молекул в фосфолипидные бислои. Липосомы могут инкапсулировать полинуклеотиды или полипептиды или их фрагменты согласно настоящему изобретению внутри ядра для доставки. Липосомы и липосомные составы можно приготовить стандартными способами и хорошо известными в данной области, см., например, Remington 's; Akimaru, 1995, *Cytokines Mol. Ther.* 1: 197-210; Alving, 1995, *Immunol. Rev.* 145: 5-31; Szoka, 1980, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467; патент США № 4,235,871; патент США № 4,501,728; и патент США № 4837028. Липосомы могут содержать нацеливающую молекулу для нацеливания комплексов липосомы на определенный тип клеток. Нацеливающая молекула может содержать партнера по связыванию (например, лиганд или рецептор) для биомолекулы (например, рецептор или лиганд) на поверхности кровеносного сосуда или клетки, обнаруживаемой в ткани-мишени. Заряд липосом является важным фактором, определяющим выведение липосом из крови, при этом отрицательно заряженные липосомы быстрее захватываются ретикулоэндотелиальной системой (Juliano, 1975, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 651) и, таким образом, имеют более короткий период полужизни в кровотоке. Включение производных фосфатидилэтаноламина увеличивает время циркуляции за счет предотвращения агрегации липосомы. Например, встраивание N-(омега-карбоксо)ациламинофосфатидилэтаноламинов в большие однослойные везикулы L-альфа-дистеароилфосфатидилхолина резко увеличивает продолжительность жизни липосомальной циркуляции *in vivo* (см., например, Ahl, 1997, *Biochim. Biophys. Acta* 1329: 370-382). Как правило, липосомы получают с содержанием от около 5 до 15 молярных процентов отрицательно заряженных фосфолипидов, таких как фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин или фосфатидилинозитол. Добавленные отрицательно заряженные фосфолипиды, такие как фосфатидилглицерин, также служат для предотвращения спонтанной агрегации липосом и, таким образом, сведения к минимуму риска образования недостаточных по размеру липосомальных агрегатов. Упрочняющие мембрану агенты, такие как сфингомиелин или насыщенный нейтральный фосфолипид, в концентрации по меньшей мере около 50 мольных процентов, и от 5 до 15 мольных процентов моносиалилганглиозида также могут придавать желательные липосомные свойства, такие как жесткость (см., например, патент США No 4,837,028). Кроме того, суспензия липосом может содержать липид-защитные агенты, которые защищают липиды от свободнорадикальных и липидпероксидажных повреждений при хранении. Предпочтительными являются липофильные гасители свободных радикалов, такие как альфа-токоферол, и водорастворимые железоспецифические хелаторы, такие как ферриоксианин.

Самореплицирующиеся молекулы РНК и/или содержащие их композиции также могут быть составлены в виде наночастиц с использованием комбинации полимеров, липидов и/или других биоразлагаемых средств, таких как, но не ограничиваясь ими, фосфат кальция, полимеры. Компоненты могут быть объединены в ядро-оболочку, гибридную и/или послойную архитектуру, чтобы обеспечить точную настройку наночастиц, чтобы можно было улучшить доставку молекул и/или композиций согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления наночастицы могут включать мультислойные везикулы разного размера. Например, образующие везикулу липиды можно растворить в подходящем органическом растворителе или системе растворителей и высушить под вакуумом или в инертном газе с образованием тонкой липидной пленки. При желании пленку можно повторно растворить в подходящем растворителе, таком как третичный бутанол, а затем лиофилизировать с образованием более однородной липидной смеси, которая находится в более легко гидратированной порошковой форме. Данную пленку покрывают водным раствором полипептида или полинуклеотида и позволяют ей гидратироваться, как правило, в течение периода времени от 15 до 60 минут, перемешивая. Распределение по размерам полученных многослойных везикул можно сдвинуть в сторону меньших размеров путем гидратации липидов при более энергичном перемешивании или путем добавления солибилизирующих детергентов, таких как дезоксихолат. Среда для гидратации может содержать нуклеиновую кислоту в концентрации, необходимой во внутреннем объеме липосом в конечной суспензии липосом. Подходящие липиды, которые можно применять для образования многослойных везикул, включают DOTMA (Feigner, et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417), DOGS или Transfectain™ (Behr, et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6982- 6986), DNERIE или DORIE (Feigner, et al., *Methods* 5: 67-75), DC-CHOL (Gao and Huang, 1991,

BBRC 179: 280-285), DOTAP™ (McLachlan, et al., 1995, Gene Therapy 2: 674-622), Lipofectamine™ и глицеролипидные соединения (см., например, EP901463 и WO98/37916).

В некоторых вариантах осуществления наночастица может представлять собой иммуностимулирующий комплекс (ISCOM). ISCOM представляют собой каркасные частицы, которые обычно образуются из коллоидных сапонин-содержащих мицелл. ISCOM могут содержать холестерин, фосфолипид (такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин) и сапонин (такой как Quil A из дерева *Quillaja saponaria*).

В некоторых вариантах осуществления наночастица может представлять собой вирусоподобную частицу (VLP). VLP представляют собой самособирающиеся наночастицы, не содержащие инфекционной нуклеиновой кислоты, которые образуются в результате самосборки биосовместимого капсидного белка. Как правило, диаметр VLP составляет от около 20 до около 150 нм, например от около 20 до около 40 нм, от около 30 до около 140 нм, от около 40 до около 130 нм, от около 50 до около 120 нм, от около 60 до около 110 нм, от около 70 до около 100 нм или от около 80 до около 90 нм. Преимуществом VLP является то, что они используют возможности развитой вирусной структуры, которая естественным образом оптимизирована для взаимодействия с иммунной системой. Оптимизированный естественным образом размер наночастиц и повторяющийся структурный порядок означают, что VLP индуцируют мощные иммунные ответы даже в отсутствие адьюванта.

Другие молекулы, подходящие для комплексообразования с полинуклеотидами по настоящему изобретению, включают катионные молекулы, такие как полиамидамин (Haensler and Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), дендритный полилизин (международная патентная публикация № WO1995/24221), полиэтилен иринин или полипропилен h-нин (международная патентная публикация № WO1996/02655), полилизин (патент США № 5595897), хитозан (патент США № 5744166), ДНК-желатин коацерваты (см., например, патент США № 6207195; патент США № 6025337; патент США № 5972707) или DEAE декстран (Lopata, et al., 1984, Nucleic Acid Res. 12: 5707-5717).

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК может быть упакована или инкапсулирована в катионные молекулы, такие как полиамидамин (Haensler and Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), дендритный полилизин (международная патентная публикация № WO1995/24221), полиэтилен иринин или полипропилен h-нин (международная патентная публикация № WO1996/02655), полилизин (патент США № 5595897), хитозан (патент США № 5744166), ДНК-желатин коацерваты (см., например, патент США № 6207195; патент США № 6025337; патент США № 5,972,707) или DEAE декстран (Lopata, et al., 1984, Nucleic Acid Res. 12: 5707-5717), дендримеры (см., например, WO1996/19240) или полиэтиленимин (PEI) (см., например, Sun et al., 2014, Mol Med Rep. 10(5):2657-2662).

Раскрытые самореплицирующиеся молекулы РНК и/или композиции, содержащие самореплицирующиеся молекулы РНК, кодирующие любой из полипептидов по настоящему изобретению, могут быть инкапсулированы с использованием одной или нескольких липосом, липоплексов и/или липидных наночастиц. Липосомы представляют собой искусственно полученные везикулы, которые в основном могут состоять из двойного липидного слоя и могут использоваться в качестве средства доставки для введения полинуклеотидов и самореплицирующихся молекул РНК. Липосомы могут быть разных размеров, например, многослойная везикула (MLV), которая может иметь диаметр в сотни нанометров и может содержать ряд концентрических двойных слоев, разделенных узкими водными отсеками, небольшая одноклеточная везикула (SUV), которая может быть меньше 50 нм в диаметре, и большая однослойная везикула (LUV), которая может иметь диаметр от 50 до 500 нм. Конструкция липосом может включать, но не ограничиваться ими, опсоины или лиганды для улучшения прикрепления липосом к нездоровой ткани или для активации таких явлений, как, но не ограничиваясь ими, эндоцитоз. Липосомы могут иметь низкий или высокий pH для улучшения доставки полинуклеотидов и самореплицирующихся молекул РНК, описанных в данном документе.

Образование липосом может зависеть от физико-химических характеристик, таких как, помимо прочего, захваченная фармацевтическая композиция и липосомальные ингредиенты, характер среды, в которой диспергированы липидные везикулы, эффективная концентрация захваченного вещества и его потенциальная токсичность, любые дополнительные процессы, связанные с применением и/или доставкой везикул, оптимизация размера, полидисперсность и срок годности везикул для предполагаемого применения, а также воспроизводимость от партии к партии и возможность крупномасштабного производства безопасных и эффективных липосомальных продуктов.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующаяся молекула РНК инкапсулирована, связана или адсорбирована на липосоме, липоплексе, липидной наночастице или их комбинациях, предпочтительно, самореплицирующаяся молекула РНК инкапсулирована в липидную наночастицу.

В некоторых вариантах осуществления молекула самореплицирующейся РНК, кодирующая любой из полипептидов по настоящему изобретению, может быть полностью инкапсулирована в липидную часть частицы, тем самым защищая РНК от расщепления нуклеазой. "Полностью инкапсулированная" означает, что РНК существенно не расщепляется после воздействия сыворотки или нуклеазного анализа, который значительно расщепляет свободную РНК. При полной инкапсуляции предпочтительно менее

25% нуклеиновой кислоты в частице подвергается расщеплению при обработке, которая обычно разрушает 100% свободной нуклеиновой кислоты, более предпочтительно менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% нуклеиновой кислоты в частице разрушается. "Полностью инкапсулированный" также означает, что частицы нуклеиновой кислоты-липиды не распадаются быстро на составные части при введении *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления самореплицирующиеся молекулы РНК и/или композиции по настоящему изобретению, содержащие их, могут быть включены в состав липидной везикулы, которая может иметь поперечные связи между функционализированными липидными двойными слоями. В некоторых вариантах осуществления самореплицирующиеся молекулы РНК и/или композиции по настоящему изобретению могут быть включены в состав комплекса липид-поликатион. Образование комплекса липид-поликатион можно осуществить способами, известными в данной области техники. В качестве неограничивающего примера поликатион может включать катионный пептид или полипептид, такой как, но не ограничиваясь ими, полилизин, полиорнитин и/или полиаргинин и катионные пептиды. В некоторых вариантах осуществления самореплицирующиеся молекулы РНК и/или композиции, раскрытые в данном документе, могут быть включены в состав комплекса липид-поликатион, который может дополнительно включать нейтральный липид, такой как, помимо прочего, холестерин или диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE). На состав липидных наночастиц может влиять, помимо прочего, выбор катионного липидного компонента, степень насыщения катионного липида, природа пегилирования, соотношение всех компонентов и биофизические параметры, такие как размер.

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе самореплицирующаяся молекула РНК инкапсулирована в липидную наночастицу (LNP), как показано на фиг. 20. Липидные наночастицы обычно содержат четыре различных липида: ионизируемый липид, нейтральный вспомогательный липид, холестерин и диффундирующий липид полиэтиленгликоля (ПЭГ). LNP аналогичны липосомам, но имеют немного отличающиеся функции и состав. LNP разработаны для инкапсулирования полинуклеотидов, таких как ДНК, мРНК, миРНК и кРНК. Традиционные липосомы содержат водное ядро, окруженное одним или более липидными бислоями. LNP могут иметь мицеллообразную структуру, инкапсулируя полинуклеотиды в неводном ядре. LNP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частицы (например, PEG-липидный конъюгат). LNP подходят для системного применения, поскольку они демонстрируют увеличенную продолжительность жизни циркуляции после внутривенной инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP могут иметь средний диаметр от около 50 нм до около 150 нм, например от около 60 нм до около 130 нм, или от около 70 нм до около 110 нм, или от около 70 нм до около 90 нм, и являются по существу нетоксичными. Получение загруженных полинуклеотидами LNP описано в патенте США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; патентной публикации № WO 96/40964. Полинуклеотид, содержащий LNP, описан, например, в WO 2019/191780.

В некоторых вариантах осуществления липидные наночастицы содержат катионный липид (например, один или несколько катионных липидов или их солей, описанных в данном документе), фосфолипид и конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц (например, один или несколько конъюгатов ПЭГ-липид). Липидные частицы могут также содержать холестерин. Липидные частицы могут инкапсулировать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более самореплицирующихся молекул РНК, которые кодируют один или несколько полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления составы LNP, содержащие поликатионную композицию, можно использовать для доставки описанных в данном документе самореплицирующихся молекул РНК *in vivo* и/или *ex vitro*. В изобретении дополнительно предусмотрены составы LNP, содержащие катионный липид.

Термины "катионный липид" и "аминолипид" используются в данном документе взаимозаменяемо и включают те липиды и их соли, которые имеют одну, две, три или более жирных кислот или жирных алкильных цепей и концевую аминогруппу, рН-титруемую (например, алкиламиногруппу или концевую диалкиламиногруппу). Катионный липид обычно протонирован (т.е. положительно заряжен) при рН ниже рКа катионного липида и является по существу нейтральным при рН выше рКа. Катионные липиды можно также назвать титруемыми катионными липидами. В некоторых вариантах осуществления катионные липиды содержат: протонируемую концевую группу третичного амина (например, рН-титруемую); C18-алкильные цепи, где каждая алкильная цепь независимо содержит от 0 до 3 (например, 0, 1, 2 или 3) двойных связей; и эфирные, сложноэфирные или кетальные связи между концевой группой и алкильными цепями. Такие катионные липиды включают, но не ограничиваются ими, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA,  $\gamma$ -DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (также известный как DLin-C2K-DMA, XTC2 и C2K), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA,  $\gamma$ -DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (также известный как MC2), DLin-M-C3-DMA (также известный как MC3) и (DLin-MP-DMA) (также известный как 1-B11).

В изобретении также предусмотрена инкапсулированная самореплицирующаяся молекула РНК, в которой катионный липид содержит протонируемый третичный амин. В некоторых вариантах осуществ-

ления катионный липид представляет собой ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-8,8'-(((2-(диметиламино)этил)тио)карбонил)азандиил)диоктаноат.

В некоторых вариантах осуществления катионные липидные соединения относительно нецитотоксичны. Катионные липидные соединения могут быть биосовместимыми и биоразлагаемыми. Катионный липид может иметь рКа в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,5, более предпочтительно от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0.

Катионные липидные соединения, описанные в данном документе, особенно привлекательны для доставки лекарственных средств по нескольким причинам: они содержат аминогруппы для взаимодействия с ДНК, РНК, другими полинуклеотидами и другими отрицательно заряженными средствами, для буферизации pH, для вызова эндоцитоза, для защиты доставляемых самореплицирующихся молекул РНК, могут быть синтезированы из коммерчески доступных исходных материалов; и/или они чувствительны к pH и могут быть сконструированы с желаемым рКа.

Составы липидных наночастиц можно улучшить, заменив катионный липид биоразлагаемым катионным липидом, который известен как быстро выводимая липидная наночастица (reLNP). Было показано, что ионизируемые катионные липиды, такие как, помимо прочего, DLinDMA, DLin-KC2-DMA и DLin-MC3-DMA, со временем накапливаются в плазме крови и тканях и могут быть потенциальным источником токсичности. Быстрый метаболизм быстро выводимых липидов может улучшить переносимость и терапевтический индекс липидных наночастиц на порядок величины от дозы 1 мг/кг до дозы 10 мг/кг у крыс. Включение ферментативно разлагаемой сложноэфирной связи может улучшить профиль распада и метаболизма катионного компонента, сохраняя при этом активность состава reLNP. Сложноэфирная связь может быть расположена внутри липидной цепи или может быть расположена на терминальном конце липидной цепи. Внутренняя сложноэфирная связь может заменить любой углерод в липидной цепи. Липидные частицы могут содержать липидный конъюгат. Конъюгированный липид полезен тем, что он предотвращает агрегацию частиц. Подходящие конъюгированные липиды включают, но не ограничиваются ими, конъюгаты ПЭГ-липид, конъюгаты катионный полимер-липид и их смеси.

ПЭГ представляет собой линейный водорастворимый полимер повторяющихся звеньев этилена ПЭГ с двумя концевыми гидроксильными группами. ПЭГ классифицируются по их молекулярной массе; и включают следующее: монометоксиполиэтиленгликоль (MePEG-OH), монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинат (MePEG-S), монометоксиполиэтиленгликоль-сукцинимидилсукцинат (MePEG-S-NHS), монометоксиполиэтиленгликоль-амин (MePEG-NH<sub>2</sub>), монометоксиполиэтиленгликоль-трезилат (MePEG-TRES), монометоксиполиэтиленгликоль-имидазол-карбонил (MePEG-IM), а также такие соединения, содержащие концевую гидроксильную группу вместо концевой метоксигруппы (например, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH<sub>2</sub>).

Фрагмент ПЭГ описанных в данном документе конъюгатов ПЭГ-липид может иметь среднюю молекулярную массу в диапазоне от 550 до 10000 дальтон. Примеры ПЭГ-липидов включают, но не ограничиваются ими, ПЭГ, связанный с диалкилсульпропилами (ПЭГ-ДАА), ПЭГ, связанный с диацилглицерином (ПЭГ-DAG), ПЭГ, связанный с фосфолипидами, такими как фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-PE), ПЭГ, связанный с церамидами, ПЭГ, конъюгированный с холестерином или его производным, и их смеси. В некоторых вариантах осуществления конъюгат ПЭГ-липид представляет собой DMG-PEG-2000.

Самореплицирующиеся молекулы РНК также могут быть составлены в частице, содержащей некаатионные липиды. Подходящие некаатионные липиды включают, например, нейтральные незаряженные, цвиттерионные или анионные липиды, способные образовывать стабильный комплекс. Неограничивающие примеры некаатионных липидов включают фосфолипиды, такие как лецитин, фосфатидилэтаноламин, лизолецитин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, сфингомиелин, яичный сфингомиелин (ESM), цефалин, кардиолипин, фосфатидная кислота, цереброзиды, дицетилфосфат, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин (POPE), пальмитоилолеилфосфатидилглицерин (POPG), диолеилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), фосфатидилэтаноламин фосфатидилэтаноламин фосфатидилэтаноламин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилэтаноламиндипальмитоилдимиристоилдистеароилмонометилдиметилдиел аидоилстеароилолеилфосфатидилэтаноламин (SOPE), лизофосфатидилхолин, дилинолеилфосфатидилхолин и их смеси. Также можно использовать другие диацилфосфатидилхолин- и диацилфосфатидилэтаноламинфосфолипиды. Ацильные группы в этих липидах предпочтительно представляют собой ацильные группы, полученные из жирных кислот, имеющих углеродные цепи C10-C24, например, лауроил, миристоил, пальмитоил, стеароил или олеоил.

Дополнительные примеры некаатионных липидов включают стеролы, такие как холестерин и его производные. Неограничивающие примеры производных холестерина включают полярные аналоги, такие как 5 $\alpha$ -холестанол, 5 $\alpha$ -копростанол, холестерил-(2'-гидрокси)этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси)бутиловый эфир и 6-кетохолестанол; неполярные аналоги, такие как 5 $\alpha$ -холестан, холестенон, 5 $\alpha$ -холестанон, 5 $\alpha$ -холестанон и холестерилдеcanoат; и их смеси. В предпочтительных вариантах осуществ-



вления производное холестерина представляет собой полярный аналог, такой как холестерил-(4'-гидрокси)-бутиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид представляет собой DSPC. В некоторых вариантах осуществления некаатионный липид, присутствующий в липидных частицах, содержит или состоит из смеси одного или нескольких фосфолипидов и холестерина или его производного. В некоторых вариантах осуществления, где липидные частицы содержат смесь фосфолипида и холестерина или производного холестерина, смесь может составлять до 40 мол.%, 45 мол.%, 50 мол.%, 55 мол.% или 60 мол.% от общего количества присутствующих липидов в частице.

В некоторых вариантах осуществления LNP могут содержать 30-70% катионного липидного соединения, 0-60% холестерина, 0-30% фосфолипида и 1-10% полиэтиленгликоля (ПЭГ).

В некоторых вариантах осуществления катионный липид, цвиттерионный липид, холестерин и конъюгированный липид объединяют в молярном соотношении 50:7:40:3 соответственно в липидной наночастице.

В некоторых вариантах осуществления составы LNP, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать молекулу, усиливающую проницаемость. В некоторых вариантах осуществления составы наночастиц могут представлять собой углеводную наночастицу, содержащую углеводный носитель и самореплицирующуюся молекулу РНК. В качестве неограничивающего примера углеводный носитель может включать, но не ограничиваться ими, модифицированный ангидридом фитогликоген или материал типа гликогена, октенилсукцинат фитогликогена, бета-декстрин фитогликогена и бета-декстрин фитогликогена, модифицированный ангидридом.

#### Наборы.

В настоящем изобретении также предусмотрен набор, содержащий одну или несколько композиций, один или несколько полинуклеотидов, один или несколько полипептидов или один или несколько векторов по настоящему изобретению. В настоящем описании также предложен набор, содержащий один или более рекомбинантных вирусов в соответствии с настоящим описанием. Наборы можно использовать для облегчения выполнения способов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит реагенты для облегчения введения вакцин в соответствии с настоящим описанием в клетку, такие как составы на основе липидов или вирусные упаковочные материалы.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько векторов Ad26, содержащих любой из полинуклеотидов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько векторов MVA, содержащих любой из полинуклеотидов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько векторов GAd20, содержащих любой из полинуклеотидов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну или несколько самореплицирующихся молекул РНК, содержащих любой из полинуклеотидов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит вектор Ad26 по изобретению и вектор MVA по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит вектор GAd20 по изобретению и вектор MVA по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит вектор Ad26 по изобретению и вектор Gad20 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит самореплицирующуюся молекулу РНК по изобретению и вектор Gad20 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит самореплицирующуюся молекулу РНК по изобретению и вектор MVA по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит самореплицирующуюся молекулу РНК по изобретению и вектор Ad26 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или более полинуклеотидов в соответствии с настоящим описанием. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или более полипептидов в соответствии с настоящим описанием. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну или более клеток в соответствии с настоящим описанием.

#### Другие молекулы.

#### Комплекс пептид-HLA.

В изобретении также предусмотрен белковый комплекс, содержащий человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) и полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31 или их фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой иммуногенный фрагмент любого из полипептидов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 6-25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 12

аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 14 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 21 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 22 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 23 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления фрагмент имеет длину около 25 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления HLA представляет собой HLA класса I или HLA класса II.

В некоторых вариантах осуществления HLA представляет собой HLA-A\*02:01, HLA-A\*03:01, HLA-B\*07:02 и HLA-C\*07:02 или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления белковый комплекс конъюгирован со средством для обнаружения или цитотоксическим средством.

В изобретении также предусмотрена выделенная белковая молекула, которая специфически связывается с полипептидом согласно изобретению или комплексом HLA и полипептида.

Белковые молекулы.

В некоторых вариантах осуществления белковая молекула представляет собой антитело, альтернативный каркас, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR).

В некоторых вариантах осуществления белковая молекула представляет собой антитело.

В некоторых вариантах осуществления белковая молекула представляет собой альтернативный каркас.

В некоторых вариантах осуществления белковая молекула представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления белковая молекула представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR).

Связывание белковой молекулы с полипептидом или комплексом пептида и HLA в соответствии с настоящим описанием можно определить экспериментально с использованием любого приемлемого способа. Такие способы могут включать применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, ИФА или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение связывания может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например,  $K_D$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ), как правило, проводятся в стандартизованных условиях и с использованием стандартизованного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением оборудования Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как среднеквадратичное отклонение (CO)), как правило, может составлять 5-33% для измерений, проводимых в границах типичных пределов обнаружения. Термин "несущественный" относится к связыванию, которое в 100 раз меньше по сравнению с измеренным связыванием белковой молекулы с полипептидами или HLA/пептидом по изобретению.

Антитела.

Антитела, связывающие полипептиды или комплексы HLA/пептид, могут быть получены с использованием известных способов. Например, для создания моноклональных антител можно применять способ гибридом по Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975. В способе гибридомы мышь или другое животное-хозяин, например хомяка, крысу или обезьяну, иммунизируют одним или более полипептидами или их фрагментами с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с получением клеток гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, подвергают скринингу для определения продукции антител с желательными свойствами, такими как специфичность связывания и аффинности.

Для получения антител можно использовать различных животных-хозяев. Например, можно использовать мышью Balb/c, крыс или цыплят для получения антител, содержащих пару VH/VL, а для создания антител только с тяжелой цепью (VHH) можно использовать лам и альпак с использованием стандартных протоколов иммунизации. Антитела, полученные от нечеловекоподобных животных, могут быть гуманизированы с применением разнообразных методик для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими последовательностями.

Примеры методик гуманизации, включающих в себя отбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают в себя прививание CDR (патент США № 5,225,539), прививание SDR (патент США № 6,818,749), изменение поверхности (Padlan, (1991) Mol Immunol 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию че-

ловеческого каркаса (патент США № 8748356) и супергуманизацию (патент США № 7709226). В этих способах CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO 1090/007861 и WO 1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для получения человеческих антител против белка-мишени можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши или крысы, которые описаны, например, в патенте США № 6150584, международной патентной публикации № WO99/45962, международных патентных публикациях № WO 2002/066630, WO 2002/43478, WO 2002/043478 и WO1990/04036. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron ([http://\\_www\\_regeneron\\_com](http://_www_regeneron_com)), Harbour Antibodies ([http://\\_www\\_hrabourantibodies\\_com](http://_www_hrabourantibodies_com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([http://\\_www\\_omtinc\\_net](http://_www_omtinc_net)), KyMab ([http://\\_www\\_kymab\\_com](http://_www_kymab_com)), Trianni ([http://\\_www.trianni\\_com](http://_www.trianni_com)) и Ablexis ([http://\\_www\\_ablexis\\_com](http://_www_ablexis_com)).

Антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг выработан с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные переменные области антител. Антитела по настоящему изобретению могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей переменные области тяжелой и легкой цепи антитела в виде полипептидов с белком оболочки бактериофага рIX. В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с необходимым антигеном, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессированы в виде полноразмерных IgG. Такие способы использования фагового дисплея для выделения человеческих антител описаны, например, в патенты США № 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка или химический синтез пептидов. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих в себя целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован *de novo* в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Альтернативные каркасы.

Альтернативные каркасы (также называемые миметиками антител), которые связываются с полипептидами или комплексами HLA/пептид, могут быть получены с использованием различных каркасов, известных в данной области и описанных в настоящем документе. Альтернативными каркасами могут быть моноклональные, выполненные с возможностью включения фибронектинового домена типа III (Fn3) фибронектина или тенасцина в качестве белкового каркаса (патент США No 6673901; патент США №. 6348584) или синтетические домены FN3, такие как тенкон, как описано в патентной публикации США №. 2010/0216708 и патентной публикации № 2010/0255056. Дополнительные альтернативные каркасы включают Adnectin™, an iMab, an Anticalin®, an EETI-II/AGRP, домен Куница, тиоредоксин-пептидный аптамер, Affibody®, a DARPIn, Affilin, Tetranection, Fynomer и Avimer. Альтернативными каркасами являются одноцепочечные полипептидные каркасы, которые содержат высокоструктурное ядро, связанное с переменными доменами с высокой конформационной толерантностью, позволяющее вставлять, удалять или производить другие замены в пределах переменных доменов. Библиотеки, внедряющие разнообразие в один или более переменных доменов, а в некоторых случаях в структурированную сердцевину, могут быть созданы с использованием известных протоколов, и полученные библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на предмет связывания с неоантигеном настоящего описания, а идентифицированные связывающие вещества могут быть дополнительно охарактеризованы на предмет их специфичности с использованием известных способов. Альтернативный каркас может быть получен из белка A, в частности, его Z-домена (аффитела), ImE7 (иммунные белки), BPTI/APPI (домены Куница), RAS-связывающего белка AF-6 (PDZ-домены), хариботоксина (токсин скорпиона), CTLA-4, Min-23 (ноттинсы), липокалина (антикалина), неокарзиностаина, фибронектинового домена, консенсусного домена с анкириновыми повторами или тиоредоксина (Skerra, A., "Alternative Non-Antibody Scaffolds for Molecular Recognition" *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:295-304 (2005); Hosse et al., "A New Generation of Protein Display

Scaffolds for Molecular Recognition," *Protein Sci.* 15:14-27 (2006); Nicaise et al., "Affinity Transfer by CDR Grafting on a Nonimmunoglobulin Scaffold," *Protein Sci.* 13:1882-1891 (2004); Nygren and Uhlen, "Scaffolds for Engineering Novel Binding Sites in Proteins," *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7:463-469 (1997).

Химерные антигенные рецепторы (CAR).

Могут быть созданы CAR, которые связывают полипептиды или комплексы HLA/пептид. Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой рецепторы, сконструированные методами генной инженерии. Эти сконструированные рецепторы могут быть легко вставлены в иммунные клетки, включая Т-клетки, и экспрессированы ими в соответствии с методиками, известными в данной области. С помощью CAR один рецептор может быть запрограммирован как на распознавание специфического антигена, так и на активацию иммунной клетки для атаки и разрушения клетки, несущей этот антиген, при связывании с этим антигеном. Если эти антигены существуют на опухолевых клетках, иммунная клетка, которая экспрессирует CAR, может нацеливаться на опухолевую клетку и уничтожать ее.

CAR, как правило, содержит внеклеточный домен, который связывается с антигеном, и необязательный линкер, трансмембранный домен и цитозольный домен, содержащий костимулирующий домен и/или сигнальный домен.

Внеклеточный домен в составе CAR может содержать любой полипептид, который связывается с нужным антигеном. Внеклеточный домен может содержать scFv, часть антитела или альтернативную каркасную молекулу. CAR также могут быть сконструированы с возможностью связывания с двумя или более нужными антигенами, которые могут быть расположены в тандеме и разделены линкерными последовательностями. Например, одно или более доменных антител, антител scFv, Igаа VHH или других фрагментов антител, содержащих только VH, могут быть расположены в тандеме посредством линкера для обеспечения биспецифичности или мультиспецифичности к CAR.

Трансмембранный домен CAR может быть получен из трансмембранного домена CD8, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD1a, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R а, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D и/или NKG2C. Внутриклеточный костимулирующий домен CAR может быть получен из внутриклеточных доменов одной или более костимулирующих молекул. Костимулирующие молекулы хорошо известны как молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примерами костимулирующих доменов, которые можно использовать в CAR, являются внутриклеточные домены 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.

Внутриклеточный сигнальный домен CAR может быть получен из сигнальных доменов рецепторов, например рецепторов CD3 $\zeta$  CD3 $\epsilon$ , CD22, CD79a, CD66d или CD39. "Внутриклеточный сигнальный домен" относится к части полипептида CAR, которая участвует в передаче сообщения об эффективном связывании CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки для запуска функции эффекторной клетки, например, активации, выработки цитокинов, пролиферации и цитотоксической активности, включая высвобождение цитотоксических факторов в клетку-мишень, связанную с CAR, или других клеточных ответов, запускаемых после связывания антигена с внеклеточным доменом CAR.

Необязательный линкер CAR, расположенный между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом, может представлять собой полипептид длиной от около 2 до около 100 аминокислот. Линкер может включать в себя гибкие остатки, такие как глицин и серин, или состоять из них, так что смежные домены белка могут свободно перемещаться относительно друг друга. Можно применять более длинные линкеры, если желательно обеспечить, чтобы два смежных домена не создавали стерических помех друг для друга. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают линкеры 2A (например, T2A), 2A-подобные линкеры или их функциональные эквиваленты, а также их комбинации. Линкер также может быть получен из шарнирной области или части шарнирной области любого иммуноглобулина.

Примеры CAR, которые можно использовать, представляют собой, например, CAR, который содержит внеклеточный домен, который связывает HLA в комплексе с фрагментом полипептидов CALR/JAK2 согласно настоящему изобретению, трансмембранный домен CD8 и сигнальный домен CD3 $\zeta$ . Другой пример CAR содержит трансмембранный домен CD8 или CD28, костимулирующий домен

CD28, 41BB или OX40 и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

CAR получают с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Внеклеточный домен, который связывается с нужным антигеном, может быть получен из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, полученных с использованием технологий, описанных в настоящем документе.

Т-клеточный рецептор (TCR).

Могут быть созданы TCR, которые связывают комплексы HLA/пептид согласно настоящему изобретению. TCR могут быть идентифицированы на основе связывания Т-клеток с комплексом HLA/пептид с последующим секвенированием TCR. Идентифицированный TCR может быть идентифицирован из  $\alpha\beta$  Т-клеток. Идентифицированные TCR могут быть дополнительно сконструированы для улучшения их аффинности, стабильности, растворимости и т. п. Например, TCR могут быть стабилизированы цистеином, экспрессированы в виде растворимых TCR, в виде одноцепочечных TCR, в виде слияния с N-концевыми или C-концевыми эпитопными метками, сконструированными для повышения стабильности с мутациями в гидрофобном ядре, такими как положения 11, 13, 19, 21, 53, 76, 89, 91 или 94 цепи, домен заменен  $\alpha$  и  $\beta$  цепь заменена вариabельным и/или константным доменом, как описано в US7329731, US7569664, US9133264, US9624292, US2016/0130319 и US9884075.

Способы применения любой из представленных в данном документе композиций.

В данном документе предусмотрены способы лечения субъекта композициями, раскрытыми в данном документе. Предусмотренные в данном документе способы включают введение любых полинуклеотидов, полипептидов, векторов и композиций по настоящему изобретению. Полинуклеотиды, полипептиды, векторы, композиции и схемы введения по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения, предотвращения или снижения риска клинического состояния.

В некоторых вариантах осуществления клиническое состояние представляет собой рак, миелопролиферативное заболевание или сердечно-сосудистое заболевание.

В некоторых вариантах осуществления клиническое состояние представляет собой рак, выбранный из рака легкого, лимфоидного рака, острого лимфолейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, плазмноклеточной миеломы, рака желчевыводящих путей, рака мочевого пузыря, рака печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак кожи, рака щитовидной железы, рака желудка, рака толстой кишки, рака толстой кишки, рака мочевыводящих путей, рака центральной нервной системы, нейробластомы, рака почки, рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичек и рака мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления клиническое состояние представляет собой миелопролиферативное заболевание, выбранное из первичного миелофиброза (MPN), истинной полицитемии (PV), эссенциальной тромбоцитемии (ET), первичного миелофиброза (PFM), вторичного миелофиброза, острого миелолейкоза (AML), вторичного AML, хронического миелоидного лейкоза (CML), клонального гемопоэза неопределенного потенциала (CHIP) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

В некоторых вариантах осуществления сердечно-сосудистое заболевание выбрано из острого коронарного синдрома, ишемического цереброваскулярного заболевания, ишемической болезни сердца, тромбоза, венозной тромбоэмболии, тромбоза глубоких вен, легочной эмболии, критических внутрибрюшных тромбозов, периферической артериальной болезни, гипертонии, сердечной недостаточности, мерцательной аритмии, ишемической болезни сердца, атеросклероза или клонального кроветворения.

В некоторых вариантах осуществления субъект не имеет филадельфийской хромосомы. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее не получал лечение. В некоторых вариантах осуществления субъект получает или предположительно становится устойчивым или рефрактерным к одному или более противораковым терапевтическим средствам. В некоторых вариантах осуществления субъект не удовлетворяет критериям для трансплантации стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления субъект получал лечение посредством трансплантации стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, раскрытых в данном документе, и при этом введение включает одно или несколько введений композиции. В некоторых вариантах осуществления клиническое состояние представляет собой рак, миелопролиферативное заболевание или сердечно-сосудистое заболевание.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, несущего мутацию экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, раскрытых в данном документе, и при этом введение включает одно или несколько введений композиции.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения или предотвращения миелопролиферативного заболевания у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, раскрытых в данном документе, и при этом введение включает одно или несколько введений композиции. В некоторых вариантах осуществления миелопролиферативное заболевание выбрано из первичного миелофиброза (MPN), истинной полицитемии (PV), эссенциальной тромбоцитемии (ET), первичного

миелофиброза (PFM), вторичного миелофиброза, острого миелолейкоза (AML), вторичного AML, хронического миелогенного лейкоза (CML), клонального гемопоэза неопределенного потенциала (CHIP) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, раскрытых в данном документе, и при этом введение включает одно или несколько введений композиции. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака легкого, лимфоидного рака, острого лимфолейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, плазмоклеточной миеломы, рака желчевыводящих путей, рака мочевого пузыря, рака печени, рак поджелудочной железы, рака предстательной железы, рак кожи, рака щитовидной железы, рака желудка, рака толстой кишки, рака толстой кишки, рака мочевыводящих путей, рака центральной нервной системы, нейробластомы, рака почки, рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичек и рака мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей любую из композиций, раскрытых в данном документе, и при этом введение включает одно или несколько введений композиции. В некоторых вариантах осуществления сердечно-сосудистое заболевание выбрано из острого коронарного синдрома, ишемического цереброваскулярного заболевания, ишемической болезни сердца, тромбоза, венозной тромбоземболии, тромбоза глубоких вен, легочной эмболии, критических внутрибрюшных тромбозов, периферической артериальной болезни, гипертонии, сердечной недостаточности, мерцательной аритмии, ишемической болезни сердца, атеросклероза и клонального кроветворения.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, содержащей полипептид, содержащий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, или полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, или вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, который содержит по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, где последовательности эпитопов выбраны из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPAR-PRTSREACLQGWTE), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации.

В любом из описанных в данном документе способов композиция, которую вводят субъекту, может содержать вектор, выбранный из аденовирусного вектора, альфа-вирусного вектора, вектора на основе поксвируса, аденоассоциированного вирусного вектора, ретровирусного вектора, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе способы включают одно или несколько введений композиций, представленных в изобретении. Например, способ включает первое введение, за которым следует второе введение, с периодом времени между двумя введениями.

В некоторых вариантах осуществления первое введение и второе введение могут включать одинаковые или разные композиции. Например, первое введение может включать композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопов, представленные под SEQ NO: 1, SEQ NO: 2, SEQ NO: 4, SEQ NO: 5 и SEQ NO: 6. В некоторых вариантах осуществления второе введение может включать композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопов, представленные под SEQ NO: 1, SEQ NO: 2, SEQ NO: 4, SEQ NO: 5 и SEQ NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления первое введение и второе введение осуществляют один раз в жизни субъекта. В некоторых вариантах осуществления первое введение и второе введение осуществляют два или более раз в течение жизни субъекта.

В некоторых вариантах осуществления период времени между первым введением и вторым введением составляет от около 1 недели до около 2 недель, от около 1 недели до около 4 недель, от около 1 недели до около 6 недель, от около 1 недели до около 8 недель, от около 1 недели до около 12 недель, от около 1 недели до около 20 недель, от около 1 недели до около 24 недель или от около 1 недели до около 52 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между первым введением и вторым введе-

нием составляет около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 5 недель, около 6 недель, около 7 недель, около 8 недель, около 9 недель, около 10 недель, около 11 недель, около 12 недель, около 13 недель, около 14 недель, около 15 недель, около 16 недель, около 17 недель, около 18 недель, около 19 недель, около 20 недель, около 21 недель, около 22 недель, около 23 недель, около 24 недель, около 25 недель, около 26 недель, около 27 недель, около 28 недель, около 29 недель, около 30 недель, около 31 недель, около 32 недель, около 33 недель, около 34 недель, около 35 недель, около 36 недель, около 37 недель, около 38 недель, около 39 недель, около 40 недель, около 41 недели, около 42 недель, около 43 недель, около 44 недель, около 45 недель, около 46 недель, около 47 недель, около 48 недель, около 49 недель, около 50 недель, около 51 недели или около 52 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между первым введением и вторым введением составляет около 2 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между первым введением и вторым введением составляет около 4 недель.

В некоторых вариантах осуществления первое введение и второе введение составляют цикл, и схема лечения может включать два или более циклов, причем каждый цикл разнесен на около 1 месяц, на около 2 месяца, на около 3 месяца, на около 4 месяца, на около 5 месяцев, на около 6 месяцев, на около 7 месяцев, на около 8 месяцев, на около 9 месяцев, на около 10 месяцев, на около 11 месяцев или на около 12 месяцев.

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Примеры призваны проиллюстрировать, но не ограничить описанные варианты осуществления. В некоторых вариантах осуществления первое введение и второе введение могут включать любую комбинацию векторов, представленных в табл. 1, или любую комбинацию эпитопов, представленных в табл. 2 ниже.

Таблица 1

Композиция вектора в первом и втором введении

<b>Первое введение</b>	<b>Второе введение</b>
Ad26	MVA
Ad26	GAd20
Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК
Ad26	Ad26
MVA	Ad26
MVA	GAd20
MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК
MVA	MVA
GAd20	Ad26
GAd20	MVA
GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК
GAd20	GAd20
Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26
Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA
Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20
Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК

Таблица 2

Эпитопы, присутствующие в векторной композиции первого и второго введения.

Когорта вакцины	Первое введение	SEQ ID NO:	Второе введение	SEQ ID NO:
1	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6
2	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2 + эпитоп 1 JAK2	1, 2, 6, 5
3	CALR-JAK2-2x9mer	12	CALR-JAK2-2x9mer	12
4	CALR-JAK2-30mer	13	CALR-JAK2-30mer	13
5	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10
6	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
7	LS_CALR-JAK2-30mer	11	LS_CALR-JAK2-30mer	11
8	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
9	Эпитоп 2 JAK2	6	Эпитоп 2 JAK2	6
10	CALR-JAK2-2x9mer	12	Эпитоп 2 JAK2	6
11	CALR-JAK2-30mer	13	Эпитоп 2 JAK2	6
9	JAK2epitope2.AAY. Эпитоп 2 JAK2	28	JAK2epitope2.AAY. Эпитоп 2 JAK2	28
10	CALR-JAK2-2x9mer	12	JAK2epitope2.AAY. Эпитоп 2 JAK2	28
11	CALR-JAK2-30mer	13	JAK2epitope2.AAY. Эпитоп 2 JAK2	28

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор Ad26; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор Ad26.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта вклю-



чает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор MVA; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор MVA.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более тандемных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК;

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более тандемных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК.

Третье введение

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать третье введение. Например, способ может включать первое введение, второе введение, за которым следует третье введение, с периодом времени между каждым введением.

В некоторых вариантах осуществления первое введение, второе введение и третье введение могут содержать одинаковые или разные композиции. Например, первое введение может включать композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопов, представленные под SEQ NO: 1, SEQ NO: 2, SEQ NO: 4, SEQ NO: 5 и SEQ NO: 6. В некоторых вариантах осуществления второе введение может включать композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопов, представленные под SEQ NO: 1, SEQ NO: 2, SEQ NO: 4, SEQ NO: 5 и SEQ NO: 6. В некоторых вариантах осуществления третье введение может включать композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопов, представленные под SEQ NO: 1, SEQ NO: 2, SEQ NO: 4, SEQ NO: 5 и SEQ NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления первое введение, второе введение и третье введение вводят один раз в течение жизни субъекта. В некоторых вариантах осуществления первое, второе и третье введение вводят два или более раз в течение жизни субъекта.

В некоторых вариантах осуществления период времени между вторым введением и третьим введением составляет от около 1 недели до около 2 недель, от около 1 недели до около 4 недель, от около 1 недели до около 6 недель, от около 1 недели до около 8 недель, от около 1 недели до около 12 недель, от около 1 недели до около 20 недель, от около 1 недели до около 24 недель или от около 1 недели до около 52 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между вторым введением и третьим введением составляет около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 5 недель, около 6 недель, около 7

недель, около 8 недель, около 9 недель, около 10 недель, около 11 недель, около 12 недель, около 13 недель, около 14 недель, около 15 недель, около 16 недель, около 17 недель, около 18 недель, около 19 недель, около 20 недель, около 21 недель, около 22 недель, около 23 недель, около 24 недель, около 25 недель, около 26 недель, около 27 недель, около 28 недель, около 29 недель, около 30 недель, около 31 недель, около 32 недель, около 33 недель, около 34 недель, около 35 недель, около 36 недель, около 37 недель, около 38 недель, около 39 недель, около 40 недель, около 41 недели, около 42 недель, около 43 недель, около 44 недель, около 45 недель, около 46 недель, около 47 недель, около 48 недель, около 49 недель, около 50 недель, около 51 недели или около 52 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между вторым введением и третьим введением составляет около 6 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между вторым введением и третьим введением составляет около 8 недель.

В некоторых вариантах осуществления первое введение, второе введение и третье введение вместе составляют цикл, и схема лечения может включать два или более циклов, причем каждый цикл разнесен на около 1 месяца, на около 2 месяца, на около 3 месяца, на около 4 месяца, на около 5 месяцев, на около 6 месяцев, на около 7 месяцев, на около 8 месяцев, на около 9 месяцев, на около 10 месяцев, на около 11 месяцев или на около 12 месяцев.

Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Первое, второе и третье введение, используемые в способах, описанных в данном документе, могут включать любую комбинацию эпитопов и композиций, представленных ниже в табл. 3 и табл. 4.

Таблица 3

Эпитопы, присутствующие в композиции вектора первого, второго и третьего введения

Когорта вакцины	Первое введение	SEQ ID NO:	Второе введение	SEQ ID NO:	Третье введение	SEQ ID NO:
1	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6
2	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2	1, 2, 6	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2 + эпитоп 1 JAK2	1, 2, 6, 5	Эпитоп 1 и 2 CALR1 + эпитоп 2 JAK2 + эпитоп 1 JAK2	1, 2, 6, 5
3	CALR-JAK2-2x9mer	12	CALR-JAK2-2x9mer	12	CALR-JAK2-2x9mer	12
4	CALR-JAK2-30mer	13	CALR-JAK2-30mer	13	CALR-JAK2-30mer	13
5	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10
6	LS_CALR-JAK2-2x9mer	10	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
7	LS_CALR-JAK2-30mer	11	LS_CALR-JAK2-30mer	11	LS_CALR-JAK2-30mer	11
8	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9mer	31
9	Эпитоп 2 JAK2	6	Эпитоп 2 JAK2	6	Эпитоп 2 JAK2	6

Таблица 4

Композиция вектора в первом, втором и третьем введении

Первое введение	Второе введение	Третье введение
Ad26	Ad26	Ad26
Ad26	Ad26	MVA
Ad26	Ad26	GAd20
Ad26	Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК
Ad26	MVA	Ad26
Ad26	MVA	MVA
Ad26	MVA	GAd20
Ad26	MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК
Ad26	GAd20	Ad26
Ad26	GAd20	MVA

## 048051

Ad26	GAd20	GAd20
Ad26	GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК
Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26
Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA
Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20
Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК
MVA	Ad26	Ad26
MVA	Ad26	MVA
MVA	Ad26	GAd20
MVA	Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК
MVA	MVA	Ad26
MVA	MVA	MVA
MVA	MVA	GAd20
MVA	MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК
MVA	GAd20	Ad26
MVA	GAd20	MVA
MVA	GAd20	GAd20
MVA	GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК
MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26
MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA
MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20
MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК
GAd20	Ad26	Ad26
GAd20	Ad26	MVA

GAd20	Ad26	GAd20
GAd20	Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК
GAd20	MVA	Ad26
GAd20	MVA	MVA
GAd20	MVA	GAd20
GAd20	MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК
GAd20	GAd20	Ad26
GAd20	GAd20	MVA
GAd20	GAd20	GAd20
GAd20	GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК
GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26
GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA
GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20
GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК
Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26	Ad26
Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26	MVA
Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26	GAd20
Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26	Самореплицирующаяся молекула РНК
Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA	Ad26
Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA	MVA
Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA	GAd20
Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA	Самореплицирующаяся молекула РНК
Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20	Ad26
Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20	MVA
Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20	GAd20
Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20	Самореплицирующаяся молекула РНК
Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК	Ad26
Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК	MVA
Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК	GAd20
Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК	Самореплицирующаяся молекула РНК

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклео-



чает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК;

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК; и

третье введение, включающее третью композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК.

Четвертое введение

В некоторых вариантах осуществления любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать четвертое введение. Например, способ может включать первое введение, второе введение, третье введение и четвертое введение с периодом времени между каждым введением. В некоторых вариантах осуществления первое введение, второе введение, третье введение и четвертое введение могут включать одинаковые или разные композиции.

Например, четвертое введение может включать композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопов, представленные под SEQ NO: 1, SEQ NO: 2, SEQ NO: 4, SEQ NO: 5 и SEQ NO: 6. В некоторых вариантах осуществления первое введение, второе введение, третье введение и четвертое введение осуществляют один раз в течение жизни субъекта.

В некоторых вариантах осуществления первое, второе, третье и четвертое введение вводят два или более раз в течение жизни субъекта.

В некоторых вариантах осуществления период времени между третьим введением и четвертым введением составляет от около 1 недели до около 2 недель, от около 1 недели до около 4 недель, от около 1 недели до около 6 недель, от около 1 недели до около 8 недель, от около 1 недели до около 12 недель, от около 1 недели до около 20 недель, от около 1 недели до около 24 недель или от около 1 недели до около 52 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между третьим введением и четвертым введением составляет около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 5 недель, около 6 недель, около 7 недель, около 8 недель, около 9 недель, около 10 недель, около 11 недель, около 12 недель, около 13 недель, около 14 недель, около 15 недель, около 16 недель, около 17 недель, около 18 недель, около 19 недель, около 20 недель, около 21 недель, около 22 недель, около 23 недель, около 24 недель, около 25 недель, около 26 недель, около 27 недель, около 28 недель, около 29 недель, около 30 недель, около 31 недель, около 32 недель, около 33 недель, около 34 недель, около 35 недель, около 36 недель, около 37 недель, около 38 недель, около 39 недель, около 40 недель, около 41 недели, около 42 недель, около 43 недель, около 44 недель, около 45 недель, около 46 недель, около 47 недель, около 48 недель, около 49 недель, около 50 недель, около 51 недели или около 52 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между третьим введением и четвертым введением составляет около 4 недель.

В некоторых вариантах осуществления период времени между третьим введением и четвертым введением составляет около 8 недель.

В некоторых вариантах осуществления первое введение, второе введение, третье введение и четвертое введение вместе составляют цикл, и схема лечения может включать два или более циклов, причем каждый цикл разнесен на около 1 месяц, на около 2 месяца, на около 3 месяца, на около 4 месяца, на около 5 месяцев, на около 6 месяцев, на около 7 месяцев, на около 8 месяцев, на около 9 месяцев, на около 10 месяцев, на около 11 месяцев или на около 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК;

третье введение, включающее третью композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или

самореплицирующейся молекулы РНК; и

четвертое введение, включающее четвертую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20;

третье введение, включающее третью композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор MVA; и

четвертое введение, включающее четвертую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК.

В некоторых вариантах осуществления способ индуцирования иммунного ответа или способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта включает цикл лечения, при этом каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20; и

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой вектор GAd20;

третье введение, включающее третью композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК, и

четвертое введение, включающее четвертую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий эпитоп CALR SEQ ID NO: 1, эпитоп CALR SEQ ID NO: 2, эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК.

Введение поддерживающей терапии.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту композиции через равные промежутки времени в течение циклов лечения и может продолжаться даже после окончания циклов лечения. Например, композицию можно вводить субъекту каждый месяц в течение схемы лечения и можно продолжать в течение дополнительных 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить между двумя циклами лечения. В некоторых вариантах осуществления композиция может представлять собой любую из композиций, раскрытых в данном документе, например, композицию, содержащую вектор, выбранный из вектора Ad26, вектора GAd20, вектора MVA или самореплицирующейся молекулы РНК, кодирующей последовательности эпитопа.

Доза и способ введения.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие аденовирусные векторы, вводят в дозе от около  $1 \times 10^4$  IFU (инфекционных единиц) до около  $1 \times 10^{12}$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^{11}$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^{10}$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^9$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^8$  IFU на дозу или от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^6$  IFU на дозу.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие аденовирусные векторы, вводят в дозе от около  $1 \times 10^6$  VP (вирусные частицы) до около  $1 \times 10^{14}$  VP на дозу, от около  $1 \times 10^6$  VP до около  $1 \times 10^{12}$  VP на дозу, от около  $1 \times 10^6$  VP до около  $1 \times 10^{10}$  VP на дозу, от около  $1 \times 10^6$  VP до около  $1 \times 10^8$  VP на дозу или от около  $1 \times 10^6$  VP до около  $1 \times 10^7$  VP на дозу.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащую вектор Ad26, вводят в дозе около  $1 \times 10^{10}$  IFU. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащую вектор Ad26, вводят в дозе

около  $1 \times 10^{11}$  IFU. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор Ad26, вводят в дозе около  $1 \times 10^{10}$  VP. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор Ad26, вводят в дозе около  $1 \times 10^{11}$  VP.

В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор GAd20, вводят в дозе около  $1 \times 10^8$  IFU. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор GAd20, вводят в дозе около  $1 \times 10^{10}$  IFU. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор GAd20, вводят в дозе около  $1 \times 10^{10}$  VP. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор GAd20, вводят в дозе около  $1 \times 10^{11}$  VP.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие векторы на основе поксвируса, вводят в дозе от около  $1 \times 10^4$  IFU (инфекционных единиц) до около  $1 \times 10^{12}$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^{11}$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^{10}$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^9$  IFU на дозу, от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^8$  IFU на дозу или от около  $1 \times 10^4$  IFU до около  $1 \times 10^6$  IFU на дозу.

В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор MVA, вводят в дозе около  $1 \times 10^8$  IFU. В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую вектор MVA, вводят в дозе около  $1 \times 10^{10}$  IFU.

В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие самореплицирующуюся молекулу РНК, вводят в дозе от около 1 мкг до около 100 мкг, от около 1 мкг до около 90 мкг, от около 1 мкг до около 80 мкг, от около 1 мкг до около 70 мкг, от около 1 мкг до около 60 мкг, от около 1 мкг до около 50 мкг, от около 1 мкг до около 40 мкг, от около 1 мкг до около 30 мкг, от около 1 мкг до около 20 мкг, от около 1 мкг до около 10 мкг или от около 1 мкг до около 5 мкг самореплицирующейся молекулы РНК.

В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, можно вводить субъекту различными способами, такими как подкожный, местный, пероральный и внутримышечный. Введение композиций можно осуществлять перорально или парентерально. Способы парентеральной доставки включают местное, внутриартериальное (непосредственно в ткани), внутримышечное, подкожное, интрамедуллярное, подоболочечное, внутрижелудочковое, внутривенное, внутрибрюшинное или интраназальное введение. Настоящее изобретение также имеет целью обеспечение подходящих местных, пероральных, системных и парентеральных составов для применения в способах профилактики и лечения.

В некоторых вариантах осуществления внутримышечное введение вакцины может быть выполнено с помощью иглы. Альтернативным вариантом является применение инъекционного устройства без иглы для введения композиции (с использованием, например, Biojector™) или сублимированного порошка, содержащего композицию вакцины. Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в пораженное место композиции может находиться в форме приемлемого для парентерального введения водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет приемлемый pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области легко могут получить приемлемые растворы, используя, например, изотонические несущие среды, такие как инъекция хлорида натрия, инъекция раствора Рингера, инъекция раствора Рингера с лактатом. При необходимости можно включить консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Можно также использовать состав с медленным высвобождением.

Как правило, введение будет иметь профилактическую цель для создания иммунного ответа против мутантного CALR и/или мутантной JAK2 до развития клинических симптомов. Композиции по настоящему описанию вводят субъекту, что приводит к иммунному ответу у субъекта. Количество композиции, способной вызывать обнаруживаемый иммунный ответ, определяется как "иммунологически эффективная доза". Композиции по настоящему описанию могут индуцировать гуморальный, а также клеточно-опосредованный иммунный ответ. В типичном варианте осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ.

Фактическое вводимое количество, а также скорость и динамика введения будут зависеть от характера и тяжести объекта лечения. Назначения лечения, например, решение о дозировке и т.д., находятся в пределах ответственности врачей общей практики и других медицинских специалистов и, как правило, учитывают расстройство, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ введения и другие известные медработникам факторы.

В одном примере схемы лечения композицию, содержащую аденовирусный вектор, вводят (например, внутримышечно) в объеме от приблизительно 100 мкл до приблизительно 10 мл, содержащем концентрации от приблизительно  $10^4$  до  $10^{12}$  вирусных частиц/мл. Композиция аденовирусного вектора может вводиться в объеме от 0,25 до 1,0 мл, например, в объеме 0,5 мл.

В одном примере схемы лечения введение композицию, содержащую вектор MVA, вводят (например, внутримышечно) в объеме, варьирующемся в диапазоне от около 100 мкл до около 10 мл физиологического раствора, содержащего дозу от около  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> до  $1 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub> (50%-ная инфекционная доза для культуры тканей) или инфекционных единиц. Композицию вектора MVA можно вводить в объеме в диапазоне от 0,25 до 1,0 мл.



Второе терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно включают введение второго терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой иммуностимулирующее средство, химиотерапевтическое средство, антибиотик, ингибитор контрольной точки или клеточную терапию.

В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство выбрано из антитела к CTLA-4, лиганда CTLA4, ингибитора оси PD-1, ингибитора оси PD-L1, агониста TLR, агониста CD40, агониста OX40, гидроксимочевины, руксолитиниба, федратиниба, агониста 41BB, агониста CD28, антагониста STING, антагониста RIG-1, терапии TCR-T, терапии CAR-T, лиганда FLT3, сульфата алюминия, ингибитора ВТК, ингибитора JAK, антитела к CD38, ингибитора CDK, антитела к CD33, антитела к CD37, антитела к CD25, ингибитора GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-7, молекул перенаправления CD3, помалимиба, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , антитела к VEGF, антитела к CD70, антитела к CD27, антитела к BCMA или антитела к GPRC5D, и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор контрольной точки, выбранный из пилимумаба, цетрелимаба, пембролизумаба, ниволумаба, ситилимумаба, цемиплимаба, торипалимаба, камрелизумаба, тислелизумаба, достралимаба, спартализумаба, пролголимаба, бальстилимаба, будигалимаба, сасанлимаба, авелумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, энвафолимаба, йодаполимаба или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор JAK.

В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство может быть введено в комбинации с первой композицией первого введения или второй композицией второго введения или третьей композицией третьего введения для введения или четвертой композицией четвертого введения.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CTLA-4 комбинируют с любым из первого, или второго, или третьего, или четвертого введения композиции согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 или антитело к PD-L1 комбинируют с любым из первого, или второго, или третьего, или четвертого введения композиции согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы контрольных точек вводят в виде дозы от около 0,5 до около 5 мг/кг, от около 5 до около 10 мг/кг, от около 10 до около 15 мг/кг, от около 15 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 20 мг/кг до около 25 мг/кг, от 20 мг/кг до около 50 мг/кг, от около 25 мг/кг до около 50 мг/кг, от около 50 мг/кг до около 75 мг/кг, от около 50 до около 100 мг/кг, от около 75 мг/кг до около 100 мг/кг, от около 100 мг/кг до около 125 мг/кг, от около 125 до около 150 мг/кг, от около 150 до около 175 мг/кг, от около 175 мг/кг до около 200 мг/кг, от около 200 мг/кг до около 225 мг/кг, от около 225 до около 250 мг/кг или от около 250 до около 300 мг/кг.

#### Примеры

Пример 1. Идентификация эпитопа 2 JAK2 V617F и оценка иммуногенности in-silico эпитопов JAK2 V617F.

Были созданы 17-мерная последовательность белка JAK2 с мутацией V617F в качестве центрального остатка и все 9-мерные смежные аминокислоты, содержащиеся в этой 17-мерной последовательности. Прогнозы in-silico аффинности связывания этих 9-меров с общими аллелями HLA-A и HLA-B были сделаны с использованием netMHCpan4.0. Прогнозы связывания были разделены на три категории: слабого связывания (прогнозируемая аффинность > 500 нм); умеренного связывания (прогнозируемая аффинность от 50 до 500 нм) и сильного связывания (прогнозируемая аффинность < 50 нм) с часто встречающимися аллелями HLA-A. 9-мерный эпитоп 1 JAK2 SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) и новый 9-мерный эпитоп 2 JAK2 SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) были выбраны из этого анализа для дальнейшего экспериментального наблюдения. Пептид SEQ ID NO: 6 ранее не был описан как иммуногенный фрагмент JAK2. Прогнозируемая аффинность связывания эпитопа 2 JAK2, показанная в табл. 5, ниже, чем связывание эпитопа 1 JAK2.

Таблица 5

Аффинность эпитопа 2 JAK2. Категории связывания представляют собой  
 несвязывающие вещества = ранг > 2,0;  
 умеренные связывающие вещества = ранг от 0,5 до 2,0;  
 сильные связывающие вещества = ранг < 0,5

Аллель	Аффинность связывания, нм	Ранг связывающего вещества
HLA-A01:01	22680	11
HLA-A02:01	2878	7
HLA-A03:01	42208	84
HLA-A24:02	41245	52
HLA-B07:02	40322	66
HLA-B08:01	35548	69
HLA-B15:01	38417	76
HLA-B27:05	40573	84
HLA-B40:01	39076	44

Пример 2. Иммуногенность мутантного JAK2 по сравнению с иммуногенностью эпитопа JAK2 дикого типа в образцах пациентов с заболеванием.

PBMC были выделены у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (ЕТ) или первичным миелофиброзом (PMF) с подтвержденной мутацией JAK617F. Отдельные пептиды mutJAK2 или JAK2 дикого типа, ассоциированные с классом I, экзогенно вводили в концентрации 5 мкг/мл до 250 000 PBMC в день 0. Клетки культивировали в течение 10 дней в присутствии 10 IU/мл человеческого IL-2 и 10 нг/мл человеческого IL-15, а затем оценивали частоту мутантных или антиген-специфических Т-клеток JAK2 дикого типа с помощью пептид-импульсного вторичного иммунного ответа и анализа методом проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием для выявления продуцирующих IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  CD8 $^+$  Т-клеток. Антигенспецифический ответ считали положительным, если частота IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  + CD8 $^+$  Т-клеток была в три раза выше по сравнению с клетками, обработанными ДМСО только в день 0 и превышала 0,1%. Результаты обобщены в табл. 6.

Таблица 6

Заболевание	№ донора	Контрольные вирусные антигены Ответ по CEF	Эпитоп 2 мутантной JAK2	Эпитоп 1 мутантной JAK2	Эпитоп 2 JAK2 дикого типа	Эпитоп 1 JAK2 дикого типа
PMF	120174174	Да	Да (30%)	Нет	Нет	Нет
PMF	120250311	Да	Нет	Нет	Нет	Нет
PMF	120800910	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
PMF	120800936	Да	Да (0,63%)	Да (0,62%)	Нет	Нет
PMF	120817869	Да	Нет	Нет	Нет	Нет
ЕТ	120708928	Да	Нет	Нет	Нет	Нет
ЕТ	120815833	Да	Да (30,6%)	Нет	Нет	Да (1,3%)
ЕТ	120824685	Да	Нет	Нет	Нет	Нет

Да указывает на 3-кратное увеличение частоты IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  + CD8 $^+$  Т-клеток по сравнению со стимулированными только ДМСО клетками для каждого донора. В скобках указана фактическая частота IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  + CD8 $^+$  Т-клеток.

На фиг. 1 показана иммуногенность эпитопа 1 JAK2 и эпитопа 2 JAK2 в образцах пациентов с заболеванием по сравнению с последовательностями дикого типа тех же областей эпитопа. Соответствующие пептидные последовательности дикого типа для эпитопов I и II mutJAK2 также были оценены, и было показано, что они имеют такие же ответы, как и контроль ДМСО.

Пример 3. Конструирование и создание полинуклеотидов и полипептидов CALR.JAK2 для экспрессии Ad26 и MVA.

Для выбора композиции вакцины, которая приводила к хорошей экспрессии антигена и активации

Т-клеток, был разработан и протестирован ряд полинуклеотидов и полипептидов CALR.JAK2.

Мутации CALR типа 1 и типа 2 были включены в полинуклеотид. На основании виртуального прогнозирования Т-клеточного эпитопа и исследований связывания HLA 54-мерный пептид (SEQ ID NO: 1) мутанта CALR типа 1 и укороченный 14-мерный пептид (SEQ ID NO: 2) белка мутантного CALR типа 2 были включены в состав полинуклеотида. Часть CARL полинуклеотида кодирует аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3. Для обеспечения хорошего внутриклеточного процессинга всех белков отдельные пептиды были соединены линкерами AAY (ala-ala-tyr), способствующими протеасомному расщеплению.

Кроме того, на основе прогнозирования *in silico* Т-клеточного эпитопа и исследований связывания HLA два различных пептида JAK2, 30-мерный пептид (SEQ ID NO: 4) или два 9-мерных пептида (SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6), каждый из которых содержит мутацию V617F. Пептид SEQ ID NO: 6 ранее не был описан как иммуногенный фрагмент JAK2.

Для обеспечения хорошего внутриклеточного процессинга всех белков отдельные пептиды также были соединены линкерами AAY (ala-ala-tyr), способствующими протеасомному расщеплению. SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность двух 9-меров JAK2, разделенных линкером AAY. Были сконструированы две разные конструкции, в которых части CALR были идентичны, но часть JAK2 представляла собой либо 30-мерный пептид, либо два 9-мерных пептида. Эти два разных трансгена были сконструированы либо без лидерной последовательности (LS), HAVT20 LS (MAC-PGFLWALVISTCLEFSMA; SEQ ID NO: 8), либо без сигнала убиквитина (Ubiq) (MQIFVKTLTGK-TITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRIRGV; SEQ ID NO: 54) на N-конце. Конструкции перечислены в табл. 3. HAVT20 LS должен направлять трансген в ER, тогда как последовательность убиквитина нацелена на протеасому. Это может привести к разным уровням экспрессии TG между конструкциями. Кроме того, была создана конструкция, кодирующая только последовательность из двух мутантных белков CALR, которую использовали в качестве контроля экспрессии белка CALR. Белковая и полинуклеотидная последовательности трансгенов показаны в табл. 7. Показанные полинуклеотидные последовательности были оптимизированы для экспрессии аденовируса.

Таблица 7

## Конструкции для экспрессии аденовируса

Название конструкции	Последовательности мутантного CALR	Последовательности мутантной JAK2
LS_CALR	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	нет
LS_CALR_JAK2-2x9mer	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	2 x 9-мерные
LS_CALR_JAK2-30mer	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	30-мерные
CALR_JAK2-2x9mer	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	2 x 9-мерные
CALR_JAK2-30mer	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	30-мерные
Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	2 x 9-мерные
Ubiq_CALR_JAK2-30mer	Тип 1 мутантного CALR, тип 2 усеченного мутантного CARL	30-мерные

LS: лидерная последовательность; Ubiq: убиквитин

Таблица 8

## SEQ ID полипептида CALR.JAK2 и SEQ ID NO полинуклеотида

Название конструкции	Белок, SEQ ID NO:	SEQ ID NO полинуклеотида
LS_CALR	9	16
LS_CALR_JAK2-2x9mer	10	17
LS_CALR_JAK2-30mer	11	18
CALR_JAK2-2x9mer	12	19
CALR_JAK2-30mer	13	20
Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	14	21
Ubiq_CALR_JAK2-30mer	15	22

Конструкции CALR.JAK2 клонировали в челночную плазмиду pUC57 с использованием стандартных способов экспрессии аденовируса. Кассета экспрессии состояла из промотора цитомегаловируса

(CMV), содержащего тетрациклиновый оператор (TetO), что позволяло использовать его в комбинации с клеточной линией PER.C6 TetR, последовательностью Козак, полинуклеотидом CALR.JAK2 и сигналом полиаденилирования вируса обезьяны 40 (SV40), фланкированным Ad26-специфическими последовательностями вне кассеты экспрессии. Эти фланкирующие Ad26-специфические последовательности были гомологичны последовательности плазмиды остова Ad26, чтобы обеспечить образование плазмиды путем гомологичной рекомбинации. Последовательность была оптимизирована для гена человека для усиленной экспрессии трансгена.

Для проверки экспрессии CALR.JAK2 с помощью этих различных конструкций клетки HEK293 трансфицировали соответствующими ДНК-плазмидами, а экспрессию в клеточных лизатах исследовали с помощью вестерн-блоттинга через 72 часа после трансфекции. Кроме того, активность протеасом ингибировали путем добавления ингибитора протеасом MG132 за 4 часа до сбора образцов для изучения влияния на экспрессию трансгена. Все конструкции экспрессировали эпитопы CALR.JAK2, и самая высокая экспрессия наблюдалась для конструкций с HAVT20 LS. Ингибирование протеасом умеренно повышало экспрессию трансгена конструкциями с убиквитиновым сигналом, но это различие не могло быть определено количественно вестерн-блоттингом. На основании данных об экспрессии CALR.JAK2 две конструкции с лидерной последовательностью (LS) HAVT20 были выбраны для выработки аденовируса, т.е. Ad26.LS\_CALR\_JAK2-30mer (Ad26HEME001) и Ad26.LS\_CALR\_JAK2-2x9mer (Ad26HEME002). Кроме того, в качестве возможного контроля был получен Ad26-LS-CALR (Ad26HEME003). Полинуклеотидная последовательность Ad26HEME001, содержащая промотор цитомегаловируса (CMV), содержащий тетрациклиновый оператор (TetO), последовательность Козак, CALR, JAK2 и сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40 (SV40), показана в SEQ ID NO: 23. Полинуклеотидная последовательность Ad26HEME002, содержащая промотор цитомегаловируса (CMV), содержащий тетрациклиновый оператор (TetO), последовательность Козак, CALR.JAK2 и сигнал полиаденилирования вируса обезьяны 40 (SV40), показана в SEQ ID NO: 24.

Для выбора клеточной линии для выработки Ad26HEME001 и Ad26HEME002 способность к спасению вируса измеряли путем трансфекции ДНК вирусного генома в клетках PER.C6® по сравнению с клетками PER.C6 TetR. Цитопатический эффект (CPE) и образование бляшек (вместе показывающие спасательную способность) были сопоставимы между конструкциями Ad26HEME001 и Ad26HEME002 (табл. 9). Таким образом, обе конструкции показали полный CPE в течение 8 дней на клетках PER.C6 TetR, но не на клетках PER.C6®. Ad26HEME001 и Ad26HEME002 продемонстрировали около 13 и около 11 бляшек соответственно на клетках PER.C6® и >100 бляшек на клетках PER.C6 TetR для совместной легкой трансфекции в день 8. Это указывало на то, что способность к спасению ингибировалась на клетках PER.C6®. Аденовирусные векторы, которые трудно спасти, имеют ограниченные характеристики продуктивности и имеют высокий риск делеций и мутаций в кассете экспрессии трансгена. На основании этих результатов PER.C6 TetR был выбран в качестве клеточной линии для выработки вирусов Ad26HEME001 и Ad26HEME002. Ad26HEME003 также вырабатывался на клетках PER.C6 TetR.

Таблица 9

	Полный CPE PER.C6® / PER.C6 TetR	№ бляшек PER.C6® / PER.C6 TetR
Ad26HEME001	№ CPE / < 8 дней	13 / >100
Ad26HEME002	№ CPE / < 8 дней	11 / >100

Пример 4. Получение Ad26HEME001 и Ad26HEME002.

Исследовательские партии были созданы из клеток, трансфицированных одноклеточными плазмидами pAd26HEME001 (pAd26.LS\_CALR\_JAK2-30mer), pAd26HEME002 (pAd26.LS\_CALR\_JAK2-2x9mer) и pAd26HEME003 (pAd26.LS\_CALR).

Плазмидную ДНК pUC57 использовали для клонирования кассеты экспрессии TG ранней области 1 Ad26 (E1) в остов pAd26 для создания плазмид pAd26HEME001, pAd26HEME002 и pAd26HEME003. Область E1 в остове pAd26 была удалена, чтобы сделать вектор неспособным к репликации в некомплементарных клетках, таких как клетки человека. Кроме того, часть ранней области 3 Ad26 (E3) была удалена (ΔE3), чтобы создать достаточное пространство в вирусном геноме для вставки чужеродных антигенов, и открытая рамка считывания (orf) ранней области 4 Ad26 (E4) 6 была заменена гомологом аденовируса типа 5 (Ad5), чтобы обеспечить выработку неспособных к репликации векторов Ad26 в клеточных линиях, дополняющих Ad5-E1, таких как клетки HEK293, PER.C6® и HER96. Остов pAd26 линеаризовали с использованием уникального сайта рестрикции (AsiSI) в области, в которую позже была введена кассета TG. Оба конца этой линеаризованной плазмиды содержали перекрывающиеся последовательности, гомологичные Ad26-специфическим последовательностям, присутствующим снаружи кассеты экспрессии трансгена E1. Это позволило получить плазмиду путем клонирования трансгенной кассеты в остов pAd26 с использованием методов гомологичной рекомбинации. Были проверены полные последовательности плазмид.

Для создания векторов Ad26HEME001, Ad26HEME002 и Ad26HEME003 плазмиды трансфицировали в клетки PER.C6 TetR. Вирус амплифицировали на клетках PER.C6 TetR, очищали и тестировали на

целостность и идентичность генома аденовируса и правильную экспрессию TG.

Образование и характеристика партии.

Были созданы и охарактеризованы исследовательские партии одна Ad26HEMEO01, две Ad26HEMEO02 и одна Ad26HEMEO03 для оценки инфекционности, экспрессии трансгена, генетической стабильности партии и относительной продуктивности в суспензии клеток PER.C6 (sPER.C6) TetR. Все исследовательские партии были созданы на адгерентных клетках PER.C6 TetR. Качество партии характеризовалось экспрессией кодируемого антигена в нереплицирующихся условиях, количеством вирусных частиц (VP) и инфекционных единиц (IU).

Все полученные исследовательские партии показали экспрессию кодируемого антигена, как показал вестерн-блоттинг, и все партии имели низкие отношения VP/IU. Исследовательская партия Ad26HEMEO01 показала соотношение VP/IU, равное 29. Две исследовательские партии Ad26HEMEO02 показали соотношение VP/IU, равное 5, а Ad26HEMEO03 показало соотношение VP/IU, равное 8. Как генетическая стабильность, так и продуктивность важны для возможности масштабирования производства аденовирусных векторов до материала для клинических испытаний (СТМ) или в промышленных масштабах. Риск генетической нестабильности, определяемый изменениями в геноме вектора и появлением популяции с нежелательными свойствами во время размножения в производственной клеточной линии, можно оценить путем размножения нескольких популяций вируса в небольшом масштабе. Для всех исследовательских партий генетическую стабильность оценивали на материале конечной партии с помощью полимеразной цепной реакции идентичности (ID PCR) для области трансгена, области гена E3 и области гена E4. Кроме того, был секвенирован продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР) области трансгена. Все исследовательские партии оказались генетически стабильными.

Продуктивность (определяемую по титру VP/мл) оценивали в мелкомасштабных экспериментах путем сравнения вектора-кандидата вакцины с соответствующими эталонными контролями, производительность которых в 10-литровом биореакторе с усиленным процессом (PIN) известна. Вкратце, клетки sPER.C6 TetR трансдуцировали с использованием 70, 300 и 900 VP/клетку очищенного исследовательского материала и двух эталонных контролей Ad26. Ad26HEMEO01, Ad26HEMEO02 и Ad26HEMEO03 продемонстрировали сравнимую со стандартным контролем продуктивность при 70, 300 и 900 VP/клетку, что указывает на то, что все три вектора являются хорошими производителями (контроль показал ожидаемый результат) с  $\sim 10^{11}$  VP/мл, полученным через 2-3 дня в культуре. Полинуклеотидная последовательность вектора Ad26HEMEO02, включающая различные элементы, показана в SEQ ID NO: 24, а аминокислотные последовательности, кодируемые ими, показаны как SEQ ID NO: 10.

Пример 5. Создание конструкции MVA.CALR.JAK2 и GAd20.CALR.JAK2.

Аминокислотная последовательность трансгена CALR. JAK2 была преобразована в нуклеотидную последовательность на основе использования кодонов человека. Мотивы терминации для вектора MVA (TTTTnT) избегали. Затем перед нуклеотидной последовательностью добавляли сайт рестрикции BamHI и последовательность Козак. Два стоп-кодона, за которыми следовал сайт рестрикции AscI, были добавлены ниже нуклеотидной последовательности. Полинуклеотид энхансера T-клеток (TCE), кодирующий небольшой пептидный фрагмент длиной 28 ак из инвариантной цепи рыбы-мандарина (SEQ ID NO: 29) помещали на N-конце трансгена. Данные доклинических исследований показали, что эта последовательность повышает иммунологический ответ вирусного вектора. Синтез трансгена проводили с использованием известных способов.

Трансген MVA, клонированный под контролем раннего/позднего промотора осповакцины P7.5 (SEQ ID NO: 32), был вставлен путем гомологичной рекомбинации в локус делеции III MVA (области FlankIII-1 и -2) и рекомбинантные вирусные частицы производились известными способами.

Трансген GAd20 субклонировали в транспортную плазмиду челночного типа между промотором CMV с двумя повторами TetO и BGH polyA посредством сайтов рестрикции EcoRI-NotI. Полученную экспрессионную кассету переносили в геном GAd20 путем гомологичной рекомбинации в подходящих штаммах E. coli, трансформированных фрагментом ДНК CMV-трансген-BGH и конструктом, несущим геном GAd20. Рекомбинация включала CMV и BGH в качестве гомологичных плеч, которые уже присутствовали в конструкте GAd20 вместо делеции E1 (сайт встраивания трансгена). Затем рекомбинантные векторы GAd20 восстанавливали путем трансфекции комплементарных E1, экспрессирующих TetR клеток M9 и амплифицировали путем последующей реинфицирования свежих клеток M9.

Векторы MVA и GAd20, экспрессирующие полипептид TCE\_CALR\_JAK2-2x9mer (SEQ ID NO: 31) (HCalJ-9.9), были получены с использованием известных способов.

Пример 6. Векторы Ad26.CALR.JAK2 экспрессируют, процессируют и представляют антиген аутологичным T-клеткам.

Цель этого исследования заключалась в проверке способности антигенпрезентирующих клеток человека (APC) обрабатывать и представлять неоантигены вакцины и создавать T-клеточный ответ.

Замороженные флаконы с аутологичными CD1c<sup>+</sup> DC и аутологичными CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-клетками выделяли с помощью отрицательной селекции на магнитных шариках. CD1c<sup>+</sup> DC инфицировали при множественности заражения (MOI) 50000 VP в течение ночи Ad26HEMEO02 или Ad5HEMEO02 (вектор Ad5, сконструированный для экспрессии трансгена LS\_CALR\_JAK2-2x9mer). Через 18-24 часа после инфици-

рования идентичные донорские аутологичные Т-клетки смешивали с CD1c<sup>+</sup> DC в соотношении 10:1. Человеческий IL-15 в концентрации 10 нг/мл добавляли к культуре в день 0, и каждые 2-3 дня до 11 дня проводили половинные замены среды с 2×IL-15 и IL-2 (10 IU/мл). В день 11 пептиды, соответствующие белку CALRmut, JAK2V617F или адено-гексон (положительный контроль), добавляли в культуру DC/Т-клеток на ночь вместе с ингибиторами транспорта белка. Полученные культуры окрашивали на маркеры Т-клеток (CD4, CD8, CD3) и маркеры активированных Т-клеток (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Повышенное окрашивание IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  после стимуляции пептидов в течение ночи на 11-й день указывало на увеличение CALRmutant и/или антиген-специфических Т-клеток JAK2V617F, в частности, из-за Ad26/Ad5-HEME002-управляемой экспрессии трансгена. Положительным ответом считалось 3-кратное увеличение количества CD8 Т-клеток, дважды положительных по IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , по сравнению с пустым вектором Ad26/Ad5. Критериями исключения были (i) ответы адено-гексона ниже 0,5% дважды положительных Т-клеток по IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , или (ii) <1% вирусного антигена (конструкция адено-CEF) дважды положительных Т-клеток по IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ; в этом случае эксперимент считался неоптимальным, а отрицательный ответ, вероятно, был технической ошибкой донора или организации эксперимента.

Всего было проверено 24 уникальных здоровых донорских клетки. На фиг. 2 показан репрезентативный результат скрининга одного донора в отношении CALR-мутантных специфических Т-клеточных ответов. В эксперименте клетки гейтировали на живых/CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клетках и оценивали окрашивание IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . После инфицирования наблюдались ответы как CD8 (класс I), так и CD4 (класс II). Эксперименты проводились с использованием 3 независимых анализов, и частота ответов была одинаковой во всех экспериментах, около 35%, независимо от того, использовался Ad26 или Ad5. На фиг. 3 показано, что оба эпитопа JAK2, включенные в состав вакцины (SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC); эпитоп 1 на фиг. 3 и SEQ ID NO: 6; эпитоп 2 FCGDENILV на фиг. 3), являются иммуногенными. На фиг. 4 показан репрезентативный результат скрининга одного донора в отношении специфических для мутанта JAK2 Т-клеточных ответов. Данные показали, что оба мутантных неопитопа JAK2 были процессированы из последовательности трансгена вакцины, что указывает на то, что эти эпитопы могут быть представлены раковыми клетками. Типы HLA всех протестированных доноров представлены в табл. 10.

Таблица 10

Донор	HLA A1	HLA B1	HLA C1	HLA A2	HLA B2	HLA C2
2480	03:01	15:03	2:10	23:01	44:02	05:01
013В	01:01	07:02	07:01	03:01	08:01	07:02
4384	24:02	35:01	04:01	30:01	42:01	07:01
118	02:01	14:02	1:01	68:02:00	27:05	8:02
676	1:01	08:01	3:04	32:01:00	15:01	7:01
274	03:01					
3942	02:02	08:01	03:04	03:01		07:02
240	03:01	15:03	02:10	23:01	44:02:00	5:01
644	03:01	07:02	06:02	66:01:00	13:02	7:02
359	1:01	07:02	7:01	03:01	08:01	7:01
538	02:01	27:05	1:02	03:01	38:01:00	12:03

Пример 7. Векторы Ad26.CALR.JAK2 экспрессируют индуцированные клеточные ответы у мышей.

Цель исследования состояла в том, чтобы проверить, были ли ответы Т-клеток, индуцированные Ad26HEME001 или A26HEME002, выше, чем ответы, индуцированные пустым вектором Ad26, с помощью иммуноферментного анализа на IFN- $\gamma$  (метод иммуноферментных пятен), и выбрать оптимальную линию мышей для дальнейших исследований иммуногенности.

Линии мышей C57BL/6 и Balb/c были протестированы для данного исследования иммуногенности, поскольку анализ предсказания эпитопов показал, что в этих линиях мышей присутствуют потенциальные эпитопы Т-клеток CD8. Мышам вводили дозу 10<sup>10</sup> VP/мышь Ad26HEME001 или Ad26HEME002, или Ad26, не кодирующего трансген (Ad26.Empty). Совокупности 15-мерных перекрывающихся пептидов, охватывающие вставку Ad26HEME001 или Ad26HEME002, использовали для оценки клеточного иммунного ответа через 14 дней после первичной вакцинации (метод иммуноферментных пятен IFN- $\gamma$ ). Экспериментальные группы показаны в табл. 11.

Таблица 11

Номер	№ животного	Описание групп	Линия мыши
1a	4	Ad26.Empty доза $10^{10}$ VP	C57BL/6
1b	4	Ad26.Empty доза $10^{10}$ VP	Balb/c
2	8	Ad26HEMEO01 доза $10^{10}$ VP	C57BL/6
3	8	Ad26HEMEO02 доза $10^{10}$ VP	C57BL/6
4	8	Ad26HEMEO01 доза $10^{10}$ VP	Balb/c
5	8	Ad26HEMEO02 доза $10^{10}$ VP	Balb/c

Специфичный в отношении вставки Т-клеточный ответ возник через 14 дней после примирования у мышей C57BL/6 и Balb/c, что было измерено с помощью метода иммуоферментных пятен для обнаружения IFN- $\gamma$ , и у животных, иммунизированных Ad26HEMEO01 (фиг. 5) или Ad26HEMEO02 (фиг. 6), был значительно более высокий иммунный ответ по сравнению с индуцированным Ad26.Empty у иммунизированных животных. Не было обнаружено клеточного иммунного ответа против пептида LS (данные не показаны). Не было существенной разницы между иммунным ответом, индуцированным двумя векторами, между линиями мышей. Точно так же не было существенной разницы между иммунным ответом на совокупность пептидов HEMEO01, индуцированным Balb/c и C57BL/6, при рассмотрении вакцин-кандидатов. Имелась значительная разница между иммунным ответом на совокупность пептидов HEMEO02, индуцированным Balb/c и C57BL/6, при рассмотрении вакцин-кандидатов.

Пример 8. Векторы Ad26.CALR.JAK2 и MVA.CALR.JAK2 индуцируют клеточные ответы у мышей.

Цель этих исследований состояла в том, чтобы определить, может ли модифицированный вектор вакцины Ankara (MVA), кодирующий HCalJ-9.9 (т.е. MVA-HCalJ-9.9, MVAHEMEO02), усиливать иммунный ответ, индуцированный первичной иммунизацией Ad26HEMEO02 у мышей Balb/c. Линия мышей Balb/c была выбрана на основании данных, описанных в примере 7, где наблюдалась меньшая изменчивость в линии мышей Balb/c по сравнению с линией мышей C57BL/6.

В первом исследовании Ad26HEMEO02 вводили в дозе  $10^{10}$  VP, а MVA-HCalJ-9.9 - в дозе  $10^7$  IU. На неделе 0 мышей иммунизировали внутримышечной инъекцией Ad26HEMEO02; половина животных не подвергалась усиленной иммунизации (группа 2), а половина животных была простимулирована на неделе 3 с помощью MVA-HCalJ-9.9 (группа 3). Другая группа мышей была иммунизирована (примирована) посредством MVA-HCalJ-9.9 на неделе 3 (группа 1). Контрольным мышам на неделе 0 вводили Ad26.Empty (группа 4). На 4-й неделе всех животных умерщвляли и спленциты стимулировали 15-мерными перекрывающимися пептидными совокупностями, охватывающими вставку Ad26HEMEO02, или пептидными совокупностями, покрывающими последовательность CALR во вставке, или 9-мерными совокупностями, покрывающими две 9-мерные последовательности JAK2. Индукцию IFN- $\gamma$ -вырабатывающих клеток измеряли с помощью метода иммуоферментных пятен для выявления IFN- $\gamma$ . В табл. 12 показаны различные экспериментальные группы.

Таблица 12

Номер	№ животного	Описание групп
1 (№ 5)	5	MVA-HCalJ-9.9 доза $10^7$ IU
2 (№ 7)	10	Ad26HEMEO02 доза $10^{10}$ VP
3 (№ 8)	10	Ad26HEMEO02 доза $10^{10}$ VP / MVA-HCalJ-9.9 доза $10^7$ IU
4 (№ 9)	3	Ad26.Empty доза $10^{10}$ VP

У всех животных, иммунизированных либо Ad26HEMEO02 отдельно, либо в комбинации со стимуляцией MVA-HCalJ-9.9, появились клетки, продуцирующие IFN- $\gamma$ , при стимуляции пептидной совокупностью, состоящей из 15-мерных пептидов, перекрывающихся 11 аминокислотами и покрывающих весь HEMEO02 (LS\_CALR.JAK2.2x9mer) (фиг. 7), или пептидной совокупностью mutCALR, состоящей из 15-мерных пептидов, перекрывающихся 11 аминокислотами и покрывающих только часть mutCALR HEMEO02 (фиг. 8). Напротив, при стимуляции двумя 9-мерными пептидами JAK2 не было обнаружено индукции цитокин-продуцирующих клеток (данные не показаны). Важно отметить, что стимуляция с помощью MVA-HCalJ-9.9 после первичной иммунизации Ad26HEMEO02 (группа 3) индуцировала значительно более высокий ответ, чем у животных, примированных только Ad26HEMEO02 на неделе 0 (группа 2) (совокупность пептидов HEMEO02:  $p=0,038$ ; совокупность пептидов CALRmut:  $p=0,00025$ ; ANOVA). В заключение, данные метода иммуоферментных пятен показали, что MVA способен усиливать специфичный для вставки клеточный иммунный ответ, индуцированный первичной иммунизацией Ad26HEMEO02.

Во втором исследовании Ad26HEMEO02 вводили в дозе  $10^9$  VP или  $10^{10}$  VP, а MVA-HCalJ-9.9 - в дозе  $10^7$  IU. На неделе 0 мышей иммунизировали внутримышечной инъекцией Ad26HEMEO02 с последующей стимуляцией на неделе 3 с помощью MVA-HCalJ-9.9. На 4-й неделе всех животных умерщвляли

и спленоциты стимулировали 15-мерными перекрывающимися пептидными совокупностями, охватывающими вставку Ad26HEMEO02, или пептидными совокупностями, покрывающими последовательность CALR во вставке, или 9-мерными совокупностями, покрывающими две 9-мерные последовательности JAK2. Индукцию IFN- $\gamma$ -вырабатывающих клеток измеряли с помощью метода иммуоферментных пятен для выявления IFN- $\gamma$ . Примирование Ad26HEMEO02 в дозе  $1 \times 10^{10}$  VP с последующей стимуляцией MVA-HCaJ-9.9 в дозе  $1 \times 10^7$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) приводило к статистически значимому увеличению IFN- $\gamma$  по сравнению с вектором Ad26.Empty только в дозе  $1 \times 10^{10}$  VP (3,2-кратное увеличение,  $p=0,0042$ ). Напротив, никаких значительных изменений в IFN- $\gamma$  не наблюдалось при более низкой дозе примирования Ad26HEMEO02 при  $1 \times 10^9$  VP с последующей стимуляцией MVA-HCaJ-9.9 при  $1 \times 10^7$  БОЕ ( $p=0,090$ ). Повышение количества IFN- $\gamma$ -продуцирующих спленоцитов наблюдалось при дозе  $1 \times 10^{10}$  VP Ad26HEMEO02 по сравнению с дозой  $1 \times 10^9$  VP. На фиг. 9 показаны результаты экспериментов.

Пример 9. Иммуногенность Ad26HEMEO02 и MVA-HCaJ 9.9 у нечеловекообразных приматов (NHP).

Основная цель исследования заключалась в том, чтобы определить, вызывает ли вакцинация Ad26HEMEO02 и MVA-HCaJ-9.9 CALR- и/или JAK2-специфические Т-клеточные ответы, которые были больше по величине и продолжительности, чем вакцинация только Ad26HEMEO02 при NHP. Вторичная цель состояла в том, чтобы оценить, способно ли моноклональное антитело к CTLA-4, то есть YER-VOY® (ипилимумаб) (Ipi), в комбинации с Ad26HEMEO02 и MVA-HCaJ-9.9 усиливать иммунный ответ. Кроме того, цель исследования состояла в том, чтобы оценить, способны ли антитела к CTLA-4 в комбинации с гомологами при двухкратном дозировании Ad26HEMEO02 усиливать специфичные для вставки Т-клеточные ответы по сравнению с Ad26HEMEO02 при однократном дозировании.

Яванских макаков иммунизировали в/м Ad26HEMEO02 и/или MVA-HCaJ-9.9 отдельно или в комбинации с Ipi (10 мг/кг внутривенно [в/в]) в соответствии со схемой, показанной в табл. 13. Вкратце, NHP иммунизировали Ad26HEMEO02 ( $5 \times 10^{10}$  VP, в/м) отдельно (группа 1 и группа 2) или в комбинации с Ipi 10 мг/кг внутривенно (группа 3 и группа 4). На 4-й и 8-й неделе животных стимулировали только MVA-HCaJ-9.9 ( $10^8$  IU, в/м, группа 2) или MVA-HCaJ-9.9 в комбинации с Ipi 10 мг/кг внутривенно (группа 3), или животных стимулировали Ad26HEMEO02 в комбинации с Ipi на 4 неделе с последующим введением на 14 неделе дозы MVA-HCaJ-9.9 в комбинации с Ipi 10 мг/кг в/в (группа 4), или животных не получали никакой стимуляции (группа 1). У животных брали кровь в различные моменты времени и отделяли PBMC и сыворотку крови для иммунологических анализов. Индукцию иммунных ответов на CALRmut или JAK2 оценивали в PBMC в различные моменты времени во время исследования методом иммуоферментных пятен для обнаружения IFN- $\gamma$  с использованием совокупностей пептидов, охватывающих последовательность вставки CALRmut или JAK2 2 $\times$ 9, лидерную последовательность или всю вставку (HEMEO02; CALR\_JAK2-2 $\times$ 9mer).

Таблица 13

Номер	№ животного	Иммунизация				Ipi мг/кг в/в
		(Неделя 0)	(Неделя 4)	(Неделя 8)	(Неделя 14)	
1	5	Ad26HEMEO02 ( $5 \times 10^{10}$ VP)	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
2	7	Ad26HEMEO02 ( $5 \times 10^{10}$ VP)	MVA-HCaJ-9.9 ( $10^8$ IU)	MVA-HCaJ-9.9 ( $10^8$ IU)	Н/П	Н/П
3	7a	Ad26HEMEO02 ( $5 \times 10^{10}$ VP)	MVA-HCaJ-9.9 ( $10^8$ IU)	MVA-HCaJ-9.9 ( $10^8$ IU)	Н/П	10
4	5	Ad26HEMEO02 ( $5 \times 10^{10}$ VP)	Ad26HEMEO02 ( $5 \times 10^{10}$ VP)	Н/П	MVA-HCaJ-9.9 ( $10^8$ IU)	10

Ipi, ипилимумаб; пг, номер; VP, вирусные частицы IU, единицы инфицирования; в/в, внутривенно; PBMC = мононуклеарные клетки периферической крови.

Высокие неспецифические исходные ответы наблюдались у нескольких животных в различные моменты времени в ходе исследования, что может затруднить интерпретацию особенно низких ответов. Все животные были включены в набор данных.

Обнаружимый иммунный ответ на совокупности пептидов JAK2 или лидерной последовательности отсутствовал во все моменты времени, когда проводилось измерение (данные не показаны). Величина и частота ответов, измеренные для совокупностей пептидов CALR и CALR\_JAK2-2 $\times$ 9mer (HEMEO02), были очень схожими, и поэтому показан только набор данных CALR\_JAK2-2 $\times$ 9mer (HEMEO02). На фиг. 10 показана кинетика индукции IFN- $\gamma$ -продуцирующих Т-клеток человека, специфичных к HEMEO02, в четырех группах. Однократная иммунизация Ad26HEMEO02 не приводила к появлению обнаружимого количества клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ , на совокупность пептидов HEMEO02 ни у одного из животных (фиг. 10). Напротив, HEMEO02-специфичные клетки, продуцирующие IFN- $\gamma$ , присутствовали в низ-



ком, но обнаружимом количестве у 5 из 12 животных, иммунизированных Ad26HEME002 в комбинации с Ipi (группа 3 и группа 4 вместе) на неделе 2 (фиг. 12) и 4 (данные не показаны), и этот иммунный ответ был значительно выше, чем у животных, которым вводили только Ad26HEME002 ( $p < 0,001$ ).

Иммунный ответ на CALR\_JAK2-2x9mer (HEME002) наблюдался, начиная с недели 6, у животных, получавших дозы Ad26HEME002 и MVA-HCalJ-9.9. Отмечалось лишь незначительное изменение доли животных с ответом (3-4 из 7 животных) вне зависимости от того, получали ли животные одну дозу (фиг. 13) или две дозы (фиг. 14) MVA-HCalJ-9.9. У животных с ответом средняя величина иммунного ответа HEME002 варьировала от 129 до 453 SFU/10<sup>6</sup> клеток (фиг. 13-15). На фиг. 11 показан иммунный ответ через -2 недели исследования (т.е. через 2 недели до первой дозы). На фиг. 12 показан иммунный ответ через 2 недели. На фиг. 13 показан иммунный ответ на 6 неделе. На фиг. 14 показан иммунный ответ на 10 неделе. На фиг. 15 показан иммунный ответ на 16 неделе. У животных, которым вводили MVA-HCalJ-9.9 в комбинации с Ipi на 4-й неделе и на 8-й неделе (группа 3), наблюдалось увеличение выраженности HEME002-специфического иммунного ответа по сравнению с последующей иммунизацией Ad26HEME002 (средний ответ ответивших животных: 93 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 2-й неделе, 1945 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 6-й неделе и 983 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 10-й неделе), в то время как общее число животных с ответом не увеличилось при сравнении данных до и после введения дозы MVA.

Наблюдалось увеличение количества клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$ , после введения двух доз Ad26HEME002 в комбинации с Ipi по сравнению с однократным введением Ad26HEME002 в комбинации с Ipi (группа 4): средний ответ HEME002 у животных с ответом 93 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 2-й неделе (после первой дозы) и 580 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 6-й неделе (после второй дозы). На 14-й неделе группа 4 получила дозу MVA-HCalJ-9.9 в комбинации с Ipi, что привело к 4,6-кратному увеличению среднего ответа у животных с ответом (400 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 12-й неделе и 1827 SFU/10<sup>6</sup> клеток на 16 неделе; Тобит по показателю изменения  $p < 0,001$ ), в то время как в частоте животных с ответом изменений не наблюдалось. У животных с ответом наблюдалось лишь незначительное сокращение иммунного ответа со средним ответом 1698 SFU/10<sup>6</sup> клеток для HEME002 на неделе 20 (через 6 недель после введения дозы MVA-HCalJ-9.9 + Ipi) (группа 4).

Анализ площади под кривой (AUC; Тобит с поправкой Бонферрони) для иммунного ответа HEME002 проводили для следующих временных окон: (i) с недели 2 по неделю 20, (ii) с недели 2 по неделю 12 и (iii) с недели 16 по неделю 20. Из-за высокой вариации и большого количества цензурированных значений не было обнаружено статистически значимой разницы при сравнении AUC для группы 1 и группы 2 или AUC для группы 2 и группы 3 (фиг. 10). Напротив, наблюдалась значительная разница в AUC для ответа HEME002 при сравнении группы 3 и группы 4 для временного окна с 16 по 20 неделю ( $p = 0,029$ ). Животное № 3002 (образец № 14) подвергли эвтаназии на 43-й день. У животного № 4003 (образец № 22) на неделе 16 количество в лунках было слишком велико для подсчета, и этот образец был установлен на уровне 2000 SFU/10<sup>6</sup> клеток и также использовался для статистического анализа.

Неклинические исследования демонстрируют, что полученные векторы Ad26 и MVA, экспрессирующие слитый белок CALRmut и JAK2 2x9-mer, способны вызывать активацию Т-клеток *in vitro* и индуцировать клеточный иммунный ответ у мышей и нечеловекообразных приматов.

Пример 10. Изучение конструкции MutCALR/MutJAK2, дозирование и планирование.

Основная цель исследования состояла в том, чтобы сравнить подкожное (п/к) и внутривенное введение антитела к CTLA4 в комбинации с вакциной Ad/Ad/MVA.

Цель также состояла в том, чтобы оценить многократное введение антитела к CTLA4 по сравнению с однократным введением в комбинации с вакциной Ad/Ad/MVA. Вторичная цель состояла в том, чтобы оценить, способна ли комбинация моноклонального антитела к CTLA-4, т.е. YERVOY® (ипилиумаб) (Ipi), с антителом к PD-1 (ниволумаб) дополнительно усиливать специфический Т-клеточный ответ.

Антитело к CTLA4 вводили подкожно одновременно с вакцинацией Ad26, локализованной в месте инъекции Ad26. В качестве альтернативы антитело к CTLA4 вводили внутривенно в течение некоторого времени сразу после введения Ad26. Подкожное введение антитела к CTLA4 сравнивали с внутривенным введением в дозе 3 мг/кг на животное. На 2-й неделе анализа 16 животных получили антитело к CTLA4 внутривенно (3 мг/кг) и 31 животное получило антитело к CTLA4 (3 мг/кг) посредством подкожного введения. Аналогичное количество ответивших животных 7/16 (44%) и 13/31 (42%) наблюдалось в когортах, которым вводили антитело к CTLA4 внутривенно и подкожно, соответственно. Кроме того, средняя величина ответа существенно не отличалась, как определено с помощью анализа Тобита LRT, с поправкой Бонферрони,  $p < 0,05$  (фиг. 16. табл. 14).

Таблица 14

Номер	Примирование/стимулирование	Стимуляция	Средство Ю			
			День 0	День 28	День 84	День 29 начало каждые 28 дней
1	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk в/в	aCTLA4 3mpk в/в	aCTLA4 3mpk в/в	-
2	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk в/в			-
3	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk п/к	aCTLA4 3mpk п/к	aCTLA4 3mpk п/к	-
4	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk п/к			-
5	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk п/к	aCTLA4 3mpk п/к	aCTLA4 3mpk п/к	aPD1 10mpk IV
6	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk п/к			aPD1 10mpk IV
в/в, внутривенно; п/к, подкожно.						

Включение антитела к  $\alpha$ PD-1 (ниволумаб 10 мг/кг в/в), начиная с 4 недели, в Ad/Ad/MVA + ипили-  
маб повышает выраженность mutCALR-специфического Т-клеточного ответа (фиг. 17). Пептидный  
ответ mutCALR рассчитывали на основе специфического ответа mutCALR - фон. В неделю 6 предвари-  
тельный анализ методом иммуноферментных пятен также показывает, что многократные дозы с антите-  
лом к  $\alpha$ CTLA4 и схемой дозирования Ad/Ad/MVA превосходят однократную дозу (фиг. 17).

Пример 11. Создание самореплицирующейся конструкции РНК CALR\_JAK2-2x9.

Полинуклеотид LS\_CALR.JAK2-2x9meg был клонирован самореплицирующуюся РНК.

Последовательность генома вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV) штамма TC-83  
служила базовой последовательностью, используемой для конструирования репликона по изобретению.  
Эту последовательность модифицировали, помещая нисходящую петлю (DLP) вируса Синдбис выше  
неструктурного белка 1 (nsP1) с двумя соединенными элементами пропуска рибосомы 2A из тешовиру-  
са-1 свиньи. Первые 193 нуклеотида nsP1 были дублированы ниже 5'-UTR и выше DLP, за исключени-  
ем старт-кодона, который был мутирован в TAG. Это обеспечивало сохранение всех регуляторных и  
вторичных структур, необходимых для репликации, но предотвращало трансляцию этой частичной по-  
следовательности nsP1. Структурные гены удаляли, а сайты рестрикции EcoR V и Asc I помещали ниже  
субгеномного промотора в качестве сайта множественного клонирования (MCS) для облегчения вставки  
любого представляющего интерес гена (фиг. 19). В сайте клонирования вставляли LS\_CALR\_JAK2-  
2x9meg. Трансген был синтезирован в виде фрагмента двухцепочечной ДНК с помощью IDT с гомологи-  
ей 40 п.н. с MCS на их 5'- и 3'-концах и клонирован в вектор самореплицирующейся РНК, полученный из  
VEEV, расщепленный EcoRV и AscI с использованием мастер-микса для сборки ДНК NEB HiFi (кат. №  
E2621S).

Полинуклеотидная последовательность полной плазмиды самореплицирующейся РНК показана в  
SEQ ID NO: 33. Полинуклеотидная последовательность терминатора T7 показана в SEQ ID NO: 34. По-  
линуклеотидная последовательность промотора AmpR показана в SEQ ID NO: 35. Полинуклеотидная  
последовательность минимального промотора 26S показана в SEQ ID NO: 36. Полинуклеотидная после-  
довательность промотора T7 показана в SEQ ID NO: 37. Полинуклеотидная последовательность поли-А-  
сайта показана в SEQ ID NO: 38. Полинуклеотидная последовательность последовательности реплика-  
ции альфа-5' из nsP1 показана в SEQ ID NO: 39. Полинуклеотидная последовательность DLP SEQ пока-  
зана в ID NO: 40. Полинуклеотидная последовательность P2A показана в SEQ ID NO: 41. Полинуклео-  
тидная последовательность Вот показана в SEQ ID NO: 42. Полинуклеотидная последовательность DLP  
nsP ORF показана в SEQ ID NO: 43. Полинуклеотидная последовательность nsP2 показана в SEQ ID NO:  
44.

Полинуклеотидная последовательность nsP4 показана в SEQ ID NO: 45.

Полинуклеотидная последовательность nsP3 показана в SEQ ID NO: 46.

Полинуклеотидная последовательность nsP1 показана в SEQ ID NO: 47.

Полинуклеотидная последовательность KanR показана в SEQ ID NO: 48.

Полинуклеотидная последовательность Rop показана в SEQ ID NO: 49.

Полинуклеотидная последовательность 5'-UTR показана в SEQ ID NO: 50.

Полинуклеотидная последовательность 3' -UTR показана в SEQ ID NO: 51.

Пример 12. Платформа РНК репликаона srRNA.CALR/JAK2 индуцирует клеточные ответы у мышей.

Цель этих исследований состояла в том, чтобы определить, может ли самореплицирующаяся молекула РНК, кодирующая CALR\_JAK2-2x9mer, примировать иммунный ответ у мышей Balb/c. Линия мышей Balb/c была выбрана на основании данных, описанных в примере 7, где наблюдалась меньшая изменчивость в линии мышей Balb/c по сравнению с линией мышей C57BL/6.

В первом исследовании самореплицирующуюся РНК, кодирующую LS\_CALR\_JAK 2-2x9mer (srRNA.CALR/JAK2), вводили в дозе 3, 10 и 30 мкг. На неделе 0 мышей Balb/c иммунизировали внутримышечной инъекцией srRNA.CALR/JAK2 в указанных дозах (3, 10 и 30 мкг), а контрольной группе вводили физиологический раствор. На 2-й неделе всех животных умерщвляли и спленоциты стимулировали совокупностями 15-мерного перекрывающегося пептида (SEQ ID NO: 3), охватывающими последовательность CALR во вставке, или 9-мерами, охватывающими две 9-мерные последовательности JAK2 (SEQ ID NO: 7). Индукцию IFN- $\gamma$ -вырабатывающих клеток измеряли с помощью метода иммуноферментных пятен для выявления IFN- $\gamma$ . Ответы полифункциональных CD8 и CD4 Т-клеток определяли путем измерения продукции IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2 с помощью проточной цитометрии. В табл. 15 показаны различные экспериментальные группы.

Таблица 15

Номер	№ животного	Описание групп
1	5	Солевой раствор
2	5	srRNA.CALR/JAK2 3 $\mu$ g
3	5	srRNA.CALR/JAK2 10 $\mu$ g
4	5	srRNA.CALR/JAK2 30 $\mu$ g

У всех животных, иммунизированных srRNA.CALR/JAK2, при стимуляции пептидами, охватывающими последовательность CALRmut, вырабатывались клетки, продуцирующие IFN $\gamma$  (фиг. 21A); в отличие от этого, при стимуляции двумя 9-мерными пептидами JAK2 не было обнаружено индукции клеток, продуцирующих цитокины (SEQ ID NO: 5 и 6) (данные не показаны). Внутриклеточная проточная цитометрия показала, что анти-CALR ответ управляется CD4 и является полифункциональным при всех протестированных дозах (фиг. 21B).

Самореплицирующиеся молекулы РНК в первом исследовании вводили в очищенном состоянии животным. Для второго исследования составили самореплицирующуюся молекулу РНК в виде липидной наночастицы (LNP) и провели аналогичное исследование, описанное в табл. 16. Подобно первому исследованию у всех животных, иммунизированных srRNA.CALR/JAK2, при стимуляции пептидами, охватывающими последовательность CALRmut, вырабатывались клетки, продуцирующие IFN $\gamma$  (фиг. 22A), в отличие от отсутствия индукции цитокин-образующих клеток при стимуляции двумя 9-мерными пептидами JAK2 (SEQ ID NO: 5 и 6) (данные не показаны). Внутриклеточная проточная цитометрия показала, что анти-CALR ответ управляется CD4 и является полифункциональным при всех испытанных дозах как в вариантах без состава, так и в вариантах с составом LNP (фиг. 22B).

Таблица 16

Номер	№ животного	Описание групп
1	5	Солевой раствор
2	5	srRNA.CALR/JAK2 0,2 $\mu$ g в составе LNP
3	5	srRNA.CALR/JAK2 2 $\mu$ g в составе LNP
4	5	srRNA.CALR/JAK2 20 $\mu$ g в составе LNP
5	5	srRNA.CALR/JAK2 20 $\mu$ g без состава

В третьем исследовании мы протестировали srRNA.CALR/JAK2 в комбинации с двумя другими вакцинными платформами, Ad26 и MVA, чтобы определить, повышают ли гетерологичные схемы примирования/стимулирования анти-CALR функцию Т-клеток. Все платформы кодировали конструкцию CALR\_JAK2-2x9mer. На неделе 0 мышам Balb/c вводили физиологический раствор, Ad26HEMEO02 (10<sup>10</sup> БОЕ) или srRNA/CALR.JAK2 (20 мкг). На 4 неделе мышам инъецировали либо Ad26HEMEO02, MVA-HCalJ-9.9 (107 БОЕ), либо srRNA.CALR/JAK2, и селезенки анализировали через неделю после стимуляции (см. план эксперимента ниже, табл. 17). Контрольная группа была добавлена для сопоставления с исходными данными с использованием Ad26/MVA с 3-недельным интервалом примирования/стимуляции и анализом селезенки через 2 недели после стимуляции. Селезенки анализировали с помощью метода иммуноферментных пятен и ICS, как описано выше, с использованием перекрывающихся пептидов CALR.

Таблица 17

Номер	№ животного	Описание групп
1	5	Солевой раствор
2	8	примирование только srRNA
3	8	примирование только Ad26
4	8	srRNA/srRNA
5	8	Ad26/Ad26
6	8	srRNA/Ad26
7	8	Ad26/srRNA
8	8	srRNA/MVA
9	8	Ad26/MVA
10	6	Ad26/MVA 3-недельный интервал

Добавление Ad26 или стимуляции MVA к исходной самореплицирующейся РНК приводило к статистически значимым стимуляциям в соответствии с методом иммуноферментных пятен для обнаружения  $\gamma$ IFN ( $p < 0,001$ , 5,1 и 6,5-кратное увеличение соответственно). Добавление самореплицирующейся РНК в качестве стимулирующего средства после примирования Ad26 приводило к 1,7-кратному увеличению по сравнению с примированием только Ad26 (статистически незначимо) (фиг. 23А). Окрашивание внутриклеточных цитокинов показывает, что после примирования самореплицирующейся РНК добавление Ad26 и/или MVA в качестве стимуляции приводит к статистически значимому увеличению полифункциональных CD4 T-клеток IFN $\gamma$ + TNF $\alpha$ + IL-2+ ( $p < 0,001$ , 4,9 и 3,6-кратное увеличение соответственно). Стимуляция самореплицирующейся РНК после примирования Ad26 приводит к 2-кратному увеличению количества полифункциональных тройных цитокинов T-клеток по сравнению с примированием только Ad26 (статистически незначимо) (фиг. 23В).

Пример 13. Иммуногенность srRNA.CALR/JAK2 и MVA-HCalJ-9.9 у нечеловекообразных приматов (NHP).

Основная цель этого исследования будет заключаться в том, чтобы определить, вызывает ли вакцинация srRNA.CALR/JAK2 и MVA-HCalJ-9.9 антигенспецифические T-клеточные ответы, большие по величине и продолжительности, чем вакцинация только srRNA.CALR/JAK2 при NHP. Вторичная цель состоит в том, чтобы оценить, может ли моноклональное антитело к CTLA-4, т.е. YERVOY® (ипилиумаб) ([Ipi]), в комбинации с srRNA.CALR/JAK2 и MVA-HCalJ-9.9 усиливать иммунный ответ, индуцированный вакциной. Кроме того, цель исследования состоит в том, чтобы оценить, сравнимы ли моноклональные антитела к PD-1 OPDIVO® (ниволумаб) в комбинации со схемой вакцинации и антителом к CTLA-4 или увеличиваются специфичные для вставки T-клеточные ответы по сравнению с животными, которым не вводили дозу антитела к PD-1. Яванских макаков иммунизируют в/м с помощью srRNA.CALR/JAK2 и/или MVA-HCalJ-9.9 отдельно или в комбинации с Ipi (3 мг/кг подкожно [п/к]) или в комбинации с ниволумабом (10 мг/кг внутривенно [в/в] согласно графику, указанному в табл. 18. Вкратце, NHP будут иммунизировать srRNA.CALR/JAK2 и MVA-HCalJ-9.9 в комбинации с Ipi 3 мг/кг п/к (группа 2) или в комбинации с Ipi 3 мг/кг п/к и ниволумабом в/в 10 мг/кг (группа 4). У животных берут кровь в различные моменты времени и выделяют РВМС и сыворотку для иммунологических анализов. Индукцию специфических иммунных ответов на антигены CALR оценивают в РВМС в различные моменты времени в ходе исследования с помощью метода иммуноферментных пятен для обнаружения IFN $\gamma$  с использованием совокупностей пептидов, состоящих из 15-мерных перекрывающихся пептидов, соответствующих полной последовательности вставки CALR.

Ожидается, что вакцина srRNA.CALR/JAK2 будет вызывать антигенспецифический T-клеточный ответ, который может быть дополнительно усилен при назначении по схеме в комбинации с MVA-HCalJ-9.9. Использование моноклональных антител к CTLA-4 и/или антител к PD-1 для блокады иммунных контрольных точек в комбинации с srRNA.CALR/JAK2 и MVA-HCalJ-9.9 приведет к более сильному и более длительному антигенспецифическому T-клеточному ответу более высокого качества.

Таблица 18

Номер	День 0/28	День 70	mAb к CTLA-4	mAb к PD-1
1	srRNA/srRNA	MVA	-	-
2	srRNA/srRNA	MVA	0, 28, 70	-
3	srRNA/srRNA	MVA	0, 28, 70	29, 57, 84, 113

Пример 14. Иммуногенность GAd.CALR.JAK2 и непрерывная презентация srRNA.CALR/JAK2 у нечеловекообразных приматов (NHP).

Основная цель этого исследования состоит в том, чтобы подтвердить, что вакцинация GAd20.CALR.JAK2 индуцирует антигенспецифические T-клеточные ответы в комбинации с антителом к

CTL-4 и MVA или srRNA. Исследование также предназначено для определения того, увеличивает ли вакцинация srRNA.CALR/JAK2 количество Т-клеток в комбинации с GAd20 или GAD20/MVA и можно ли использовать srRNA вместо MVA. Цель этого исследования также состоит в том, чтобы оценить, может ли GAD20/MVA/srRNA в комбинации с антителом к CTLA4 индуцировать антигенспецифические Т-клеточные ответы в большей степени, чем только GAD20/MVA/srRNA. Ожидается, что добавление вектора srRNA.CALR/JAK2 к вакцине GAd20/MVA в виде тройной комбинации вызовет более сильные и устойчивые антиген-специфические Т-клеточные ответы у онкологических больных.

Второй целью этого исследования является оценка способности многодозового режима srRNA.CALR.JAK2 устранять потребность в антителе к CTL-4, полностью или после введения MVA. Кроме того, исследование направлено на определение того, можно ли вводить srRNA несколько раз (ежемесячно) для постоянного увеличения или поддержания антигенспецифических Т-клеточных ответов. Самые высокие и наиболее устойчивые уровни генерируемых Т-клеток, направленных против mut-CALR/mutJAK2, потребуют непрерывной презентации неоантигена вектором, невосприимчивым к опосредованной антителами нейтрализации, что приведет к удалению злокачественного клона и клинической пользе для пациентов с MPN. Одним из потенциальных преимуществ вакцины на основе самореплицирующейся РНК является отсутствие развившегося специфического иммунитета против вектора. Отсутствие специфического иммунного ответа на вектор может сделать возможным повторное введение самореплицирующейся РНК без уменьшения презентации антигена из-за неспособности вакцины на основе самореплицирующейся РНК генерировать нейтрализующие антитела, специфичные к вектору. Схемы с несколькими дозами тестируются для оценки того, может ли srRNA.CALR/JAK2 поддерживать антигенспецифический Т-клеточный ответ при ежемесячном внутримышечном введении.

Для этого исследования яванских макак иммунизировали в соответствии со схемой, показанной в табл. 19. У животных берут кровь в различные моменты времени и выделяют PBMC и сыворотку для иммунологических анализов. Индукцию иммунных ответов, специфичных к антигенам CALR, оценивают в PBMC в различные моменты времени в ходе исследования с помощью метода иммуоферментных пятен для обнаружения IFN $\gamma$  с использованием совокупностей пептидов, состоящих из 15-мерных перекрывающихся пептидов, соответствующих полной последовательности вставки CALR.

Введение srRNA.CALR/JAK2 после иммунизации GAd20/MVA позволит продолжить стимуляцию для продления антигенспецифического Т-клеточного ответа независимо или в комбинации с введением CPI. Ожидается, что многодозовые схемы на основе самореплицирующейся РНК srRNA.CALR/JAK2 будут вызывать более выраженный Т-клеточный ответ с большей продолжительностью.

Таблица 19

Номер	Описание групп
1	GAd20/MVA/srRNA
2	GAd20/MVA/srRNA/srRNA
3	GAd20/srRNA/srRNA/srRNA
4	GAD20/GAD20/MVA + антитело к CTLA4 3 мг/кг в/в
5	GAD20/GAD20 /MVA/srRNA/srRNA/srRNA + антитело к CTLA4 3 мг/кг в/в
6	GAD20/GAD20/srRNA/srRNA/srRNA/srRNA + антитело к CTLA4 3 мг/кг в/в
4	GAD20/GAD20/srRNA/srRNA/srRNA/srRNA

#### Варианты осуществления

Следующий список вариантов осуществления предназначен для дополнения, а не замены или аннулирования предшествующих описаний.

Вариант 1 осуществления. Полипептид, содержащий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

EEAEDNCRMMRTK (SEQ ID NO: 2) или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG (SEQ ID NO: 4) или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5) или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

FCGDENILV (SEQ ID NO: 6) или имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации.

Вариант осуществления 2. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид содержит последовательности эпитопа:

MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

EEAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

VLNYGVCF (SEQ ID NO: 5) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5; и

FCGDENILV (SEQ ID NO: 6) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 3. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид содержит последовательности эпитопа:

MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

EAAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2; и

KLSHKHLVNLNYGVCFQDNLVQEFVKFG (SEQ ID NO: 4) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 4. Полипептид согласно варианту осуществления 1, причем полипептид содержит последовательности эпитопа:

MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; и

EAAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 5. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-4, дополнительно содержащий лидерную последовательность на N-конце, выбранную из:

MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 8);

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRT

LSDYNIQKSTLHLVLRRLGV (SEQ ID NO: 54); и

MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV (SEQ ID NO: 29).

Вариант осуществления 6. Полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-5, в котором последовательности эпитопа соединены друг с другом посредством линкерной последовательности.

Вариант осуществления 7. Полипептид согласно варианту осуществления 6, где линкерная последовательность выбрана из AAY, RR, DPP, HHA (SEQ ID NO: 56), HNA, HNL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL или REKR (SEQ ID NO: 59).

Вариант осуществления 8. Полипептид согласно варианту осуществления 6, при этом линкерная последовательность содержит сайт расщепления протеазой.

Вариант осуществления 9. Полипептид согласно варианту осуществления 1, при этом полипептид выбран из:

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 3;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 7;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 9;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 10;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 11;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 12;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 13;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 14;

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 15; и

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 10. Полипептид, кодирующий полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-9.

Вариант осуществления 11. Полипептид согласно варианту осуществления 10, причем полипептид выбран из группы, состоящей из:

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 16, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 16;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 17;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 18, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 18;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 19, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 19;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 20, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 20;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 21;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 22;

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 26, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 26; и

последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27, или имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 27.

Вариант осуществления 12. Вектор, содержащий полинуклеотид согласно варианту осуществления 10 или варианту осуществления 11.

Вариант осуществления 13. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор выбран из аденовирусного вектора, альфа-вирусного вектора, вектора на основе поксвируса, аденоассоциированного вирусного вектора, ретровирусного вектора, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинации.

Вариант осуществления 14. Вектор согласно варианту осуществления 13, причем аденовирусный вектор выбран из hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49, hAd50, GAd20, Gad19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2 и PanAd3.

Вариант осуществления 15. Вектор согласно варианту осуществления 13, отличающийся тем, что вектор на основе поксвируса выбран из вектора вируса оспы, вектора вируса осповакцины, вектора вируса коровьей оспы, вектора вируса оспы обезьян, вектора вируса копенгагенской коровьей оспы (W), вектора вируса осповакцины Нью-Йорка (NYVAC) и вектора модифицированного вируса коровьей оспы Анкара (MVA).

Вариант осуществления 16. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор представляет собой аденовирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любой из полипептидов одного из вариантов осуществления 1-9.

Вариант осуществления 17. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий любой из полипептидов любого из вариантов осуществления 1-9.

Вариант осуществления 18. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор представляет собой Ad26, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 10, или полипептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 10.

Вариант осуществления 19. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор представляет собой вектор MVA, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 31, или полипептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 20. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор представляет собой GAd20, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 31, или полипептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 31.

Вариант осуществления 21. Вектор согласно варианту осуществления 12, причем вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 12, или полипептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 12.

Вариант осуществления 22. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид согласно любому из вариантов осуществления 1-9.

Вариант осуществления 23. Фармацевтическая композиция, содержащая полинуклеотид согласно любому из вариантов осуществления 10 и 11.

Вариант осуществления 24. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор согласно любому из вариантов осуществления 12-21.

Вариант осуществления 25. Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 24, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинаций.

Вариант осуществления 26. Способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9

JAK2V617F и/или CALR, у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 22-25.

Вариант осуществления 27. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, несущего мутацию экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 22-25.

Вариант осуществления 28. Способ лечения или предотвращения миелопролиферативного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 22-25.

Вариант осуществления 29. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 22-25.

Вариант осуществления 30. Способ лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции согласно любому из вариантов осуществления 22-25.

Вариант осуществления 31. Способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или отсрочки возникновения клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации, и причем введение включает одно или более введений композиции.

Вариант осуществления 32. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта, несущего мутацию экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации, и причем введение включает одно или более введений композиции.

Вариант осуществления 33. Способ лечения или предотвращения миелопролиферативного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1; эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации, и причем введение включает одно или более введений композиции.

Вариант осуществления 34. Способ согласно варианту осуществления 33, где миелопролиферативное заболевание выбрано из первичного миелофиброза (MPN), истинной полицитемии (PV), эссенциальной тромбоцитемии (ET), первичного миелофиброза (PFM), вторичного миелофиброза, острого миелолейкоза (AML), вторичного AML, хронического миелогенного лейкоза (CML), клонального гемопоэза неопределенного потенциала (CHIP) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

Вариант осуществления 35. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по



меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6, или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации, и

причем введение включает одно или более введений композиции.

Вариант осуществления 36. Способ согласно варианту осуществления 35, где рак выбран из рака легкого, лимфоидного рака, острого лимфолейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, плазмноклеточной миеломы, рака желчевыводящих путей, рака мочевого пузыря, рака печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак кожи, рака щитовидной железы, рака желудка, рака толстой кишки, рака толстой кишки, рака мочевыводящих путей, рака центральной нервной системы, нейробластомы, рака почки, рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичек и рака мягких тканей.

Вариант осуществления 37. Способ лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере две или более последовательностей эпитопов, выбранных из группы, состоящей из:

эпитопа CALR SEQ ID NO: 1 или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 1;

эпитопа CALR SEQ ID NO: 2 или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 2;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 4 или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 4;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 5;

эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6 или имеющего по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6; и их комбинации, и

причем введение включает одно или более введений композиции.

Вариант осуществления 38. Способ согласно варианту осуществления 37, где сердечно-сосудистое заболевание выбрано из острого коронарного синдрома, ишемического цереброваскулярного заболевания, ишемической болезни сердца, тромбоза, венозной тромбоземболии, тромбоза глубоких вен, легочной эмболии, критических внутрибрюшных тромбозов, периферической артериальной болезни, гипертонии, сердечной недостаточности, мерцательной аритмии, ишемической болезни сердца, атеросклероза и клонального кроветворения.

Вариант осуществления 39. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-38, причем вектор выбран из аденовирусного вектора, альфа-вирусного вектора, вектора на основе поксвируса, аденоассоциированного вирусного вектора, ретровирусного вектора, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинации.

Вариант осуществления 40. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-39, где вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинаций.

Вариант осуществления 41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-39, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор Ad26, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1, эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 42. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-39, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор GAd20, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1, эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 43. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-39, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор MVA, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа кальретикулина (CALR) SEQ ID NO: 1, эпитопа CALR SEQ ID NO: 2, эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 5 и эпитопа JAK2 SEQ ID NO: 6.

Вариант осуществления 44. Способ согласно любому из вариантов осуществления 31-39, отличающийся тем, что вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательности эпитопа кальретикулина (CALR)









из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК;  
второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК.

Вариант осуществления 59. Способ по любому из вариантов осуществления 31-44, включающий один или более циклов лечения, причем каждый цикл включает:

первое введение, включающее первую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК;

второе введение, включающее вторую композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК;

третье введение, включающее третью композицию, содержащую вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий 2 или более tandemных повтора эпитопа 2 JAK2 SEQ ID NO: 6, причем вектор выбран из вектора Ad26, вектора MVA, вектора GAd20 или самореплицирующейся молекулы РНК; и

при этом цикл лечения дополнительно включает введение ингибитора контрольной точки, выбранного из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1 и антитела к PD-L1, в комбинации с первой, второй и/или третьей композицией.

#### Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Эпитоп	Последовательность
1	Эпитоп I CALR	MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREAC LQGWTE
2	Эпитоп II CALR	EEAEDNCRRMMRTK
3	Эпитоп I CALR- AAУ-эпитоп II CALR	MKDKQDEEQRTTRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREAC LQGWTEAAУEEAEDNCRRMMRTK
4	30-мерный эпитоп	KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG

	JAK2	
5	Эпитоп 1 JAK2	VLNYGVCFC
6	Эпитоп 2 JAK2	FCGDENILV
7	2X9mer JAK2	VLNYGVCFCAAAYFCGDENILV
8	Лидерная последовательность HAVt20 (LS)	MACPGFLWALVISTCLEFSMA
9	LS_CALR (HEME003)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTR RKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTK
10	LS_CALR_JAK2-2x9mer (HEME002)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTR RKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYVLN YGVCFCAAAYFCGDENILV
11	LS_CALR_JAK2-30mer (HEME001)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTR RKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYKLS HKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
12	CALR_JAK2-2x9mer	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTRRKMRRKMSPARPRTSREAC LQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYVLNYGVCFCAAAYFCGDENILV
13	CALR_JAK2-30mer	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTRRKMRRKMSPARPRTSREAC LQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYKLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQ EFVKFG
14	Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDG RTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGVRKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTR TRRKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYV LNYGVCFCAAAYFCGDENILV
15	Ubiq_CALR_JAK2-30mer	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDG RTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGVRKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRMRTR TRRKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTEAAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYK LSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
16	LS_CALR	ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGA GTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGG AGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAAGG CGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCA GGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAAGGAGGAGGAG AGGACAACCTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCTACGTGCTGAA TTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCTATTTTTGTGGCGATGAGAACATCC TGGTG
17	LS_CALR_JAK2-2x9mer	ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGA GTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGG AGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAAGG CGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCA GGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAAGGAGGAGGAG AGGACAACCTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCTACGTGCTGAA TTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCTATTTTTGTGGCGATGAGAACATCC TGGTG
18	LS_CALR_JAK2-30mer	ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGA GTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGG AGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAAGG CGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCA GGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAAGGAGGAGGAG AGGACAACCTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCTACAAGCTGA GCCACAAGCACCTGGTGTGAACTATGGCGTGTGCTTCTGTGGCGATGA

		GAATATCCTGGTGCAGGAGTTCGTGAAGTTTGGC
19	CALR_JAK2- 2x9mer для Ad26	ATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGG ACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCCAAGATGCGG AGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTC TGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAACGAGGAGGCAGAGGACAACCTGCA GGCGCATGATGAGGACCAAGGCCCTACGTGCTGAATTATGGCGTGTG CTTCTGTGCCGCCTATTTTTGTGGCGATGAGAATCCTGGTG
20	CALR_JAK2-30mer	ATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGG ACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCCAAGATGCGG AGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTC TGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAACGAGGAGGCAGAGGACAACCTGCA GGCGCATGATGAGGACCAAGGCCCTACAAGCTGAGCCACAAGCACCT GGTGTGAACCTATGGCGTGTCTTCTGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGC AGGAGTTCGTGAAGTTTGGC
21	Ubiq_CALR_JAK2- 2x9mer	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACAGGCAAGACCATCACACTGGAGG TGGAGCCCTCCGACACCATCGAGAACGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAA GGAGGGCATCCCCCTGATCAGCAGCGGCTGATCTTTGCCGGCAAGCAG CTGGAGGACGGCAGAACCCCTGTCTGATTACAATATCCAGAAGGAGAGCA CACTGCACCTGGTGTGCTGCGGCTGAGAGGCGTGAGGAAGGACAAGCAGG ATGAGGAGCAGCGCACCCGGAGAATGATGCGGACAAAGATGAGAATGA GGCGCATGCGGAGAACCAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGAGCCAG CAAGGCCACGCACCTCCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGA GGCAGCCTATGAGGAGGCCGAGGACAACCTGCAGGCGCATGATGCGGAC AAAGGCCGCCTACGTGCTGAATTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCCTATT TTTTGTGGCGATGAGAATCCTGGTG
22	Ubiq_CALR_JAK2- 30mer	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACAGGCAAGACCATCACACTGGAGG TGGAGCCCTCCGACACCATCGAGAACGTGAAGGCCAAGATCCAGGACAA GGAGGGCATCCCCCTGATCAGCAGCGGCTGATCTTTGCCGGCAAGCAG CTGGAGGACGGCAGAACCCCTGTCTGATTACAATATCCAGAAGGAGAGCA CACTGCACCTGGTGTGCTGCGGCTGAGAGGCGTGAGGAAGGACAAGCAGG ATGAGGAGCAGCGCACCCGGAGAATGATGCGGACAAAGATGAGAATGA GGCGCATGCGGAGAACCAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGAGCCAG CAAGGCCACGCACCTCCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGA GGCAGCCTATGAGGAGGCCGAGGACAACCTGCAGGCGCATGATGCGGAC AAAGGCCGCCTACAAGCTGTCTACAAGCACCTGGTGTGAACTATGGC GTGTGCTTCTGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGCAGGAGTTCGTGAAGTT TGGCTGATAA
23	полнуклеотидная последовательность трансгена Ad26HEMEO01, содержащая промотор цитомегаловируса (CMV), содержащий тетрациклиновый оператор (TetO), последовательность Козак и трансген, и сигнал полиаденилирова- ния вируса	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCA ATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTAC ATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTG ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGAC CGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATA GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA GTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG TGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACG TCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT CGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGT GGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCT ATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCG CCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCCGGGA



	обезьяны 40 (SV40)	CCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGATCTAGAGCCACC ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGA GTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGG AGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGG CGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCA GGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAAGGAGGGCAG AGGACAACCTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCTACAAGCTGA GCCACAAGCACCTGGTGTGAACTATGGCGTGTGCTTCTGTGGCGATGA GAATATCCTGGTGCAGGAGTTCGTGAAGTTTGGCTGATAAGGTAGCCATC CGAACTTGTTTATTGCACTTATAAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATC ACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
24	полинуклеотидная последовательность трансгена Ad26HEMЕ002, содержащая промотор цитомегаловируса (CMV), содержащий тетрациклиновый оператор (TetO), последовательность Козак и трансген, и сигнал полиаденилирова- ния вируса обезьяны 40 (SV40)	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCA ATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTAC ATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTG ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATA TATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGAC CGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCAT GTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA GTCATCGTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCG TGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACG TCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT CGTAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGT GGGAGGTCTATAAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCT ATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCG CCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGA CCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGATCTAGAGCCACC ATGGCATGCCAGGCTTCCTGTGGGCCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGA GTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGG AGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGG CGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCA GGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATAAGGAGGGCAG AGGACAACCTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCCTACGTTGAGTAA TTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCTATTTTTGTGGCGATGAGAACATCC TGGTGTGATAAGGTACCATCCGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTT ACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTC ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT CT
25	HCaJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2- 2x9mer) Полная вставка ДНК для экспрессии в MVA и Gad20	GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTTATAGTAAGTTTTTACCCAT AAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCT AATTTATTGCACGGTAAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGTGACGGATC CCGCGACTTCGCCGCCATGGGCCAGAAAGAACAGATTATACGTTTCAG AAAAATTCTGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGGCAG TAATGAAGGACAAAACAAGACGAAGAACAACGAAGTGGCGGATGATGA GGACTAAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACGGACGCGACGCAAGATGC GCCGAAAATGTCTCCCGCCCGCCAAGGACGTCTTGTGCGGGAAGCTG TTTGCAGGGCTGGACCGAAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAAGACAATTGT CGGCGAATGATGAGAACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACTATGGAGTGT GCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATTCTGGTGTAGTAA AGGCGCGCC
26	HCaJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2- 2x9mer) Только	ATGGGCCAGAAGGAACAGATTTCATACGCTTCAGAAAAATTCTGAACGAA TGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGGCAGTAATGAAGGACAAACA AGACGAAGAACAACGAAGTGGCGGATGATGAGGACTAAGATGAGGAT

	трансен с лидерной последовательностью для экспрессии в MVA и Gad20	GCGGAGGATGAGACGGACGCGACGCAAGATGCGCCGAAAATGTCTCCCGCCCCGGCCAAGGACGTCTTGTCTGGGAAAGCCTGTTTGCAGGGCTGGACC GAAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAAAGACAATTGTCGGCGAATGATGAGACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACTATGGAGTGTCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATTCTGGTG
27	CALR_JAK2-2x9mer Только трансен без ДНК лидерной последовательности для экспрессии в MVA и Gad20	ATGAAGGACAAAACAAGACGAAGAACAACGAACTAGGCGGATGATGAGGACTAAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACGGACGCGACGCAAGATGCGCCGGAAAATGTCTCCCGCCCCGGCCAAGGACGTCTTGTCTGGGAAAGCCTGTTTGCAGGGCTGGACC GAAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAAAGACAATTGTCGGCGAATGATGAGAACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACTATGGAGTGTCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATTCTGGT
28	Эпитоп 2 JAK2-ААУ-эпитоп 2 JAK2	FCGDENILVAAYFCGDENILV
29	TCE	MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV
30	Полинуклеотид TCE	ATGGGCCAGAAAGAACAGATTCATACGCTTCAGAAAAATTCTGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGGCAGTA
31	TCE_CALR_JAK2-2x9mer	MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAVMKDKQDEEQRTTRMMRMTKMRMRMRRTTRRKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTEAAYEEAEDNCRMMRTKAAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
32	Промотор P7.5	GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTTTACCCAT AAATAATAAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAAGTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAGAATCATAAAGAACAGTGACGGATC
33	Полинуклеотидная последовательность полноразмерной самореплицирующейся плазмиды РНК	TAATACGACTCACTATAGATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCAGACCAA TTACCTACCCAAATAGGAGAAAAGTTACGTTGACATCGAGGAAGACAGC CCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGC CAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCCGCAT CTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCC TTGACATTGGAATAGTCAGCATAAGTACATTTCACTGACTAATACTACAA CACCACCACCATGAATAGAGGATTTTAAACATGCTCGGCCGCCGCCCT TCCCGCCCCACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCCGGC CCGGGAAAGCGGAGCTACTA ACTTCAAGCTGCTGAAGCAGGCTGGAGAC GTGGAGGAGAACCCTGGACCTGAGAAAGTTACGTTGACATCGAGGAAG ACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTA GAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTT CGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACAC GATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCAC AAGTATCATTTGTATCTGTCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGAT TGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGA TAAGGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGA CCCTGACCTGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGATCGTGT CGCTACGAAGGGCAAGTGCCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACG GACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTA CTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACCTGGCTGGAG CATATCCATCATACTTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCT CGTAACATAGGCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTACGTTAGAG GGATGTCCATTCTTAGAAAAGATTTTGAACCATCCAACAATGTTCTA TTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGA GCTGGCACCTGCCGTCTGATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAAATTACACA TGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAA TAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTACGGCTATGCTGCTACG ATGCACCGCAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACG GGGAGAGGGTCTTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGT

	<p>GACCAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAAGTGCAGTGCAGGACGACGCGC          AAAAAGTCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTTCGCAC          CCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGGCCGTAGTGGCC          CAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGAT          GAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGT          GGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATAC          CCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCACATCATTTCGTGCTGCCCA          GGATAGGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAAGAAATCAGGA          AAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTATTACCGCCGAGGA          CGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGA          AGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAG          GAGCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGG          CCGGCTCAGTGGAGACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGA          TGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGAGGCTGTAC          TCAAGAGTAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATA          GTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACC          ATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTT          TCAAGCTCTGAGTAAAAGTGCACCATATTGTCACACATGGAGGAGCGTGAACA          CTGATGAAGAATATTACAAAAGTCAAGCCAGCGAGCAGCAGCGGCGA          ATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGGCTCAAGAAAGAACTAGTC          ACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATT          CGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCA          ACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTACCCTGGCATTA          AAAGCGCAGTCAACAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAA          ACTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAGAAAATGAAAGGGCTGGACG          TCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGTCTTGAATGGATGCAAAACCCC          CGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGGCTGTATGCAGGTA          CTGAGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAAGTCTGCGG          GGATCCCAAACAGTGGGTTTTTTTAAACATGATGTGCTGAAAGTGCATT          TTAACCAGGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGT          TGCATAAATCTGTGACTTCGGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAA          AATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACC          GGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAG          GGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGA          CGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAGGTGTGTATGCCGTTCCG          GTACAAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCTGAACATGTG          AACGTCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGAAAAACTAG          CCGGCGACCCATGGATAAAAAACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTT          CACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGG          CACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAA          ACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAAGCCGCTGGCAT          AGACATGACCACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTGAAACGGAC          AAAGTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCT          TTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTAT          CCATTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTGCGCTAACATGTACGG          GCTGAATAAAGAAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACA          ACTGCCTCGGCGAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACAC          TGGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAACAGAAAGACT          GCCTCATGCTTTAGTCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTT          CTTCATTCGTGAGCAAAATTGAAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTGGGGGA          AAAGTTGTCCGTCCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGACAGCCGGCT          GAGGCTACCTTACAGGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGC          CCAAATATGACATAAATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCAT          CACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCA          AGAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTGACATAGG          TTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAAGCATATTGGTGTATAGCG          CGGCAGTCAAGTTTTCCCGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAG</p>
--	--

	<p>AGACGGAAGTTCGTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACG          CACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTT          CAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGG          GATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGTGTTAACAGCA          AAGGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCC          GGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTC          AAAGGTGCAGCTAAACATATCATTATGCCGTAGGACCAAACCTCAACA          AAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTC          CATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCA          CTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATC          ATTGAACATTTGCTGACAGCTTTAGACACCCTGATGCAATGTAGGCCA          TATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGG          CTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGT          GACAGAACCCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCCTTG          GCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATT          TGGAAGGGACCAAGTTTACCAGGCGCCAAGGATATAGCAGAAATTA          TGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTAT          ATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAG          AGTCGGAAGCCTCCACACCCTAGCACGCTGCCTTGTGTGCATCCAT          GCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAAC          AAATTACTGTGTGCTATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGT          GTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGGC          TGGCTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGAC          GAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACT          GAACAACCACCTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGGAAACGCTG          AGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGTGTC          AGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGG          CCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTT          GATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGA          CCAGCGGGGCAACGTCAAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAGAGTAT          GGAGTTTCTGGCGGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAAGAAC          CCTCCACATCCCCTCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCA          GGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAG          GGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCT          AGCAGGTGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCGCCAGGCGTAA          ATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACA          ATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAG          GGCATTTACAACAAAAATCAAGTAAAGGCAACCGTGTCTATCCGAAGTGGT          GTTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTGATGCCCCGCGCCTCGACCAA          GAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTG          CTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAACATGAAAGCCA          TAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGA          AGGAAAAGTGGAGTGTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCTTTGTATTAT          CTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAAGTGGAAAGCCTGT          AACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTAT          TCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCT          TAGACTGCCAGTTTTTGCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAA          CACTCTATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCA          GAACACGCTCCAGAAGCTTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAAT          GTCACGCAAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCCGGCGCCCTTAAATGT          GGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAAATAATGAATATTGGGAAACGTTT          AAAGAAAACCCCATCAGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTA          CCAAATTTAAAGGACCAAAAAGCTGCTGCTCTTTTTCGCAAGACATAA          TTTGAATATGTTGCAGGACATAACCAATGGACAGGTTTGTAAATGGACTTAA          AGAGAGACGTGAAAGTACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGC          CCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCT          GTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAATGCGGTCTGCTT          CCGAACATTCATACACTGTTTGTATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTAT</p>
--	---

		<p>TATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAACTGACATCG CGTCGTTTGATAAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGGTTAAT GATTCGGAAGACTTAGGTGTGGACGACAGAGCTGTTGACGCTGATTGAG GCGGCTTTCGGCGAAATTTTCATCAATACATTTGCCACTAAAACTAAATT TAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCCTCACACTGTTTGTGA ACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACCGGT AACC GGATCACCATGTGCAGCATTCAATTGGAGATGACAATATCGTGA GGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACAGTTTGA ATATGGAAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCTTA TTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCC GTGTGGCAGACCCCTAAAAAGGCTGTTTAAAGCTTGCAAAACCTCTGGC AGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGA GTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCA GTAGAATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATA GTTATGGCCA TACTACTCTAGCTAGCAGTGTAAATCATTAGCTACCTGAGAGGGGCC CCTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCC GCCAAGATATCGGCGCGCCGTTTAAACGGCCGGCCCTTAATTAAGTAACG ATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGC ATGCCGCTTAAAAATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATT TTGTTTTAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTTTCAGCGTAACTGGACT GGCCACAGTTAGGCGGCCGCGCATGTTTCATCATCAGTAAACCCGATATCGT GAGCATCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCTCATGAACAGAAAAATC CCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAA CATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAAACCTC AACGAGCTGGACCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTACCG ACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGAC GGTGA AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCT TGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGG GTGTTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAG CGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGA GAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAAGGAGAAA ATACCGCATCAGGCGCTCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGT CGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGCGGTAATACGG TTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAA GGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTT TCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACACAGGCGTTTCCC CCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGG ATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCAAAGCTGGGT GTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCCTTATCCGGTAACT TATCGTCTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC AGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACA GAGTTCCTGAAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGT AGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGT TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT TTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTA AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTT TAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC TTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAAACGCA ATACGCTGGCTATCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAAACGAT CCGCCATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCACGGGTGGCCAGCGCA ATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCAGACGGCCGAATCAATAAAGC CGCTAAAACGGCCATTTCCACCATAATGTTCCGGCAGGCACGCATCACC ATGGGTACCAACAGATCTTCGCCATCCGGCATGCTCGTTTTACAGACGG CAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCC</p>
--	--	--

		TGATCCACCAGGCCCGCTTCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGAT GTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAGGTCGCCGGGTCCAGGGTATGCAG ACGACGCATGGCATCCGCCATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCCAGAT GGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCAGCAGCAGCCAATC ACGGCCCCGTTTCGGTCACCACATCCAGCACCCGCCACACGGAACCCG GTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCGCACTCGTTTCA CGCACCCGCTCAGATCGGTTTTCAAAACAGCACCCGGACGACCCTGCGCG CTCAGACGAAACCCGCCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCC AATCATAAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGTACCCGCATG CAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCAT TTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAAATGATTTAGA AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC TGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAAGCATCCGCCCTTCGT TTATTTGACCATGTTGGTATG
34	Терминатор T7	AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTT
35	Промотор AmpR	CGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCG CTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGA AGAGT
36	Промотор 26S	CTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA
37	Промотор T7	TAATACGACTCACTATAG
38	Сайт поли-А	AA
39	Последовательность репликации альфа- 5' из nsp1	TAGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCATTCTCAGAG CTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCAC TGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTCAAAC TGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGA
40	DLP	ATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGACTAATACTACAACACCACCACCA TGAATAGAGGATTTCTTAAACATGCTCGGCCGCCGCCCTTCCCGCCCCC ACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCCG
41	P2A	GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGG AGGAGAACCCTGGACCT
42	Bon	CGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTG TGAAATACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCCGATCAGG
43	DLP nsp ORF	ATGAATAGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCCGCCCTTCCCGCCCC CACTGCCATGTGGAGGCCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCCCGGAAG CGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAG AACCCCTGGACCTGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCAT TCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAA GCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGG CTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGA CATTGGAAGTGCGCCCGCCGAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCAT TGATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGT ATGCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATT GGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGACCCCTGACCTG GAACTGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCTGTCTGCTACGAAG GGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAG TCTCTATACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCCTACTGGATAGGC TTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATC ATACTTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATA GGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCA TTCTTAGAAAAGAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTT GGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACC

		<p>TGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGT GAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGTCTGTTAAAAGAATAGCTATCA GTCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAAGCTATGCTGCTACGATGCACCG CGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGG GTCTCTTTTCCCCTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAAT GACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGC GGACGACGCGCAAAAACCTG CTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCTGCAACGGTTCGCACCCAGAGAA ACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGGCCGTAGTGGCCCAGGCATTT GCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAAGGCCA CTAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAG AAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATC ATCAAAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCTGTGCTGCCAGGATAGGCA GTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAAATGTTAG AGGAGCACAAGGAGCCGTACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGA AGCTAAGTGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGA GTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTC TGGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGT GGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGAC AAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAAGGCTGTACTCAAGAGTGA AAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACAC ACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTAAAGT AGTGGTGCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTG AGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCTGTAACAGGT ACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAGGA ATATTACAAAACTGTCAAGCCCAGCGAGCAGCAGCGGCAATACCTGTAC GACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTA GGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAAATTCGCTACGA GAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGG GTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAAGCGCAG TCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAAGAAAACCTGTGCAG AAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCA GAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGAC CCTGTATATTGACGAAGCTTTTGTCTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGC TCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAAGTGTCTCGCGGGGATCCCAA ACAGTGGCGTTTTTTTAAACATGATGTGCCTGAAAAGTGCATTTTAAACCAG AGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCGTTGCACTAAA TCTGTGACTTCGGTCTGCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAAC GACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACC AAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAGGTTGGGTGA AGCAGTTGCAAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCTGC CTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGTACAAGGTG AATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCTGAACATGTGAACGTCTACT GACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCA TGGATAAAAAACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGA TAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACATCTTGGGA GAGACCGGACCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGG GCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCA CTGAACAATGGAACACTGTGGATTAATTTGAAACGGACAAAGCTCACTC AGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGAT CTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAAT AATCACTGGGATAACTCCCCGTGCCTAACATGTACGGGTGAATAAAG AAGTGGTCCGTACGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACCTGCCTCGGGCAGTT GCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCCTCAATTATG ATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCTTTA GTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTTCGTCAG CAAATTGAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTGGGGGAAAAGTTGTCCGTC CCAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTGACACCGGCCTGAGGCTACCTTCA GAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAAGGTGATGTGCCCAATATGACAT</p>
--	--	--

		<p>AATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAAATACCATCACTATCAGCAGT  GTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCT  GCATCTGAATCCCGGCCGAACCTGTGTGACATAGGTTATGGTTACGCTG  ACAGGGCCAGCGAAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTCAAGTT  TTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAAGTTCTG  TTTGTATTCAATGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAA  GCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAA  CCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGGC  CACCGAAGGAGTGATTATAAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGC  GGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTTCCCGAAAAGCTTCGATT  TACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTA  AACATATCATTATGCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAAGTTTCGGAGGT  TGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATT  GTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCG  GCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCTCAATTGAACATTTG  CTGACAGCTTTAGACACCCTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGG  ACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAG  CAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGA  TGCAGAGCTGGTGAAGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAA  GGCTACAGCACAAGCGATGGCAAACTTTCTCATATTTGGAAAGGGACCA  AGTTTACCAGGGCGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCC  CGTTGCAACGGAGGGCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCTCGGAGAA  AGCATGAGCAGTATTAGGTGCAAAATGCCCCGTCGAAGATCGGAAGCCT  CCACACCCTAGCAGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCA  GAAAGAGTACAGCGCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAAATTAAGTGT  GCTCATCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATC  CAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATCA  TCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAG  CCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCA  CTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCA  TCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGTGTGATGGCCCGAC  CCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTGTGA  TCTAGCTCATCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAG  TTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCA  ACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGC  GCGACCGGTGCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCTCCACATCCC  GCTCCGCGCAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGA  GAACCAGCCTAGTTTCCACCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGTACTAG  AGAGGAGCTCGAGGCGTTACCCCGTACGCACTCCTAGCAGGTGCGTC  TCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTA  CAAGAGAGGAGTTTGGAGGCGTTCGTAGCACAAACAATGA</p>
44	nsP2	<p>GGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCAGTACGATG  GCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGAGGCTGTACTC  AAGAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAAACAAGTCATAGT  GATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCAT  GGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGACTTTC  AAGCTCTGAGTGAAGGTGCCACCATTTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGT  AAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACT  GATGAAGAATATTACAAAAGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAAT  ACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCCTCAAGAAAGAACTAGTCAC  TGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCG  CCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAAC  CATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATATAAA  AGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAAC  TGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTC  AATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTTTGAATGGATGCAAAACACCCCG  TAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGTGTGATGCAGGTA</p>



		<p>AGAGCGCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGG  ATCCAAAACAGTGGCGTTTTTTTAAACATGATGTGCTGAAAGTGCATTTT  AACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTG  CACTAAATCTGTGACTTCGGTCTGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAA  TGAGAACCACGAATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGG  CAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAGGGT  GGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGG  AAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCTGAACATGTGAACG  TCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAACACTAGCCGG  CGACCCATGGATAAAAAACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACT  GCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCAC  ATCTTGAGAGACCCGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAGGCAAAACG  TGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAGACCCGCTGGCATAGA  CATGACCACTGAAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAAA  GCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGG  ACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCAT  TAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTG  AATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACGCTC  GGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCG  CAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAACAGAAAGACTGCCT  CATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCTTC  ATTGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCTGGTGGTCCGGGAAAAAG  TTGTCCGTCCAGGCAAAAATGGTTGACTGGTTGTGACAGCCGCGTGAAG  CTACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCAGGTGATGTGCCAAA  TATGACATAATAATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCTA  TCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAA  GCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGG  TTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGTCTATAGCAGCGGAG  TTCAAGTTTTCCCGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAAGAGACGG  AAGTTCTGTTTGTATTCAATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAAT  CCTTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTCCAGACT  CCACGAAGCCGGATGT</p>
45	nsP4	<p>TACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGT  AAGGCAAACGGTGTATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAG  ATTTGATGCCCCGCGCTCGACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCA  AGAAATTACAGTTAAATCCCACACCTGTAACAGAAGCAGATACCAGTC  CAGGAAGGTGGAGAACATGAAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAA  GGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAA  CCCTGCATCCTGTTCTTTGTATTATCTAGTGTGAACCGTGCCTTTTCAA  GCCCCAAGGTCGAGTGGAAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAAGT  TCCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATCCAGAGTACGATGCCATTTTGG  ACATGGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCT  GCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCTATTTGGAACCCACAA  TACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAAGCTCT  GGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATGTCACGCAAAATGAGAGAATTG  CCCATTGATTGGCGGCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGC  GTGTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTT  ACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAATTTAAAGGACCAAAAAG  CTGCTGCTTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATA  CCAATGGACAGGTTTGTAAATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTC  CAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGG  CTGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGACT  GGTTAGGAGATTAATGCGGTCTGCTTCCGAACATTCATACACTGTTTGG  ATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCT  GGGGATTGTGTTCTGAAAACCTGACATCGCGTCTTTGATAAAAAGTGAGG  ACGACGCCATGGCTCTGACCGCTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGT</p>

		<p>GGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAAATTTCA  TCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAA  ATCTGGAATGTTCCCTCACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTTGAA  TCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAACGGCTAACCGGATACCATGTGCAGC  ATTCATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAAATTA  ATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAG  ATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTG  TGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCTAAAAA  GGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGA  TGACAGGAGAAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGT  GGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAAACC  GTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGT  TAAATCATTACAGCTACCTGAGAGGGGGCCCTATAACTCTCTACGGC</p>
46	nsP3	<p>GCACCCTCATATCATGTGGTGCAGGGGATATTGCCACGGCCACCAGAG  GAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGT  GTGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCGGGAAAGCTTCGATTTACAGCCG  ATCGAAGTAGGAAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCA  TTCATGCCGTAGGACCAAACCTCAACAAAATTTTCGGAGGTTGAAGGTGA  CAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGAT  ACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGCATCTTTTC  CGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCT  TTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAAT  GGGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGG  AGATATGCATATCCGACGACTCTCAGTGACAGAACCCTGATGCAGAGCT  GGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGC  ACAAGCGATGGCAAAAATTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACC  AGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAAC  GGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGC  AGTATTAGGTCGAAATGCCCGTCGAAGAGTCCGGAAGCCTCCACACCAC  CTAGCACGCTGCCTTGCTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAAGATGA  CAGCGCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAATTAAGTGTGTGCTCATCTTT  TCCATTGCCGAAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAAGATCCAATGCTCC  CAGCCTATATTGTTCTACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAA  GTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCA  GAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTTATAACCG  AGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGG  AAGAAGAGGATAGCATAAAGTTTGTGTGATGAGGCCCCGACCCACAGGT  GCTGCAAGTGCAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCAT  CCTGGTCCATTCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATA  CTTGACACCCTGGAAGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCG  AGACTAACTTTACTTCGAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCCGT  GCCTGCGCTCGAACAGTATTACAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCCGCA  CAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCT  AGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTC  GAGGCGCTTACCCCGTACGCACTCCTAGCAGGTGGTCTCGAGAACCA  GCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGA  GTTTGAGGCGTTCGTAGCACAAACAATGACGGTTTGTGCGGGGTGCA</p>
47	nsP1	<p>GAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTT  TGCAGCGGAGCTTCCCGAGTTTGAAGGTAGAAGCCAAGCAGGCTACTGA  TAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTTAAAACTGA  TCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAAGTGC  GCCCCCGCAGAAATGATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCCGA  TGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCT  GAAGAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAAAT  GAAGGAGCTCGCCCGTCTAGCGACCCCTGACCTGGAAACTGAGACT  ATGTGCCTCCACGACGACGATCGTGTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTG  TTACCAGGATGTATACGCGTTGACGCGACCGACAAGTCTCTATACCA</p>

		AGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCTTTTATGTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCAA CTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCATATGCAGC TCTGACGTTATGGAGCGGTACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGA AGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATC TACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTAT TTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCCGTGTGAGACTATAGTT AGTTGCGACGGGTACGTGCTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCCTGT ATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTT GTGCTGCAAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCC GTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGACCAATGACTGGCATACT GGCAACAGATGTCAGTGGCAGCAGCGCAAAAACCTGCTGGTTGGGCTC AACCAAGCGTATAGTCGTCAACGGTGCACCCAGAGAAAACCAATACCA TGAAAAATTACCTTTTGCCTGATGGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCA AAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGA GATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGA TAACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCAAAAGTGAA CAGCGATTTCCACTCATTCTGTGCTGCCAGGATAGGCAGTAACACATTGG AGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGG AGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGC AGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGC TCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATG TCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCC
48	KanR	ATGATTGAACAGGATGGCCTGCATGCGGGTAGCCCGGCAGCGTGGGTGG AACGTCGTGTTGGCTATGATTGGGCGCAGCAGACCATTGGCTGCTCTGAT GCGGGCGGTGTTCTGCTGAGCGCGCAGGGTCTCCGGTGTGTTTGTGAA AACCGATCTGAGCGGTGCGCTGAACGAGCTGCAGGATGAAGCGGCGCGT CTGAGCTGGCTGGCCACCACCGGTGTTCCGTGTGCGGCGGTGCTGGATGT GGTGACCGAAAGCGGGCCGTGATTGGCTGCTGCTGGGCGAAGTGCCGGGT CAGGATCTGCTGTCTAGCCATCTGGCGCCGGCAGAAAAAGTGAGCATTA TGGCGGATGCCATGCGTCTGCTGCATACCCTGGACCCGGCGACCTGCCG TTTGATCATCAGGCGAAACATCGTATTGAACGTGCGGCTACCCGATGG AAGCGGGCCTGGTGGATCAGGATGATCTGGATGAAGAACATCAGGGCCT GGCACCGGCAGAGCTGTTTGCCTGCTGAAAGCGAGCATGCCGGATGGC GAAGATCTGGTGGTGACCCATGGTGATGCGTGCCTGCCGAACATTATGG TGGAAAATGGCCGTTTTAGCGGCTTTATTGATTGCGGCGCTGTGGCGTG GCGGATCGTTATCAGGATATTGCGCTGGCCACCCGTGATATTGCGGAAG AACTGGGCGGCGAATGGGCGGATCGTTTTCTGGTGTGATGGCATTGC GGCACCGGATAGCCAGCGTATTGCGTTTTATCGTCTGCTGGATGAATTT TCTAATAA
49	Rop	GTGACCAAACAGGAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCCGCTTTATCAGAA GCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGA ACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTAC CGCAGCTGCCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAAACCTCTGA
50	5' UTR	ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAA
51	3' UTR	ATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGCGGCGATTGGC ATGCCGCTTTAAAATTTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATT TTGTTTTAATATTTT
52	Промотор CVM с сайтами TetO	CCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA TGTTCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATA GTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCG TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCC CCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAG GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAACCTGCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT

		CAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC ATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTG ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTG TTTTGGACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGC CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA AGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAG ATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCA TCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCCGATCCAGCCTCC GCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGA
53	Поли-А ВГН	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTT CCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAAATAAAATGAG GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGG GGTGGGGCAGGACGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCC
54	Лидерная последовательность убиквитина	MQIFVKLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDG RTLSDYNIQKESTLHLVLR LGV

### Перечень последовательностей

<110> ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК.

<120> ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ МУТАНТНЫХ CALR И JAK2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> JBI6177WOPCT1

<140>

<141>

<150> 62/936, 841

<151> 2019-11-18

<150> 62/936, 846

<151> 2019-11-18

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 54

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

<400> 1

Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg  
1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg  
20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys  
35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu  
50

<210> 2  
 <211> 14  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 2  
 Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys  
 1 5 10

<210> 3  
 <211> 71  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

<400> 3  
 Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg  
 1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg  
 20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys  
 35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys  
 50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys  
 65 70

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

<400> 4  
 Lys Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys  
 1 5 10 15

Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly  
 20 25 30

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 5  
 Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 6  
 Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val  
 1 5

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 7  
 Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Asn Ile Leu Val  
 20

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 8  
 Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu  
 1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala  
 20

## 048051

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 92

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

&lt;400&gt; 9

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu  
1 5 10 15Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr  
20 25 30Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr  
35 40 45Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser  
50 55 60Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu  
65 70 75 80Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys  
85 90

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

&lt;400&gt; 10

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu  
1 5 10 15Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr  
20 25 30Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr  
35 40 45Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser  
50 55 60Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu  
65 70 75 80

048051

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val  
85 90 95

Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu  
100 105 110

Asn Ile Leu Val  
115

<210> 11

<211> 125

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

<400> 11

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu  
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr  
20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr  
35 40 45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser  
50 55 60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys  
85 90 95

Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly  
100 105 110

Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly  
115 120 125

<210> 12

<211> 95

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный



## 048051

## полипептид

&lt;400&gt; 12

Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg  
 1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg  
 20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys  
 35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys  
 50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val  
 65 70 75 80

Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val  
 85 90 95

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 104

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
 полипептид

&lt;400&gt; 13

Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg  
 1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg  
 20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys  
 35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys  
 50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys Leu Ser His Lys His  
 65 70 75 80

Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu  
 85 90 95

Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly  
 100

## 048051

<210> 14  
 <211> 171  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид  
  
 <400> 14  
 Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu  
 1 5 10 15  
  
 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp  
 20 25 30  
  
 Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys  
 35 40 45  
  
 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu  
 50 55 60  
  
 Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg Lys Asp Lys  
 65 70 75 80  
  
 Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg  
 85 90 95  
  
 Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser  
 100 105 110  
  
 Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp  
 115 120 125  
  
 Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met  
 130 135 140  
  
 Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala  
 145 150 155 160  
  
 Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val  
 165 170

<210> 15  
 <211> 180  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный

048051

полипептид

<400> 15

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu  
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp  
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys  
35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu  
50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg Lys Asp Lys  
65 70 75 80

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg  
85 90 95

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser  
100 105 110

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp  
115 120 125

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met  
130 135 140

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn  
145 150 155 160

Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe  
165 170 175

Val Lys Phe Gly  
180

<210> 16

<211> 276

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 16

atggcatgcc caggcttcct gtgggcctg gtcacagca cctgtctgga gttttccatg

60

048051

gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120  
 cgcattgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180  
 cctagaacca gctgcagggg ggcattgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240  
 gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaag 276

<210> 17

<211> 348

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 17

atggcatgcc caggcttcct gtgggcctg gtcattcagca cctgtctgga gttttccatg 60  
 gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120  
 cgcattgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180  
 cctagaacca gctgcagggg ggcattgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240  
 gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaaggccg cctacgtgct gaattatggc 300  
 gtgtgcttct gtgccgccta tttttgtggc gatgagaaca tcctggtg 348

<210> 18

<211> 375

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 18

atggcatgcc caggcttcct gtgggcctg gtcattcagca cctgtctgga gttttccatg 60  
 gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120  
 cgcattgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180  
 cctagaacca gctgcagggg ggcattgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240  
 gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaaggccg cctacaagct gagccacaag 300  
 cacctgggtgc tgaactatgg cgtgtgcttc tgtggcgatg agaatatcct ggtgcaggag 360  
 ttcgtgaagt ttggc 375

<210> 19

<211> 285

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

048051

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 19  
 atgaaggaca agcaggatga ggagcagcgg acccgagaaa tgatgaggac aaagatgcgc 60  
 atgagggcga tgcggagaac aaggcgcgaag atgcggagaa agatgtctcc agcaaggcct 120  
 agaaccagct gcagggaggc atgtctgcag ggatggacag aggcagcata cgaggaggca 180  
 gaggacaact gcagggcgcg gatgaggacc aaggccgcct acgtgctgaa ttatggcgtg 240  
 tgcttctgtg ccgcctatct ttgtggcgat gagaacatcc tgggtg 285

<210> 20  
 <211> 312  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 20  
 atgaaggaca agcaggatga ggagcagcgg acccgagaaa tgatgaggac aaagatgcgc 60  
 atgagggcga tgcggagaac aaggcgcgaag atgcggagaa agatgtctcc agcaaggcct 120  
 agaaccagct gcagggaggc atgtctgcag ggatggacag aggcagcata cgaggaggca 180  
 gaggacaact gcagggcgcg gatgaggacc aaggccgcct acaagctgag ccacaagcac 240  
 ctggtgctga actatggcgt gtgcttctgt ggcgatgaga atatcctggg gcaggagtcc 300  
 gtgaagtttg gc 312

<210> 21  
 <211> 513  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 21  
 atgcagatct tcgtgaagac cctgacaggc aagaccatca cactggaggt ggagccctcc 60  
 gacaccatcg agaacgtgaa ggccaagatc caggacaagg agggcatccc ccctgatcag 120  
 cagcggctga tctttgccgg caagcagctg gaggacggca gaaccctgtc tgattacaat 180  
 atccagaagg agagcacact gcacctgggt ctgcggctga gaggcgtgag gaaggacaag 240  
 caggatgagg agcagcgcac ccggagaatg atgcggacaa agatgagaat gaggcgcatg 300  
 cggagaacca ggcgcaagat gcggagaaaag atgagcccag caaggccacg cacctcctgc 360  
 agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcctatg aggaggccga ggacaactgc 420  
 aggcgcatga tgcggacaaa ggccgcctac gtgctgaatt atggcgtgtg cttctgtgcc 480

gcctatTTTT gtggcgatga gaacatcctg gtg 513

<210> 22

<211> 546

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 22

atgcagatct tcgtgaagac cctgacaggc aagaccatca cactggaggt ggagccctcc 60

gacaccatcg agaacgtgaa ggccaagatc caggacaagg agggcatccc cctgatcag 120

cagcggctga tctttgccgg caagcagctg gaggacggca gaaccctgtc tgattacaat 180

atccagaagg agagcacact gcacctgggtg ctgсggctga gaggcgtgag gaaggacaag 240

caggatgagg agcagcgcac ccggagaatg atgсggacaa agatgagaat gaggcgcatg 300

сggagaacca ggcgсааgat gсggagaaaг atgagcccag саaggccacg cacctcctgc 360

agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcctatg aggaggccga ggacaactgc 420

aggcgcatga tgcggacaaa ggссgcctac aagctgtctc асааgсacct ggtgctgaac 480

tatggcgtgt gcttctgtgg cgatgagaat atcctgggtg aggagttcgt gaagtttggc 540

tgataa 546

<210> 23

<211> 1417

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 23

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aacattaccg ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc 360

ccacttgгca gtacatcaag tgtatcatat gccaaгtacg ccccctattg acgtcaatga 420

сggtaaatgg cccgcctggc attatgocca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacat 540

048051

caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660  
cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc 720  
tctccctatc agtgatagag atctccctat cagtgataga gatcgtcgac gagctcgttt 780  
agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 840  
ccgggaccga tccagcctcc gcgggccggga acgggtgcatt ggatctagag ccaccatggc 900  
atgcccaggc ttctgtggtg ccctgggtcat cagcacctgt ctggagtttt ccatggccat 960  
gaaggacaag caggatgagg agcagcggac ccggagaaatg atgaggacaa agatgcgcgt 1020  
gaggcgcatg cggagaacaa ggcgcaagat gcggagaaag atgtctccag caaggcctag 1080  
aaccagctgc agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcatacg aggaggcaga 1140  
ggacaactgc aggcgcgtga tgaggaccaa ggccgcctac aagctgagcc acaagcacct 1200  
ggtgctgaac tatggcgtgt gcttctgtgg cgatgagaat atcctgggtc aggagtctgt 1260  
gaagtttggc tgataaggta ccatccgaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa 1320  
taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt 1380  
ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtct 1417

<210> 24

<211> 1390

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 24

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
aacattaccg ccatggtgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180  
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240  
gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300  
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc 360  
ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac ccccctattg acgtcaatga 420  
cggtaaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg 480  
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcgggtttt ggcagtacat 540  
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660

## 048051

cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720  
tctccctatc agtgatagag atctccctat cagtgataga gatcgtcgac gagctcgttt 780  
agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 840  
ccgggaccga tccagcctcc gcgggccggga acggtgcatt ggatctagag ccaccatggc 900  
atgcccaggc ttctgtggg ccctgggtcat cagcacctgt ctggagtttt ccatggccat 960  
gaaggacaag caggatgagg agcagcggac ccggagaatg atgaggaca agatgcgcat 1020  
gaggcgcgatg cggagaacaa ggcgcaagat gcggagaaag atgtctccag caaggcctag 1080  
aaccagctgc agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcatacg aggaggcaga 1140  
ggacaactgc aggcgcgatga tgaggacca ggccgcctac gtgctgaatt atggcgtgtg 1200  
cttctgtgcc gcctatTTTT gtggcgatga gaacatcctg gtgtgataag gtaccatccg 1260  
aacttgTTTA ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 1320  
aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 1380  
tatcatgtct 1390

<210> 25

<211> 549

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 25

gatcactaat tccaaaccsa cccgctTTTT atagtaagtt tttcacccat aaataataaa 60  
tacaataatt aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acggtaaagga 120  
agtagaatca taaagaacag tgacggatcc cgcgacttcg ccgcatggg ccagaaggaa 180  
cagattcata cgcttcagaa aaattctgaa cgaatgtcaa agcaattgac acgaagttct 240  
caggcagtaa tgaaggaca acaagacgaa gaacaacgaa ctaggcggat gatgaggact 300  
aagatgagga tgcggaggat gagacggacg cgacgcaaga tgcgcccggaa aatgtctccc 360  
gccccgccaa ggacgtcttg tggggaagcc tgtttgcagg gctggaccga agcagcttac 420  
gaagaagcag aagacaattg tgggcaatg atgagaacga aggctgctta cgtgcttaac 480  
tatggagtgt gcttctgcgc tgcctatttc tgcggagatg agaacattct ggtgtagtaa 540  
aggcgcgccc 549

<210> 26

<211> 369

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность



048051

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 26

atgggccaaga aggaacagat tcatacgctt cagaaaaatt ctgaacgaat gtcaaagcaa 60  
 ttgacacgaa gttctcaggc agtaatgaag gacaaacaag acgaagaaca acgaactagg 120  
 cggatgatga ggactaagat gaggatgctg aggatgagac ggacgctgac caagatgctg 180  
 cggaaaatgt ctcccgcscg gccaaaggac tcttgctcggg aagcctgttt gcagggctgg 240  
 accgaagcag cttacgaaga agcagaagac aattgtcggc gaatgatgag aacgaaggct 300  
 gcttacgtgc ttaactatgg agtgtgcttc tgcgctgcct atttctgctg agatgagaac 360  
 attctggtg 369

<210> 27

<211> 284

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 27

atgaaggaca aacaagacga agaacaacga actaggcgga tgatgaggac taagatgagg 60  
 atgctggagga tgagacggac gctgacgcaag atgctgctga aatgtctcc cgtccggcca 120  
 aggacgtctt gtcgggaagc ctgtttgcag ggctggaccg aagcagctta cgaagaagca 180  
 gaagacaatt gtcggcgaat gatgagaacg aaggctgctt acgtgcttaa ctatggagtg 240  
 tgcttctgctg ctgcctatct ctgcggagat gagaacattc tggt 284

<210> 28

<211> 21

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 28

Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Asn Ile Leu Val  
 20

<210> 29

<211> 28

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

048051

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 29

Met Gly Gln Lys Glu Gln Ile His Thr Leu Gln Lys Asn Ser Glu Arg  
1 5 10 15

Met Ser Lys Gln Leu Thr Arg Ser Ser Gln Ala Val  
20 25

<210> 30

<211> 84

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный олигонуклеотид

<400> 30

atggggccsaga aggaacagat tcatacgctt cagaaaaatt ctgaacgaat gtcaaagcaa 60

ttgacacgaa gttctcaggc agta 84

<210> 31

<211> 123

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

<400> 31

Met Gly Gln Lys Glu Gln Ile His Thr Leu Gln Lys Asn Ser Glu Arg  
1 5 10 15

Met Ser Lys Gln Leu Thr Arg Ser Ser Gln Ala Val Met Lys Asp Lys  
20 25 30

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg  
35 40 45

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser  
50 55 60

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp  
65 70 75 80

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met  
85 90 95

048051

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala  
 100 105 110

Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val  
 115 120

<210> 32

<211> 149

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 32

gatcactaat tccaaccsa cccgcttttt atagtaagtt tttcacccat aaataataaa 60

tacaataatt aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acggttaagga 120

agtagaatca taaagaacag tgacggatc 149

<210> 33

<211> 10712

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 33

taatascgact cactatagat aggcggcgca tgagagaagc ccagaccaat tacctacca 60

aataggagaa agttcacggt gacatcgagg aagacagccc attcctcaga gctttgcagc 120

ggagcttccc gcagtttgag gtagaagcca agcaggtcac tgataatgac catgctaattg 180

ccagagcggt ttcgcatctg gcttcaaaac tgatcgaaac ggaggtggac ccatccgaca 240

cgatccttga cattggaata gtcagcatag tacatttcat ctgactaata ctacaacacc 300

accaccatga atagaggatt ctttaacatg ctcgcccgcc gccccctccc ggcacccact 360

gccatgtgga ggccgcgag aaggaggcag gcggccccgg gaagcggagc tactaacttc 420

agcctgctga agcaggctgg agacgtggag gagaaccctg gacctgagaa agttcacggt 480

gacatcgagg aagacagccc attcctcaga gctttgcagc ggagcttccc gcagtttgag 540

gtagaagcca agcaggtcac tgataatgac catgctaattg ccagagcggt ttcgcatctg 600

gcttcaaaac tgatcgaaac ggaggtggac ccatccgaca cgatccttga cattggaagt 660

gcgccccccc gcagaatgta ttctaagcac aagtatcatt gtatctgtcc gatgagatgt 720

gcggaagatc cggacagatt gtataagtat gcaactaagc tgaagaaaa ctgtaaggaa 780

ataactgata aggaattgga caagaaaatg aaggagctcg ccgccgtcat gagcgcacct 840

## 048051

gacctggaaa	ctgagactat	gtgcctccac	gacgacgagt	cgtgtcgcta	cgaagggcaa	900
gtcgctgttt	accaggatgt	atacgcgggt	gacggaccga	caagtctcta	tcaccaagcc	960
aataagggag	ttagagtcgc	ctactggata	ggctttgaca	ccaccctttt	tatgtttaag	1020
aacttggtcg	gagcatatcc	atcatactct	accaactggg	ccgacgaaac	cgtgttaacg	1080
gctcgtaaca	taggcctatg	cagctctgac	gttatggagc	ggtcacgtag	agggatgtcc	1140
attcttagaa	agaagtattt	gaaacctacc	aacaatgttc	tattctctgt	tggctcgacc	1200
atctaccacg	agaagagggg	cttactgagg	agctggcacc	tgccgtctgt	atctcactta	1260
cgtggcaagc	aaaattacac	atgtcgggtg	gagactatag	ttagttgcga	cgggtacgtc	1320
gttaaaagaa	tagctatcag	tccaggcctg	tatgggaagc	cttcaggcta	tgctgctacg	1380
atgcaccgcg	agggattctt	gtgctgcaaa	gtgacagaca	cattgaacgg	ggagagggtc	1440
tcttttcccg	tgtgcacgta	tgtgccagct	acattgtgtg	accaaagac	tggcatactg	1500
gcaacagatg	tcagtgcgga	cgacgcgcaa	aaactgctgg	ttgggctcaa	ccagcgtata	1560
gtcgtcaacg	gtcgcaccca	gagaaacacc	aataccatga	aaaattacct	tttgcccgta	1620
gtggcccagg	catttgctag	gtgggcaaag	gaatataagg	aagatcaaga	agatgaaagg	1680
ccactaggac	tacgagatag	acagttagtc	atgggggtgt	gttgggcttt	tagaaggcac	1740
aagataacat	ctatttataa	gcgcccggat	acccaaacca	tcatcaaagt	gaacagcgat	1800
ttccactcat	tcgtgctgcc	caggataggc	agtaacacat	tggagatcgg	gctgagaaca	1860
agaatcagga	aaatgttaga	ggagcacaag	gagccgtcac	ctctcattac	cgccgaggac	1920
gtacaagaag	ctaagtgcgc	agccgatgag	gctaaggagg	tgcgtgaagc	cgaggagttg	1980
cgcgcagctc	taccaccttt	ggcagctgat	gttgaggagc	ccactctgga	agccgatgtc	2040
gacttgatgt	tacaagaggc	tggggccggc	tcagtggaga	cacctcgtgg	cttgataaag	2100
gttaccagct	acgatggcga	ggacaagatc	ggctcttacg	ctgtgctttc	tccgcaggct	2160
gtactcaaga	gtgaaaaatt	atcttgcatc	caccctctcg	ctgaacaagt	catagtgata	2220
acacactctg	gccgaaaagg	gcgttatgcc	gtggaaccat	accatggtaa	agtagtggtg	2280
ccagagggac	atgcaatacc	cgtccaggac	tttcaagctc	tgagtgaaag	tgccaccatt	2340
gtgtacaacg	aacgtgagtt	cgtaaacagg	tacctgcacc	atattgccac	acatggagga	2400
gcgctgaaca	ctgatgaaga	atattacaaa	actgtcaagc	ccagcgagca	cgacggcgaa	2460
tacctgtacg	acatcgacag	gaaacagtgc	gtcaagaaag	aactagtcac	tgggctaggg	2520
ctcacaggcg	agctggtgga	tcctcccttc	catgaattcg	cctacgagag	tctgagaaca	2580
cgaccagccg	ctccttacca	agtaccaacc	ataggggtgt	atggcgtgcc	aggatcaggc	2640
aagtctggca	tcattaaaag	cgcagtcacc	aaaaaagatc	tagtggtgag	cgccaagaaa	2700
gaaaactgtg	cagaaattat	aagggacgtc	aagaaaatga	aagggctgga	cgtcaatgcc	2760

agaactgtgg actcagtgct cttgaatgga tgcaaacacc ccgtagagac cctgtatatt 2820  
 gacgaagctt ttgcttgtca tgcaggtact ctacagagcgc tcatagccat tataagacct 2880  
 aaaaaggcag tgctctgagg ggatcccaaa cagtgcgggt tttttaacat gatgtgcctg 2940  
 aaagtgcatt ttaaccacga gatttgcaca caagtcttcc acaaaagcat ctctcgccgt 3000  
 tgcactaaat ctgtgacttc ggtcgtctca accttgtttt acgacaaaaa aatgagaacg 3060  
 acgaatccga aagagactaa gattgtgatt gacactaccg gcagtaccaa acctaagcag 3120  
 gacgatctca ttctcacttg tttcagaggg tgggtgaagc agttgcaaat agattacaaa 3180  
 ggcaacgaaa taatgacggc agctgcctct caagggtga cccgtaaagg tgtgtatgcc 3240  
 gttcgggtaca aggtgaatga aaatcctctg tacgcacca cctctgaaca tgtgaacgtc 3300  
 ctactgacct gcacggagga ccgcatcgtg tggaaaacac tagccggcga cccatggata 3360  
 aaaacactga ctgccaaagta ccctgggaat ttcactgcca cgatagagga gtggcaagca 3420  
 gagcatgatg ccatcatgag gcacatcttg gagagaccgg accctaccga cgtcttccag 3480  
 aataaggcaa acgtgtgttg ggccaaggct ttagtgccgg tgctgaagac cgctggcata 3540  
 gacatgacca ctgaacaatg gaacactgtg gattatthttg aaacggacaa agctcactca 3600  
 gcagagatag tattgaacca actatgcgtg aggttctttg gactcgatct ggactccggt 3660  
 ctatthttctg caccactgt tccgttatcc attaggaata atcactggga taactccccg 3720  
 tcgcctaaca tgtacgggct gaataaagaa gtgggtccgtc agctctctcg caggtacca 3780  
 caactgcctc gggcagttgc cactggaaga gtctatgaca tgaacactgg tacactgcgc 3840  
 aattatgatc cgcgcataaa cctagtacct gtaaacagaa gactgcctca tgcttttagtc 3900  
 ctccaccata atgaacacct acagagtgac ttttcttcat tcgtcagcaa attgaagggc 3960  
 agaactgtcc tgggtggctgg ggaaaagttg tccgtcccag gcaaaatggg tgactggttg 4020  
 tcagaccggc ctgaggctac cttcagagct cggctggatt taggcatccc aggtgatgtg 4080  
 cccaaatag acataatatt tgtaatgtg aggaccccat ataaatacca tcaactatcag 4140  
 cagtgtgaag accatgccat taagcttagc atgttgacca agaaagcttg tctgcatctg 4200  
 aatccccggc gaacctgtgt cagcataggt tatggttacg ctgacagggc cagcgaaagc 4260  
 atcattgggtg ctatagcgcg gcagttcaag ttttcccggg tatgcaaacc gaaatcctca 4320  
 cttgaagaga cggagttct gtttgtattc attgggtacg atcgcaaggc ccgtacgcac 4380  
 aatccttaca agctttcatc aaccttgacc aacatttata caggttccag actccacgaa 4440  
 gccggatgtg caccctcata tcatgtggtg cgaggggata ttgccacggc caccgaagga 4500  
 gtgattataa atgctgctaa cagcaaagga caacctggcg gaggggtgtg cggagcgtg 4560  
 tataagaaat tcccggaaag cttcgattta cagccgatcg aagtaggaaa agcgcgactg 4620

## 048051

gtcaaaggtg cagctaaaca tatcattcat gccgtaggac caaacttcaa caaagtttcg 4680  
gaggttgaag gtgacaaaca gttggcagag gcttatgagt ccatcgctaa gattgtcaac 4740  
gataacaatt acaagtcagt agcgattcca ctggtgtcca ccggcatctt ttccgggaac 4800  
aaagatcgac taaccaatc attgaacat ttgctgacag ctttagacac cactgatgca 4860  
gatgtagcca tatactgcag ggacaagaaa tgggaaatga ctctcaagga agcagtggct 4920  
aggagagaag cagtggagga gatatgcata tccgacgact cttcagtgac agaacctgat 4980  
gcagagctgg tgaggggtgca tccgaagagt tctttggctg gaaggaaggg ctacagcaca 5040  
agcgatggca aaactttctc atatttggaa gggaccaagt ttcaccaggc ggccaaggat 5100  
atagcagaaa ttaatgcat gtggcccggt gcaacggagg ccaatgagca ggtatgcatg 5160  
tatatcctcg gagaaagcat gagcagtatt aggtcgaaat gccccgtcga agagtccgaa 5220  
gcctccacac cacctagcac gctgccttgc ttgtgcatcc atgccatgac tccagaaaga 5280  
gtacagcgcc taaaagcctc acgtccagaa caaattactg tgtgctcatc ctttccattg 5340  
ccgaagtata gaatcactgg tgtgcagaag atccaatgct cccagcctat attgtttctca 5400  
ccgaaagtgc ctgctatat tcatccaagg aagtatctcg tggaaacacc accggtagac 5460  
gagactccgg agccatcggc agagaaccaa tccacagagg ggacacctga acaaccacca 5520  
cttataaccg aggatgagac caggactaga acgctgagc cgatcatcat cgaagaggaa 5580  
gaagaggata gcataagttt gctgtcagat ggcccgacc accagggtgct gcaagtccgag 5640  
gcagacattc acgggcccgc ctctgtatct agctcatcct ggtccattcc tcatgcatcc 5700  
gactttgatg tggacagttt atccatactt gacaccctgg agggagctag cgtgaccagc 5760  
ggggcaacgt cagccgagac taactcttac ttcgcaaaga gtatggagtt tctggcgcga 5820  
ccggtgctcg cgctcgaac agtattcagg aacctccac atcccgtcc gcgcacaaga 5880  
acaccgtcac ttgcaccag cagggcctgc tcgagaacca gcctagtttc caccgcca 5940  
ggcgtgaata gggatgatcac tagagaggag ctcgaggcgc ttaccccgtc acgcactcct 6000  
agcaggtcgg tctcgagaac cagcctggtc tocaaccgc caggcgtaaa tagggtgatt 6060  
acaagagagg agtttgaggc gttcgtagca caacaacaat gacggtttga tgcgggtgca 6120  
tacatctttt cctccgacac cggccaaggg catttacaac aaaaatcagt aaggcaaacg 6180  
gtgctatccg aagtgggtgt ggagaggacc gaattggaga tttcgtatgc cccgcccctc 6240  
gaccaagaaa aagaagaatt actacgcaag aaattacagt taaatcccac acctgctaac 6300  
agaagcagat accagtccag gaaggtggag aacatgaaag ccataacagc tagacgtatt 6360  
ctgcaaggcc tagggcatta tttgaaggca gaaggaaaag tggagtgcta ccgaaccctg 6420  
catcctgttc ctttgtattc atctagtgtg aaccgtgcct tttcaagccc caaggtcgca 6480  
gtggaagcct gtaacgcat gttgaaagag aactttccga ctgtggcttc ttactgtatt 6540

attccagagt acgatgccta tttggacatg gttgacggag cttcatgctg cttagacact 6600  
 gccagttttt gccctgcaaa gctgcgagc tttccaaaga aacactccta tttggaaccc 6660  
 acaatacgat cggcagtgcc ttcagcgatc cagaacacgc tccagaacgt cctggcagct 6720  
 gccacaaaaa gaaattgcaa tgtcacgcaa atgagagaat tgcccgtatt ggattcggcg 6780  
 gcctttaatg tggaatgctt caagaaatat gcgtgtaata atgaatattg ggaaacgttt 6840  
 aaagaaaacc ccatcaggct tactgaagaa aacgtggtaa attacattac caaattaaaa 6900  
 ggaccaaaaag ctgctgctct ttttgcggaag acacataatt tgaatatggt gcaggacata 6960  
 ccaatggaca ggtttgtaat ggacttaaag agagacgtga aagtgactcc aggaacaaaa 7020  
 catactgaag aacggcccaa ggtacaggctg atccaggctg ccgatccgct agcaacacgcg 7080  
 tatctgtgcg gaatccaccg agagctgggt aggagattaa atgcggtcct gcttccgaac 7140  
 attcatacac tgtttgatat gtcggctgaa gactttgacg ctattatagc cgagcacttc 7200  
 cagcctgggg attgtgttct ggaaactgac atcgcgtcgt ttgataaaaag tgaggacgac 7260  
 gccatggctc tgaccgcggt aatgattctg gaagacttag gtgtggacgc agagctgttg 7320  
 acgctgattg aggcggttt cggcgaaatt tcatcaatac atttgccac taaaactaaa 7380  
 tttaaattcg gagccatgat gaaatctgga atgttctca cactgtttgt gaacacagtc 7440  
 attaacattg taatcgcaag cagagtggtg agagaacggc taaccggatc accatgtgca 7500  
 gcattcattg gagatgacaa tatcgtgaaa ggagtcaaat cggacaaatt aatggcagac 7560  
 aggtgcccga cctggttgaa tatggaagtc aagattatag atgctgtggt gggcgagaaa 7620  
 gcgccttatt tctgtggagg gtttattttg tgtgactccg tgaccggcac agcgtgccgt 7680  
 gtggcagacc ccctaaaaag gctgtttaag cttggcaaac ctctggcagc agacgatgaa 7740  
 catgatgatg acaggagaag ggcattgcat gaagagtcaa cacgctggaa ccgagtgggt 7800  
 attctttcag agctgtgcaa ggcagtagaa tcaaggtatg aaaccgtagg aacttccatc 7860  
 atagttatgg ccatgactac tctagctagc agtgtaaat cattcagcta cctgagaggg 7920  
 gccctataa ctctctacgg ctaacctgaa tggactacga catagtctag tccgccaaga 7980  
 tatcggcgcg ccgtttaaac ggccggcctt aattaagtaa cgatacagca gcaattggca 8040  
 agctgcttac atagaactcg cggcgattgg catgccgctt taaaattttt attttatttt 8100  
 tcttttcttt tccgaatcgg attttgttt taatatttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8160  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaacc cctctctaaa cggaggggtt tttttcagcg taactggact 8220  
 ggccacagtt aggcggccgc gcatgttcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct 8280  
 ctcgtttcat cggtatcatt acctccatga acagaaatcc cccttacacg gaggcacag 8340  
 tgaccaaaaca ggaaaaaacc gcccttaaca tggcccgtt tatcagaagc cagacattaa 8400

cgcttctgga	gaaactcaac	gagctggacg	cggatgaaca	ggcagacatc	tgtgaatcgc	8460
ttcacgacca	cgctgatgag	ctttaccgca	gctgcctcgc	gcgtttcggt	gatgacggtg	8520
aaaacctctg	acacatgcag	ctccccgaga	cggtcacagc	ttgtctgtaa	gcggatgccg	8580
ggagcagaca	agcccgtcag	ggcgcgtcag	cgggtgttgg	cgggtgtcgg	ggcgcagcca	8640
tgacccagtc	acgtagcgat	agcggagtgt	atactggctt	aactatgcgg	catcagagca	8700
gattgtactg	agagtgcacc	atatgcggtg	tgaaataaccg	cacagatgcg	taaggagaaa	8760
ataccgcatac	aggcgcctcgc	ttcctcgcctc	actgactcgc	tgcgctcggg	cgttcggctg	8820
cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	8880
aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaaggc	cagcaaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	8940
gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	9000
tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcacagga	ctataaagat	accaggcgtt	tccccctgga	9060
agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	9120
ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	9180
taggtcgttc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	9240
gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccgcgtaa	gacacgactt	atcgccactg	9300
gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtg	tacagagttc	9360
ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	9420
ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaccacc	9480
gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgagaaa	aaaaggatct	9540
caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	9600
taagggattt	tggatcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	9660
aaatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	cagttattag	9720
aaaaattcat	ccagcagacg	ataaaacgca	atacgctggc	tatccggtgc	cgcaatgcca	9780
tacagcacca	gaaaacgatc	cgccattcgc	ccgcccagtt	cttccgcaat	atcacgggtg	9840
gccagcgcga	tatcctgata	acgatccgcc	acgcccagac	ggccgcaatc	aataaagccg	9900
ctaaaacggc	cattttccac	cataatgttc	ggcaggcacg	catcaccatg	ggtcaccacc	9960
agatcttcgc	catccggcat	gctcgctttc	agacgcgcaa	acagctctgc	cggtgccagg	10020
ccctgatggt	cttcatccag	atcatcctga	tccaccaggc	ccgcttccat	acgggtacgc	10080
gcacgttcaa	tacgatgttt	cgctgatga	tcaaacggac	aggctgcggg	gtccagggtg	10140
tgcagacgac	gcatggcatc	cgccataatg	ctcacttttt	ctgccggcgc	cagatggcta	10200
gacagcagat	cctgacccgg	cacttcgccc	agcagcagcc	aatcacggcc	cgcttcggtc	10260
accacatcca	gcaccgccgc	acacggaaca	ccggtggtgg	ccagccagct	cagacgcgcc	10320



gcttcatcct gcagctcggt cagcgcaccg ctcagatcgg ttttcacaaa cagcaccgga 10380  
 cgaccctgcg cgctcagacg aaacaccgcc gcatcagagc agccaatggt ctgctgcgcc 10440  
 caatcatagc caaacagacg ttccaccac gctgcccggc taccgcatg caggccatcc 10500  
 tgttcaatca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 10560  
 atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 10620  
 tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaagcatc 10680  
 cgcctttcgt tttatttgac catgttggta tg 10712

<210> 34

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный олигонуклеотид

<400> 34

aaccsstctc taaacggagg ggtttttttt 29

<210> 35

<211> 105

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 35

cgcggaacc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 60

caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagt 105

<210> 36

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный олигонуклеотид

<400> 36

ctctctacgg стаастгаа тгга 24

<210> 37

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
oligonucleotide

<400> 37  
taatacgact cactatag 18

<210> 38  
<211> 39  
<212> RNA  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
oligonucleotide

<400> 38  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 39

<210> 39  
<211> 195  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
полинуклеотид

<400> 39  
taggagaaaag ttcacgttga catcgaggaa gacagcccat tcctcagagc tttgcagcgg 60  
agcttccccgc agtttgaggt agaagccaag caggtcactg ataatgacca tgctaатgcc 120  
agagcgTTTT cgcатctggc ttcaaaactg atcgaaacgg aggtggaccс atccgacacg 180  
atccttgaca ttgga 195

<210> 40  
<211> 142  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
полинуклеотид

<400> 40  
atagtcagca tagtacattt catctgacta atactacaac accaccacca tgaatagagg 60  
attctttaac atgctcggcc gccgcccctt cccggccccc actgccatgt ggaggccgcg 120  
gagaaggagg caggcggccc cg 142

<210> 41  
<211> 66  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный

## oligonucleotide

<400> 41		
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct		60
ggacct		66
<210> 42		
<211> 141		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид		
<400> 42		
cgagccatg acccagtcac gtagcगतag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca		60
tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcgggtgtg aaataccgca cagatgcgta		120
aggagaaaaat accgcatcag g		141
<210> 43		
<211> 5796		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид		
<400> 43		
atgaatagag gattctttaa catgctcggc cgcgccccct tcccggcccc cactgccatg		60
tggaggccgc ggagaaggag gcagggcggc ccgggaagcg gagctactaa cttcagcctg		120
ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggacctg agaaagttca cgttgacatc		180
gaggaagaca gccattcct cagagctttg cagcggagct tcccgcagtt tgaggtagaa		240
gccaagcagg tcactgataa tgaccatgct aatgccagag cgttttcgca tctggcttca		300
aaactgatcg aaacggaggt ggaccatcc gacacgatcc ttgacattgg aagtgcgccc		360
gcccgcagaa tgtattctaa gcacaagtat cattgtatct gtccgatgag atgtgcggaa		420
gatccggaca gattgtataa gtatgcaact aagctgaaga aaaactgtaa ggaaataact		480
gataaggaat tggacaagaa aatgaaggag ctccgcccg tcatgagcga ccctgacctg		540
gaaactgaga ctatgtgcct ccacgacgac gagtcgtgtc gctacgaagg gcaagtcgct		600
gtttaccagg atgtatacgc ggttgacgga ccgacaagtc tctatcacca agccaataag		660
ggagttagag tcgcctactg gataggcttt gacaccaccc cttttatggt taagaacttg		720
gctggagcat atccatcata ctctaccaac tgggccgacg aaaccgtggt aacggctcgt		780
aacataggcc tatgcagctc tgacgttatg gagcggtcac gtagagggat gtccattcct		840

## 048051

agaaagaagt atttgaaacc atccaacaat gttctattct ctggttgctc gaccatctac 900  
 cacgagaaga gggacttact gaggagctgg cacctgccgt ctgtatttca cttacgtggc 960  
 aagcaaaatt acacatgtcg gtgtgagact atagttagtt gcgacgggta cgtcgttaaa 1020  
 agaatagcta tcagtccagg cctgtatggg aagccttcag gctatgctgc tacgatgcac 1080  
 cgcgagggat tcttgtgctg caaagtgaca gacacattga acggggagag ggtctctttt 1140  
 cccgtgtgca cgtatgtgcc agctacattg tgtgaccaa tgactggcat actggcaaca 1200  
 gatgtcagtg cggacgacgc gcaaaaactg ctggttgggc tcaaccagcg tatagtcgtc 1260  
 aacggtcgca cccagagaaa caccaatacc atgaaaaatt accttttgcc cgtagtggcc 1320  
 caggcatttg ctaggtgggc aaaggaatat aaggaagatc aagaagatga aaggccacta 1380  
 ggactacgag atagacagtt agtcatgggg tgttggttggg cttttagaag gcacaagata 1440  
 acatctatth ataagcgccc ggatacccaa accatcatca aagtgaacag cgatttccac 1500  
 tcattcgtgc tgcccaggat aggcagtaac acattggaga tcgggctgag aacaagaatc 1560  
 aggaaaatgt tagaggagca caaggagccg tcacctctca ttaccgccga ggacgtacaa 1620  
 gaagctaagt gcgcagccga tgaggctaag gaggtgctg aagccgagga gttgcgcgca 1680  
 gctctaccac ctttggcagc tgatggtgag gagccactc tgggaagccga tgtcgacttg 1740  
 atgttacaag aggctggggc cggctcagtg gagacacctc gtggcttgat aaaggttacc 1800  
 agctacgatg gcgaggacaa gatcggctct tacgctgtgc tttctccgca ggctgtactc 1860  
 aagagtgaaa aattatcttg catccacct ctcgctgaac aagtcatagt gataacacac 1920  
 tctggccgaa aagggcgta tgccgtggaa ccataccatg gtaaagtagt ggtgccagag 1980  
 ggacatgcaa taccgctcca ggactttcaa gctctgagtg aaagtgccac cattgtgtac 2040  
 aacgaacgtg agttcgtaaa caggtacctg caccatattg ccacacatgg aggagcgtg 2100  
 aacactgatg aagaatatta caaaactgtc aagcccagcg agcacgacgg cgaatacctg 2160  
 tacgacatcg acaggaaaca gtgctcaag aaagaactag tcaactgggct agggctcaca 2220  
 ggcgagctgg tggatcctcc cttccatgaa ttgcctacg agagtctgag aacacgacca 2280  
 gccgctcctt accaagtacc aaccataggg gtgtatggcg tgccaggatc aggcaagtct 2340  
 ggcatcatta aaagcgcagt caccaaaaaa gatctagtgg tgagcgcaa gaaagaaaac 2400  
 tgtgcagaaa ttataagggc cgtcaagaaa atgaaagggc tggacgtcaa tgccagaact 2460  
 gtggactcag tgctcttgaa tggatgcaaa caccocgtag agaccctgta tattgacgaa 2520  
 gcttttgctt gtcatgcagg tactctcaga gcgctcatag ccattataag acctaaaaag 2580  
 gcagtgctct gcggggatcc caaacagtgc ggttttttta acatgatgtg cctgaaagtg 2640  
 cattttaacc acgagatttg cacacaagtc ttccacaaaa gcatctctcg ccgttgcaact 2700  
 aaatctgtga cttcggctgt ctcaaccttg tttacgaca aaaaaatgag aacgacgaat 2760

ccgaaagaga ctaagattgt gattgacact accggcagta ccaaacctaa gcaggacgat 2820  
 ctcatctca cttgtttcag aggggtgggtg aagcagttgc aaatagatta caaaggcaac 2880  
 gaaataatga cggcagctgc ctctcaaggg ctgacctgta aaggtgtgta tgccgttcgg 2940  
 tacaaggtga atgaaaatcc tctgtacgca cccacctctg aacatgtgaa cgtcctactg 3000  
 acccgcacgg aggaccgcat cgtgtggaaa aactagccg gcgacccatg gataaaaaca 3060  
 ctgactgcca agtaccctgg gaatttcact gccacgatag aggagtggca agcagagcat 3120  
 gatgccatca tgaggcacat cttggagaga ccggacccta ccgacgtctt ccagaataag 3180  
 gcaaacgtgt gttgggcca ggttttagtg ccggtgctga agaccgctgg catagacatg 3240  
 accactgaac aatggaacac tgtggattat tttgaaacgg acaaagctca ctcagcagag 3300  
 atagtattga accaactatg cgtgaggttc tttggactcg atctggactc cggctctat 3360  
 tctgcacca ctgttccggt atccattagg aataatcact gggataactc cccgtcgcct 3420  
 aacatgtacg ggctgaataa agaagtggtc cgtcagctct ctcgcaggta cccacaactg 3480  
 cctcgggcag ttgccactgg aagagtctat gacatgaaca ctggtacact gcgcaattat 3540  
 gatccgcgca taaacctagt acctgtaaac agaagactgc ctcatgcttt agtcctccac 3600  
 cataatgaac acccacagag tgacttttct tcattcgtca gcaaattgaa gggcagaact 3660  
 gtcttggtgg tcggggaaaa gttgtccgtc ccaggcaaaa tggttgactg gttgtcagac 3720  
 cggcctgagg ctaccttcag agctcggctg gatttaggca tcccagggtga tgtgcccaaa 3780  
 tatgacataa tatttgtaa tgtgaggacc ccatataaat accatcacta tcagcagtgt 3840  
 gaagaccatg ccattaagct tagcatggtt accaagaaag cttgtctgca tctgaatccc 3900  
 ggcggaacct gtgtcagcat aggttatggt tacgctgaca gggccagcga aagcatcatt 3960  
 ggtgctatag cgcggcagtt caagttttcc cgggtatgca aaccgaaatc ctcacttgaa 4020  
 gagacggaag ttctgtttgt attcattggg tacgatcgca aggcccgtag gcacaatcct 4080  
 tacaagcttt catcaacctt gaccaacatt tatacaggtt ccagactcca cgaagccgga 4140  
 tgtgcaccct catatcatgt ggtgcgaggg gatattgcca cggccaccga aggagtgatt 4200  
 ataaatgctg ctaacagcaa aggacaacct ggcggagggg tgtgcgagc gctgtataag 4260  
 aaattcccgg aaagcttcga tttacagccg atcgaagtag gaaaagcgcg actggtcaaa 4320  
 ggtgcagcta aacatatcat tcatgccgta ggaccaact tcaacaaagt ttcggaggtt 4380  
 gaaggtgaca aacagttggc agaggcttat gagtccatcg ctaagattgt caacgataac 4440  
 aattacaagt cagtagcgat tccactgttg tccaccggca tcttttccgg gaacaaagat 4500  
 cgactaacc aatcattgaa ccatttgctg acagctttag acaccactga tgcagatgta 4560  
 gccatatact gcagggacaa gaaatgggaa atgactctca aggaagcagt ggctaggaga 4620

## 048051

gaagcagtgg aggagatatg catatccgac gactcttcag tgacagaacc tgatgcagag 4680  
 ctggtgaggg tgcacccgaa gagttctttg gctggaagga agggctacag cacaagcgat 4740  
 ggcaaaactt tctcatattht ggaagggacc aagtttcacc aggcggccaa ggatatagca 4800  
 gaaattaatg ccatgtggcc cgttgcaacg gaggccaatg agcaggtatg catgtatatc 4860  
 ctcgagaaaa gcatgagcag tattaggtcg aaatgccccg tcgaagagtc ggaagcctcc 4920  
 acaccaccta gcacgctgcc ttgcttgtgc atccatgcca tgactccaga aagagtacag 4980  
 cgcctaaaag cctcacgtcc agaacaaatt actgtgtgct catcctttcc attgccgaag 5040  
 tatagaatca ctggtgtgca gaagatccaa tgctcccagc ctatatgttt ctaccgaaa 5100  
 gtgcctgcgt atattcatcc aaggaagtat ctcgtggaaa caccaccggt agacgagact 5160  
 ccggagccat cggcagagaa ccaatccaca gaggggacac ctgaacaacc accacttata 5220  
 accgaggatg agaccaggac tagaacgcct gagccgatca tcacggaaga ggaagaagag 5280  
 gatagcataa gtttgctgtc agatggcccc acccaccagg tgctgcaagt cgaggcagac 5340  
 attcacgggc cgcctctgt atctagctca tcttggcca ttctcatgc atccgacttt 5400  
 gatgtggaca gtttatccat acttgacacc ctggagggag ctagcgtgac cagcggggca 5460  
 acgtcagccg agactaactc ttacttcgca aagagtatgg agtttctggc gcgaccggtg 5520  
 cctgcgcctc gaacagtatt caggaacct ccacatcccg ctccgcgcac aagaacaccg 5580  
 tcacttgcac ccagcagggc ctgctcgaga accagcctag tttccacccc gccaggcgtg 5640  
 aatagggatg tcactagaga ggagctcgag gcgcttacc cgtcacgcac tctagcagg 5700  
 tcggtctcga gaaccagcct ggtctccaac ccgccaggcg taaatagggg gattacaaga 5760  
 gaggagttht aggcgttcgt agcacaacaa caatga 5796

<210> 44

<211> 2382

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 44

ggctcagtgg agacacctcg tggcttgata aaggttacca gctacgatgg cgaggacaag 60  
 atcggctctt acgctgtgct ttctccgcag gctgtactca agagtgaaaa attatcttgc 120  
 atccaccctc tcgctgaaca agtcatagtg ataacacact ctggccgaaa agggcgttat 180  
 gccgtggaac cataccatgg taaagtatgt gtgccagagg gacatgcaat acccgtccag 240  
 gactttcaag ctctgagtga aagtgccacc attgtgtaca acgaacgtga gttcgtaaac 300  
 aggtacctgc accatattgc cacacatgga ggagcgtgca aactgatga agaattattac 360

## 048051

aaaactgtca agcccagcga gcacgacggc gaatacctgt acgacatcga caggaaacag	420
tgcgtcaaga aagaactagt cactgggcta gggctcacag gcgagctggg ggatcctccc	480
ttccatgaat tcgcctacga gagtctgaga acacgaccag ccgctcctta ccaagtacca	540
accatagggg tgtatggcgt gccaggatca ggcaagtctg gcatcattaa aagcgcagtc	600
acaaaaaag atctagtggg gagcgcgaag aaagaaaact gtgcagaaat tataagggac	660
gtcaagaaaa tgaaagggct ggacgtcaat gccagaactg tggactcagt gctcttgaat	720
ggatgcaaac accccgtaga gaccctgtat attgacgaag cttttgcttg tcatgcaggt	780
actctcagag cgctcatagc cattataaga cctaaaaagg cagtgtcttg cggggatccc	840
aaacagtgcg gtttttttaa catgatgtgc ctgaaagtgc attttaacca cgagatttgc	900
acacaagtct tccacaaaag catctctcgc cgttgcaacta aatctgtgac ttcggtcgtc	960
tcaaccttgt tttacgacaa aaaaatgaga acgacgaatc cgaaagagac taagattgtg	1020
attgacacta ccggcagtac caaacctaag caggacgatc tcattctcac ttgtttcaga	1080
gggtgggtga agcagttgca aatagattac aaaggcaacg aaataatgac ggcagctgcc	1140
tctcaagggc tgacccgtaa aggtgtgtat gccgttcggt acaaggtgaa tgaaaatcct	1200
ctgtacgcac ccacctctga acatgtgaac gtctactga cccgcacgga ggaccgcatc	1260
gtgtggaaaa cactagccgg cgaccatgg ataaaaacac tgactgcaa gtaccctggg	1320
aatttcactg ccacgataga ggagtggcaa gcagagcatg atgccatcat gaggcacatc	1380
ttggagagac cggaccctac cgacgtcttc cagaataagg caaacgtgtg ttgggccaag	1440
gctttagtgc cgggtgctgaa gaccgctggc atagacatga cactgaaca atggaacact	1500
gtggattatt ttgaaacgga caaagctcac tcagcagaga tagtattgaa ccaactatgc	1560
gtgaggttct ttggactcga tctggaactcc ggtctatttt ctgcaccac tgttccgtta	1620
tccattagga ataactactg ggataactcc ccgtcgcta acatgtacgg gctgaataaa	1680
gaagtgggcc gtcagctctc tcgcaggtac ccacaactgc ctcgggcagt tgccactgga	1740
agagtctatg acatgaacac tggtagactg cgcaattatg atccgcgcat aaacctagta	1800
cctgtaaaaa gaagactgcc tcatgcttta gtctccacc ataataaaca cccacagagt	1860
gacttttctt cattcgtcag caaattgaag ggcagaactg tcctggtggg cggggaaaag	1920
ttgtccgtcc caggcaaaat ggttgactgg ttgtcagacc ggcctgaggc taccttcaga	1980
gctcggctgg atttaggcat cccaggtgat gtgccccaaat atgacataat atttgttaat	2040
gtgaggacce catataaata ccatcaactat cagcagtggtg aagaccatgc cattaagctt	2100
agcatgttga ccaagaaagc ttgtctgcat ctgaatcccg gcggaacctg tgtcagcata	2160
ggttatggtt acgctgacag ggccagcgaag agcatcattg gtgctatagc gcggcagttc	2220
aagttttccc gggatgcaa accgaaatcc tcacttgaag agacggaagt tctgtttgta	2280

## 048051

ttcattgggt acgatcgcaa ggcccgtacg cacaatcctt acaagctttc atcaaccttg 2340  
 accaacattt atacaggttc cagactccac gaagccggat gt 2382

<210> 45

<211> 1821

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
 полинуклеотид

<400> 45

tacatctttt cctccgacac cgggtcaaggg catttacaac aaaaatcagt aaggcaaacg 60  
 gtgctatccg aagtgggtgtt ggagaggacc gaattggaga tttcgtatgc cccgcgctc 120  
 gaccaagaaa aagaagaatt actacgcaag aaattacagt taaatcccac acctgctaac 180  
 agaagcagat accagtccag gaaggtggag aacatgaaag ccataacagc tagacgtatt 240  
 ctgcaaggcc tagggcatta tttgaaggca gaaggaaaag tggagtgcta ccgaaccctg 300  
 catcctgttc ctttgtattc atctagtgtg aaccgtgcct tttcaagccc caaggtcgca 360  
 gtggaagcct gtaacgccat gttgaaagag aactttccga ctgtggcttc ttactgtatt 420  
 attccagagt acgatgccta tttggacatg gttgacggag cttcatgctg cttagacact 480  
 gccagttttt gccctgcaaa gctgcgagc tttccaaaga aacactccta tttggaacct 540  
 acaatacgat cggcagtgcc ttcagcgatc cagaacacgc tccagaacgt cctggcagct 600  
 gccacaaaaa gaaattgcaa tgtcacgcaa atgagagaat tgcccgtatt ggattcggcg 660  
 gcctttaatg tggaatgctt caagaaatat gcgtgtaata atgaatattg ggaaacgttt 720  
 aaagaaaacc ccatcaggct tactgaagaa aacgtggtaa attacattac caaattaaaa 780  
 ggaccaaaaag ctgctgctct ttttgogaag acacataatt tgaatatggt gcaggacata 840  
 ccaatggaca ggtttgtaat ggacttaaag agagacgtga aagtgactcc aggaacaaaa 900  
 catactgaag aacggcccaa ggtacagggtg atccaggctg ccgatccgct agcaacagcg 960  
 tatctgtgcg gaatccaccg agagctgggt aggagattaa atgcggtcct gcttccgaac 1020  
 attcatacac tgtttgatat gtcggctgaa gactttgacg ctattatagc cgagcacttc 1080  
 cagcctgggg attgtgttct ggaaactgac atcgcgtcgt ttgataaaag tgaggacgac 1140  
 gccatggctc tgaccgcggt aatgattctg gaagacttag gtgtggacgc agagctggtg 1200  
 acgctgattg aggcggcttt cggcgaaatt tcatcaatac atttgcccac taaaactaaa 1260  
 tttaaattcg gagccatgat gaaatctgga atgttctca cactgtttgt gaacacagtc 1320  
 attaacattg taatcgcaag cagagtgttg agagaacggc taaccggatc accatgtgca 1380  
 gcattcattg gagatgacaa tatcgtgaaa ggagtcaaat cggacaaaatt aatggcagac 1440



## 048051

aggtgcgcca cctggttgaa tatggaagtc aagattatag atgctgtggt gggcgagaaa 1500  
 ggcgcttatt tctgtggagg gtttattttg tgtgactccg tgaccggcac agcgtgccgt 1560  
 gtggcagacc ccctaaaaag gctgtttaag cttggcaaac ctctggcagc agacgatgaa 1620  
 catgatgatg acaggagaag ggcattgcat gaagagtcaa cacgctggaa ccgagtgggt 1680  
 attctttcag agctgtgcaa ggcagtagaa tcaaggtatg aaaccgtagg aacttccatc 1740  
 atagttatgg ccatgactac tctagctagc agtggttaaat cattcagcta cctgagaggg 1800  
 gccctataa ctctctacgg c 1821

<210> 46

<211> 1671

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 46

gcaccctcat atcatgtggt gcgaggggat attgccacgg ccaccgaagg agtgattata 60  
 aatgctgcta acagcaaagg acaacctggc ggaggggtgt gcggagcgct gtataagaaa 120  
 ttcccggaaa gcttcgattt acagccgac gaagtaggaa aagcgcgact ggtcaaagg 180  
 gcagctaaac atatcattca tgccgtagga ccaaacttca acaaagtttc ggaggttgaa 240  
 ggtgacaaac agttggcaga ggcttatgag tccatcgcta agattgtcaa cgataacaat 300  
 tacaagttag tagcgattcc actggtgtcc accggcatct tttccgggaa caaagatcga 360  
 ctaacccaat cattgaacca tttgctgaca gctttagaca ccaactgatgc agatgtagcc 420  
 atatactgca gggacaagaa atgggaaatg actctcaagg aagcagtggc taggagagaa 480  
 gcagtggagg agatatgcat atccgacgac tcttcagtga cagaacctga tgcagagctg 540  
 gtgaggggtgc atccgaagag ttctttggct ggaaggaagg gctacagcac aagcgatggc 600  
 aaaactttct catatttgga agggaccaag ttccaccagg cggccaagga tatagcagaa 660  
 attaatgcca tgtggcccgt tgcaacggag gccaatgagc aggtatgcat gtatatcctc 720  
 ggagaaagca tgagcagtat taggtcgaaa tgccccgtcg aagagtcgga agcctccaca 780  
 ccacctagca cgctgccttg cttgtgcatc catgccatga ctccagaaag agtacagcgc 840  
 ctaaaagcct cacgtccaga acaaattact gtgtgctcat cctttccatt gccgaagtat 900  
 agaactactg gtgtgcagaa gatccaatgc tcccagccta tattgttctc accgaaagtg 960  
 cctgcgtata ttcattcaag gaagtatctc gtggaaacac caccggtaga cgagactccg 1020  
 gagccatcgg cagagaacca atccacagag gggacacctg aacaaccacc acttataacc 1080  
 gaggatgaga ccaggactag aacgcctgag ccgatcatca tcgaagagga agaagaggat 1140

## 048051

agcataagtt tgctgtcaga tggccccgacc caccaggtgc tgcaagtcga ggcagacatt 1200  
 cacggggccgc cctctgtatc tagctcatcc tgggtccattc ctcatgcatc cgactttgat 1260  
 gtggacagtt tatccatact tgacaccctg gagggagcta gcgtgaccag cggggcaacg 1320  
 tcagccgaga ctaactctta cttcgcaaag agtatggagt ttctggcgcg accggtgcct 1380  
 ggcgctcgaa cagtattcag gaaccctcca catcccgctc cgcgcacaaag aacaccgtca 1440  
 cttgcaccca gcagggcctg ctcgagaacc agcctagttt ccacccccgcc aggcgtgaat 1500  
 aggggtgatca ctagagagga gctcgaggcg cttaccccggt cacgcactcc tagcaggctcg 1560  
 gtctcgagaa ccagcctggt ctccaaccgc ccaggcgtaa atagggtgat tacaagagag 1620  
 gagtttgagg cgttcgtagc acaacaacaa tgacggtttg atgcgggtgc a 1671

<210> 47

<211> 1602

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 47

gagaaagttc acgttgacat cgaggaagac agcccattcc tcagagcttt gcagcggagc 60  
 ttcccgcagt ttgaggtaga agccaagcag gtcactgata atgaccatgc taatgccaga 120  
 gcgttttccgc atctggcttc aaaactgatc gaaacggagg tggacccatc cgacacgatc 180  
 cttgacattg gaagtgcgcc cgcccgcaga atgtattcta agcacaagta tcattgtatc 240  
 tgtccgatga gatgtgcgga agatccggac agattgtata agtatgcaac taagctgaag 300  
 aaaaactgta aggaaataac tgataaggaa ttggacaaga aatgaagga gctcgccgcc 360  
 gtcattgagcg accctgacct ggaaactgag actatgtgcc tccacgacga cgagtcgtgt 420  
 cgctacgaag ggcaagtcgc tgtttaccag gatgtatacg cggttgacgg accgacaagt 480  
 ctctatcacc aagccaataa gggaggtaga gtcgcctact ggataggctt tgacaccacc 540  
 ctttttatgt ttaagaactt ggctggagca tatccatcat actctaccaa ctgggcccgc 600  
 gaaaccgtgt taacggctcg taacataggc ctatgcagct ctgacgttat ggagcgggtca 660  
 cgtagagggga tgtccattct tagaaagaag tatttgaaac catccaacaa tgttctattc 720  
 tctgttggct cgaccatcta ccacgagaag agggacttac tgaggagctg gcacctgccg 780  
 tctgtatttc acttacgtgg caagcaaat tacacatgtc ggtgtgagac tatagttagt 840  
 tgcgacgggt acgtcgtaa aagaatagct atcagtcag gcctgtatgg gaagccttca 900  
 ggctatgctg ctacgatgca ccgagaggga ttcttgtgct gcaaagtgac agacacattg 960  
 aacggggaga gggctctttt tcccgtgtgc acgtatgtgc cagctacatt gtgtgaccaa 1020

## 048051

atgactggca tactggcaac agatgtcagt gcggacgacg cgcaaaaact gctgggtggg 1080  
 ctcaaccagc gtatagtcgt caacgggtcgc acccagagaa acaccaatac catgaaaaat 1140  
 taccttttgc ccgtagtggc ccaggcattt gctaggtggg caaaggaata taaggaagat 1200  
 caagaagatg aaaggccact aggactacga gatagacagt tagtcatggg gtgttgttgg 1260  
 gcttttagaa ggcacaagat aacatctatt tataagcgcc cggataccca aaccatcatc 1320  
 aaagtgaaca gcgatttcca ctcatctgtg ctgccagga taggcagtaa cacattggag 1380  
 atcgggctga gaacaagaat caggaaaatg ttagaggagc acaaggagcc gtcacctctc 1440  
 attacgcccg aggacgtaca agaagctaag tgcgcagccg atgaggctaa ggagggtcgt 1500  
 gaagccgagg agttgcgcgc agctctacca cctttggcag ctgatgttga ggagccact 1560  
 ctggaagccg atgtcgactt gatgttaca gaggctgggg cc 1602

<210> 48

<211> 798

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 48

atgattgaac aggatggcct gcatgcgggg agcccggcag cgtgggtgga acgtctgttt 60  
 ggctatgatt gggcgcagca gaccattggc tgctctgatg cggcgggtgtt tcgtctgagc 120  
 gcgcaggggc gtccgggtgct gtttgtgaaa accgatctga gcggtgcgct gaacgagctg 180  
 caggatgaag cggcgcgtct gagctggctg gccaccaccg gtgttccgtg tgcggcgggtg 240  
 ctggatgtgg tgaccgaagc gggccgtgat tggctgctgc tgggcgaagt gccgggtcag 300  
 gatctgctgt ctagccatct ggcgcggca gaaaaagtga gcattatggc ggatgccatg 360  
 cgtcgtctgc ataccctgga cccggcgacc tgtccgtttg atcatcaggc gaaacatcgt 420  
 attgaacgtg cgcgtacccg tatggaagcg ggcctgggtg atcaggatga tctggatgaa 480  
 gaacatcagg gcttggcacc ggcagagctg tttgcgcgct tgaaagcgag catgccggat 540  
 ggcgaagatc tgggtggtgac ccatggtgat gcgtgcctgc cgaacattat ggtggaaaaat 600  
 ggccgtttta gcggctttat tgattgcggc cgtctgggcg tggcggatcg ttatcaggat 660  
 attgcgctgg ccaccctgga tattgcggaa gaactgggcg gcgaatgggc ggatcgtttt 720  
 ctggtgctgt atggcattgc ggcaccggat agccagcgta ttgcgtttta tcgtctgctg 780  
 gatgaatfff tctaataa 798

<210> 49

<211> 192

048051

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 49  
 gtgассааас аггаааааас сгсссттаас атггсcccгсг тtатсagaаg ссаgасатта 60  
 асгсттсгг агааастсаа сgаgсгггас гсггатгаас агссаgасат сггггаатсг 120  
 сттсасгасс асгсггатга гстттассгс агсгссгсг сгсгттсгг тgатгасггт 180  
 гаааасстсг га 192

<210> 50  
 <211> 44  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный олигонуклеотид

<400> 50  
 атаggсггсг саггаgаgаа гсссаgасса аттасстасс сааа 44

<210> 51  
 <211> 117  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 51  
 атасасгас аатггсааg сггсттасат агаастсгсг гсггатггса тgссгсттта 60  
 ааатттттат тттатттсгсг тттсгсгсг сгаатсгггг тттгттттта ататтсгсг 117

<210> 52  
 <211> 845  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 52  
 ссаттгсатата сгттггггсг ататсатата атггггггсг атггггггсг атггггггсг 60  
 тtасггггсг гттгггггсг аттаттггггсг агггггггсг агггггггсг тасггггггсг 120  
 тtagттсатата гсссататата гgагггггсг ггггггггсг тtасггггггсг тggсггггсг 180  
 ггггггггсг ссаасггггсг сгггггггсг асггггггсг тgасггггггсг тсггггггсг 240

048051

acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac 300  
 ttggcagtac atcaagtgta tcatatgccca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggc 360  
 aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag 420  
 tacatctacg tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat 480  
 gggcgtggat agcgggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat 540  
 gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc 600  
 ccattgacgc aaatgggscgg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctctc 660  
 cctatcagtg atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgagc tcgttttagtg 720  
 aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccgg 780  
 gaccgatcca gcctccgscgg ccgggaacgg tgcattggaa cgcggattcc ccgtgccaa 840  
 agtga 845

<210> 53  
 <211> 227  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полинуклеотид

<400> 53  
 ctgtgccttc tagttgccag ccactctgttg tttgccctc ccccgctcct tccttgacc 60  
 tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120  
 tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180  
 gggaagacaa tagcaggcat gctgggggatg cgggtgggctc tatggcc 227

<210> 54  
 <211> 76  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный полипептид

<400> 54

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu  
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp  
 20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys  
 35 40 45

048051

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu  
50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val  
65 70 75

<210> 55  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Unknown

<220>  
<223> Описание неизвестного:  
"KDEL" мотив пептида

<400> 55  
Lys Asp Glu Leu  
1

<210> 56  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
пептид

<400> 56  
His His Ala Ala  
1

<210> 57  
<211> 5  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
пептид

<400> 57  
Arg Lys Ser Tyr Leu  
1 5

<210> 58  
<211> 4  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный  
пептид

<400> 58  
Arg Lys Ser Tyr

1

<210> 59  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтезированный пептид

<400> 59  
 Arg Glu Lys Arg  
 1

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий последовательности эпитопов:  
 MKDKQDEEQRTRMMRTKMRMRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1);  
 EEAEDNCRMMRTK (SEQ ID NO: 2);  
 VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5) и  
 FCGDENILV (SEQ ID NO: 6).
2. Полипептид по п.1, дополнительно содержащий N-концевую лидерную последовательность, содержащую:  
 MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 8);  
 MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTL  
 HLVLRRLRGV (SEQ ID NO: 54) или  
 MGQKEQIHTLQKNSERMASKQLTRSSQAV (SEQ ID NO: 29).
3. Полипептид по п.1 или 2, в котором последовательности эпитопа соединены друг с другом посредством линкерной последовательности.
4. Полипептид по п.3, где линкерная последовательность выбрана из AAY, RR, DPP, NHAA (SEQ ID NO: 56), HNA, NHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL и REKR (SEQ ID NO: 59).
5. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где полипептид содержит:  
 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;  
 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или  
 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.
6. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.
7. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому из пп.1-6.
8. Полинуклеотид по п.7, где полинуклеотид содержит:  
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 17;  
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 19;  
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 26 или  
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27.
9. Полинуклеотид по п.7 или 8, где полинуклеотид содержит  
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 26 или  
 последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27.
10. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.7-9.
11. Вектор по п.10, где вектор выбран из аденовирусного вектора, альфа-вирусного вектора, вектора на основе поксвируса, аденоассоциированного вирусного вектора, ретровирусного вектора, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинации.
12. Вектор по п.10 или 11, где вектор представляет собой вектор MVA, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 31.
13. Вектор по п.10 или 11, где вектор представляет собой вектор GAd20, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 31.
14. Вектор по п.10 или 11, где вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид SEQ ID NO: 12.
15. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-6, полинуклеотид по любому из пп.7-9 или вектор по любому из пп.10-14.

16. Способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления начала клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта, индуцирования иммунного ответа у субъекта, несущего мутацию экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, лечения или предотвращения миелопролиферативного заболевания у субъекта, лечения рака у субъекта или лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п.15.

17. Способ лечения, предотвращения, снижения риска возникновения или замедления начала клинического состояния, характеризующегося экспрессией мутанта экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, у субъекта, индуцирования иммунного ответа у субъекта, несущего мутацию экзона 9 JAK2V617F и/или CALR, лечения или предотвращения миелопролиферативного заболевания у субъекта, лечения рака у субъекта или лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий:

эпитоп CALR SEQ ID NO: 1;

эпитоп CALR SEQ ID NO: 2;

эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 5; и

эпитоп JAK2 SEQ ID NO: 6,

причем введение включает одно или более введений композиции.

18. Способ по п.16 или 17, где миелопролиферативное заболевание выбрано из первичного миелофиброза (MPN), истинной полицитемии (PV), эссенциальной тромбоцитемии (ET), первичного миелофиброза (PFM), вторичного миелофиброза, острого миелолейкоза (AML), вторичного AML, хронического миелогенного лейкоза (CML), клонального гемопоэза неопределенного потенциала (CHIP) и хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

19. Способ по п.16 или 17, где рак выбран из рака легкого, лимфоидного рака, острого лимфолейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, плазмноклеточной миеломы, рака желчевыводящих путей, рака мочевого пузыря, рака печени, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак кожи, рака щитовидной железы, рака желудка, рака толстой кишки, рака толстой кишки, рака мочевыводящих путей, рака центральной нервной системы, нейробластомы, рака почки, рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичек и рака мягких тканей.

20. Способ по п.16 или 17, где сердечно-сосудистое заболевание выбрано из острого коронарного синдрома, ишемического цереброваскулярного заболевания, ишемической болезни сердца, тромбоза, венозной тромбоземболии, тромбоза глубоких вен, легочной эмболии, критических внутрибрюшных тромбозов, периферической артериальной болезни, гипертонии, сердечной недостаточности, мерцательной аритмии, ишемической болезни сердца, атеросклероза и клонального кроветворения.

21. Способ по любому из пп.17-20, где вектор выбран из аденовирусного вектора, альфа-вирусного вектора, вектора на основе поксвируса, аденоассоциированного вирусного вектора, ретровирусного вектора, самореплицирующейся молекулы РНК и их комбинации.

22. Способ по любому из пп.17-21, где вектор представляет собой вектор Ad26.

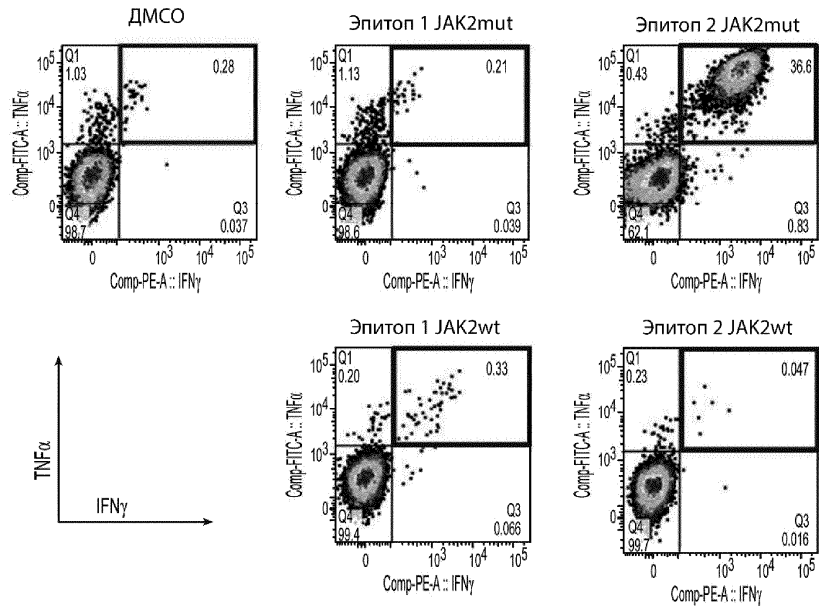
23. Способ по любому из пп.17-21, где вектор представляет собой вектор GAd20.

24. Способ по любому из пп.17-21, где вектор представляет собой вектор MVA.

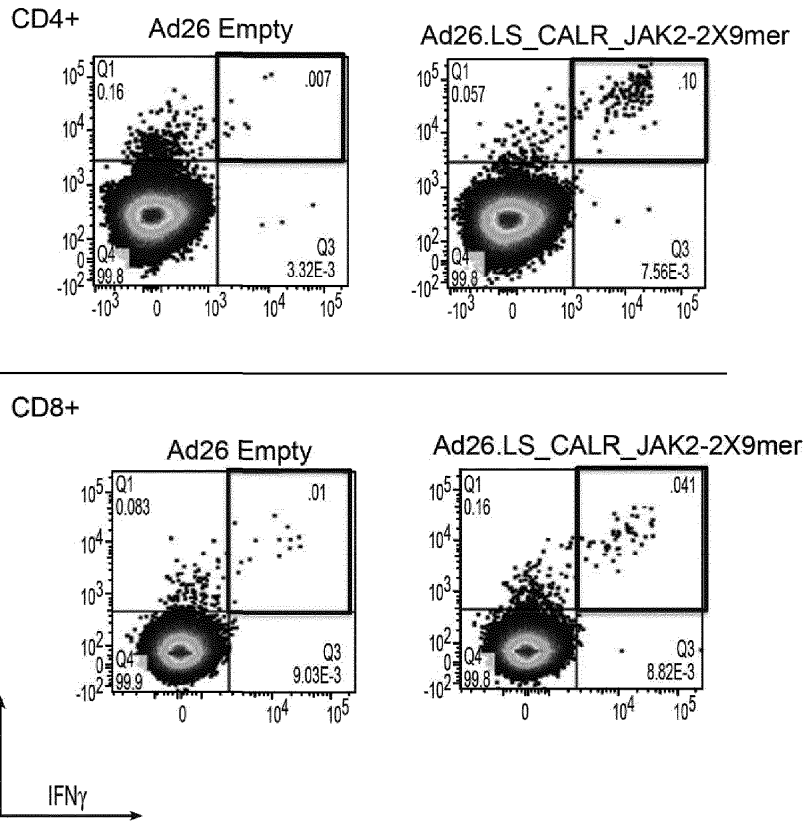
25. Способ по любому из пп.17-21, где вектор представляет собой самореплицирующуюся молекулу РНК.

26. Способ по любому из пп.16-25, дополнительно включающий введение второго терапевтического средства, выбранного из антитела к CTLA-4, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, агониста TLR, агониста CD40, агониста OX40, гидроксимочевины, руксолитиниба, федратиниба, агониста 41BB, агониста CD28, лиганда FLT3, сульфата алюминия, ингибитора ВТК, ингибитора JAK, антитела к CD38, ингибитора CDK, антитела к CD33, антитела к CD37, антитела к CD25, ингибитора GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-7, IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , антитела к VEGF, антитела к CD70, антитела к CD27, антитела к BCMA, антитела к GPRC5D или их комбинаций.

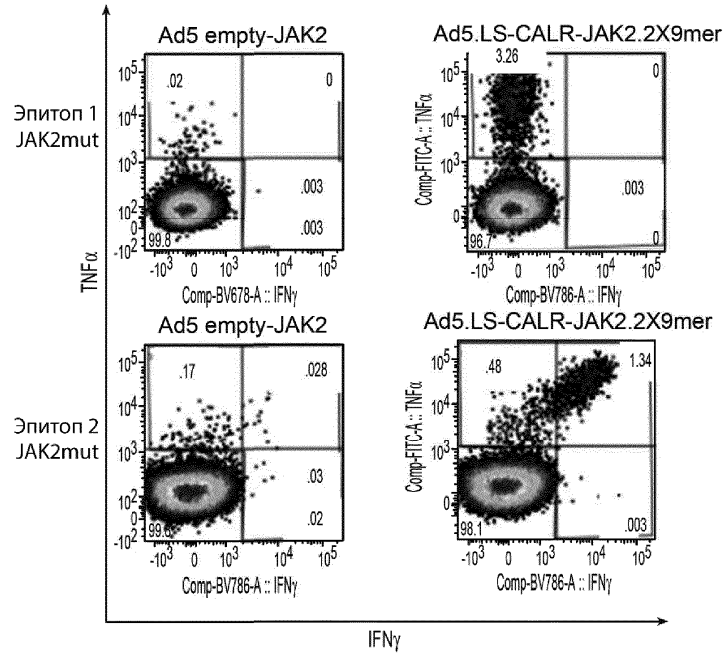




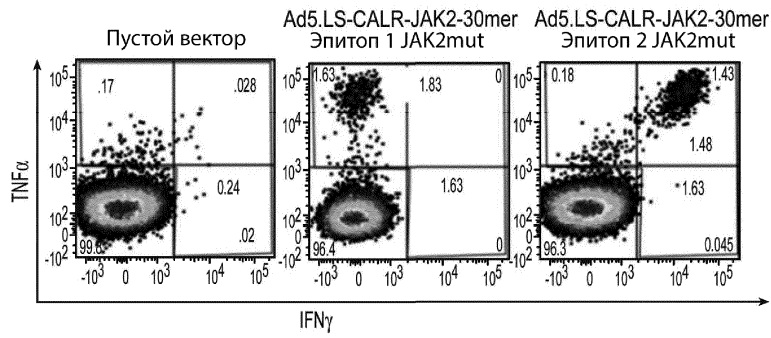
Фиг. 1



Фиг. 2

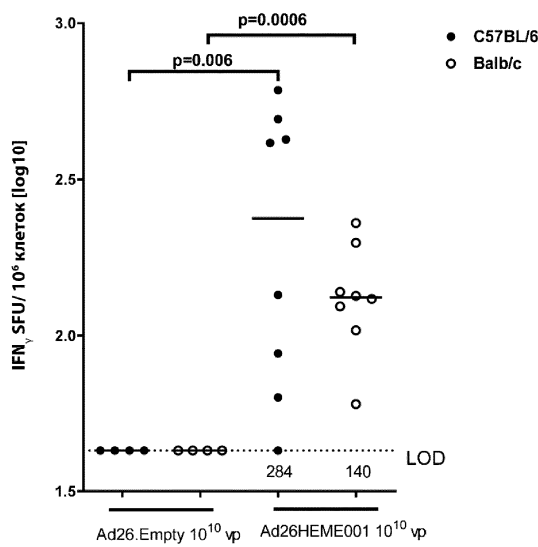


Фиг. 3



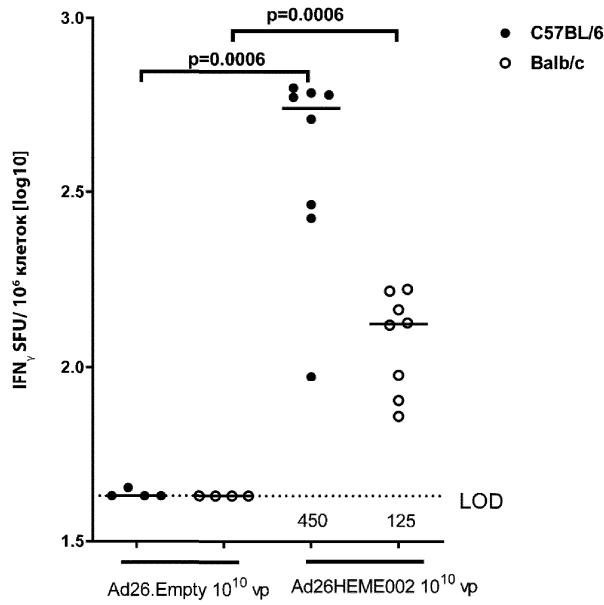
Фиг. 4

Совокупность пептидов НЕМЕ001



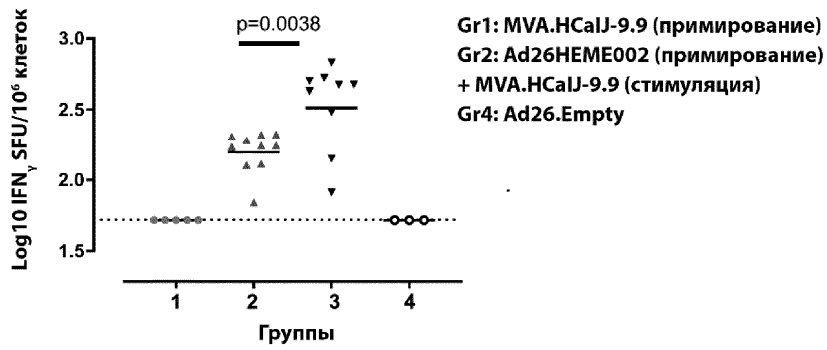
Фиг. 5

Совокупность пептидов НЕМЕ002



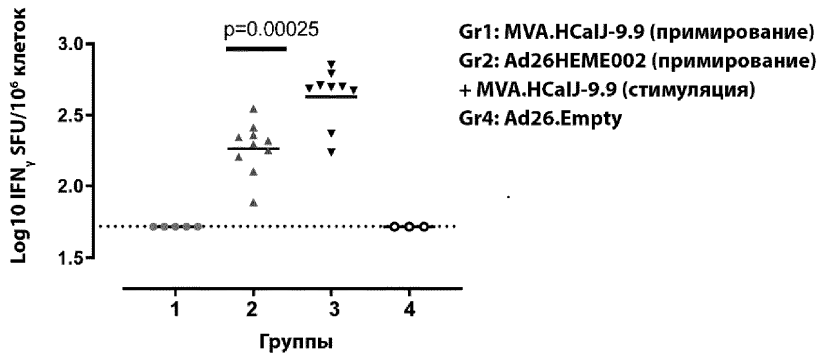
Фиг. 6

Совокупность НЕМЕ002

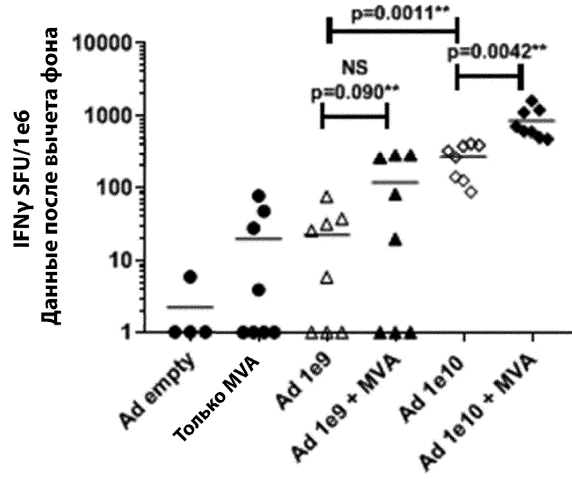


Фиг. 7

Совокупность CaIR

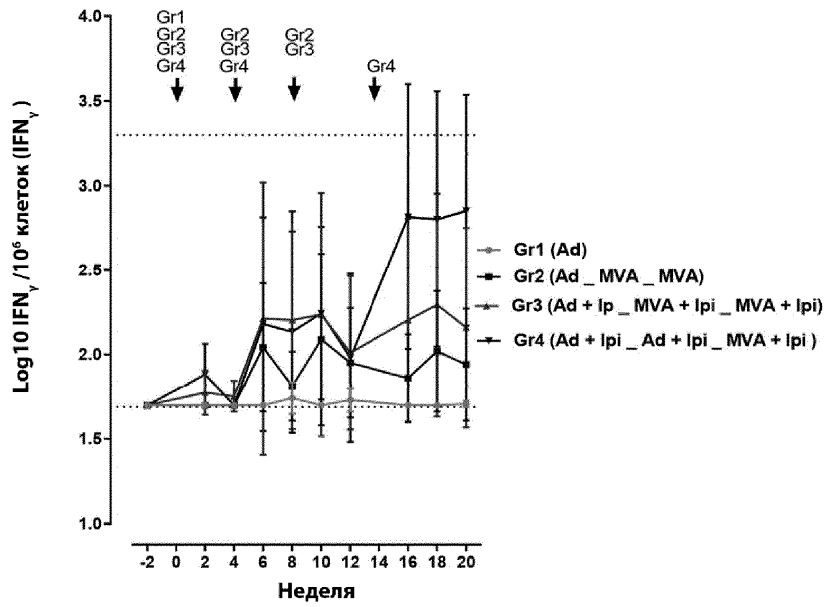


Фиг. 8

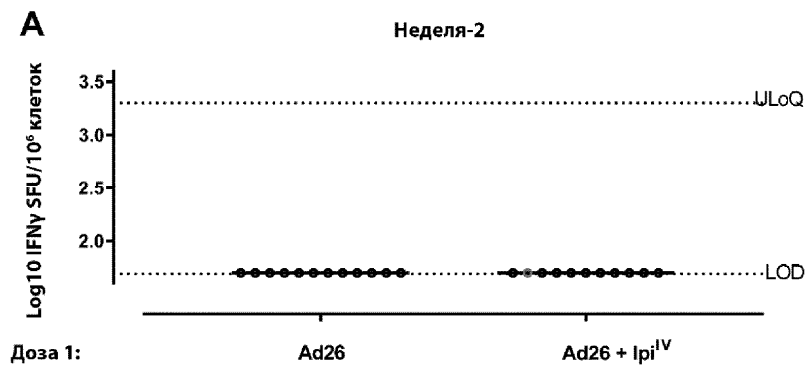


Фиг. 9

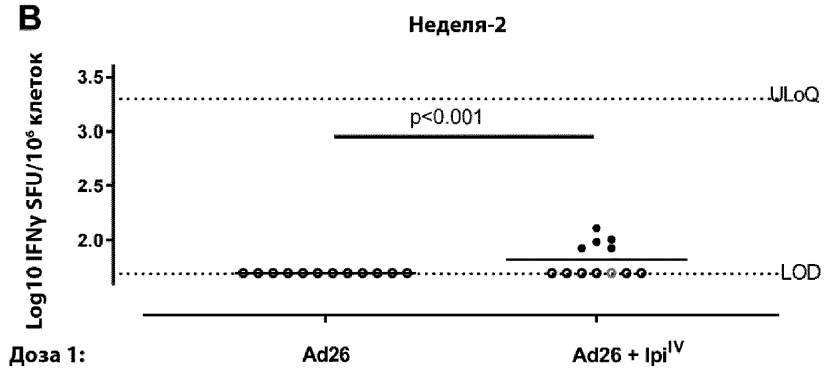
Совокупность пептидов НЕМЕ002



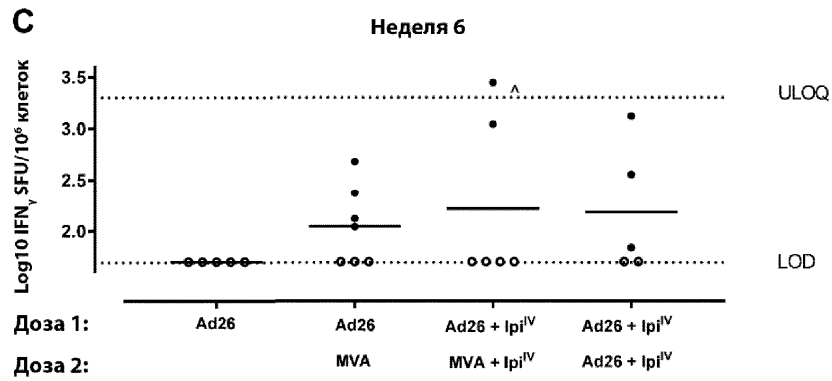
Фиг. 10



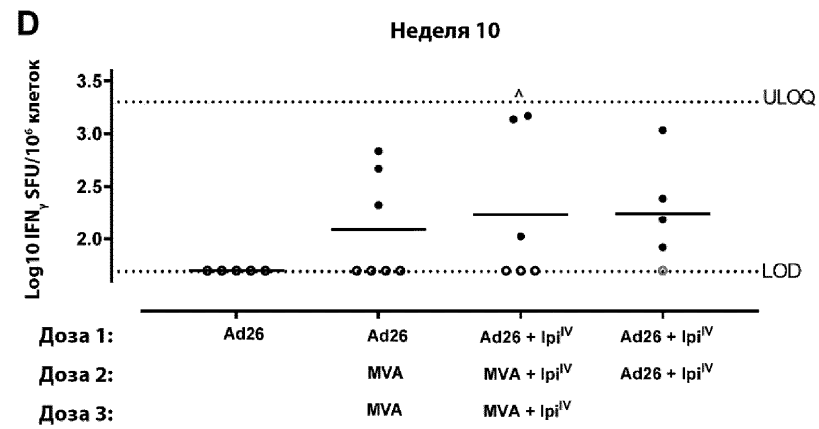
Фиг. 11



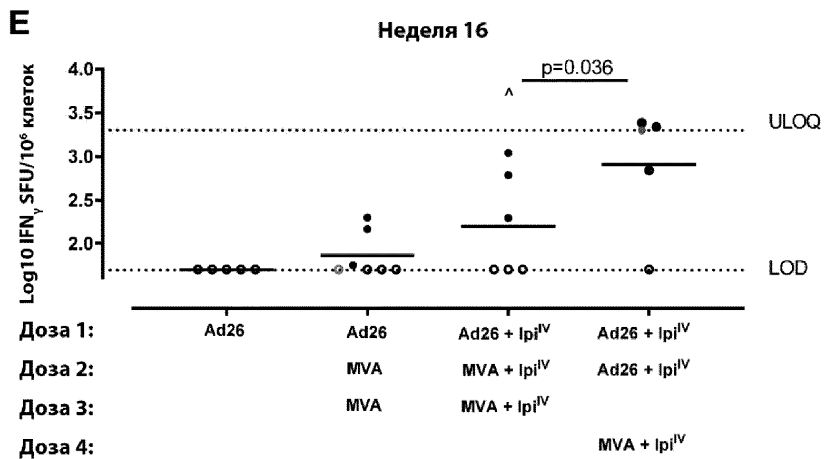
Фиг. 12



Фиг. 13



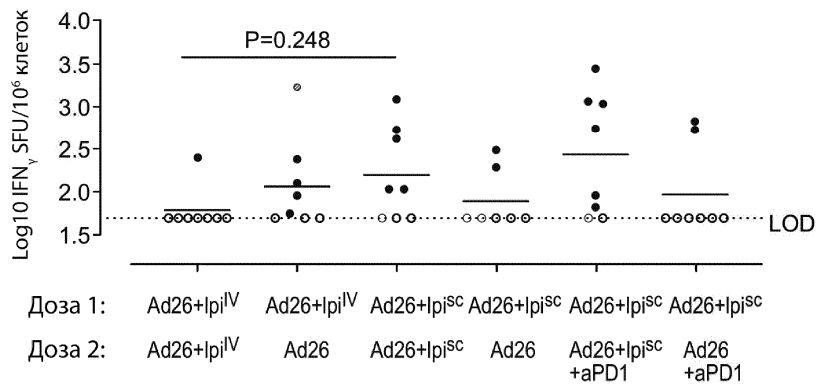
Фиг. 14



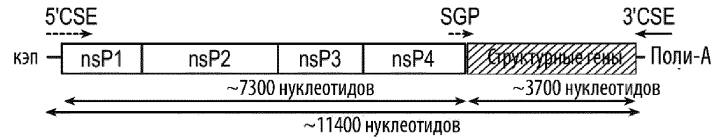
Фиг. 15



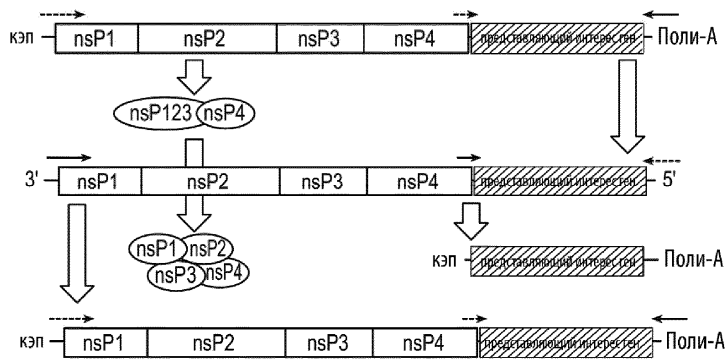
Фиг. 16



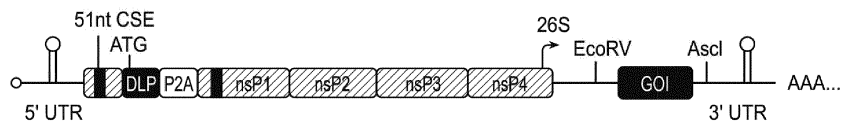
Фиг. 17



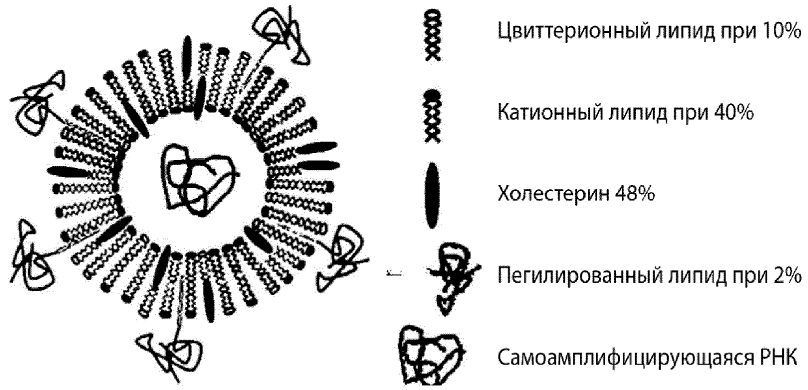
Фиг. 18А



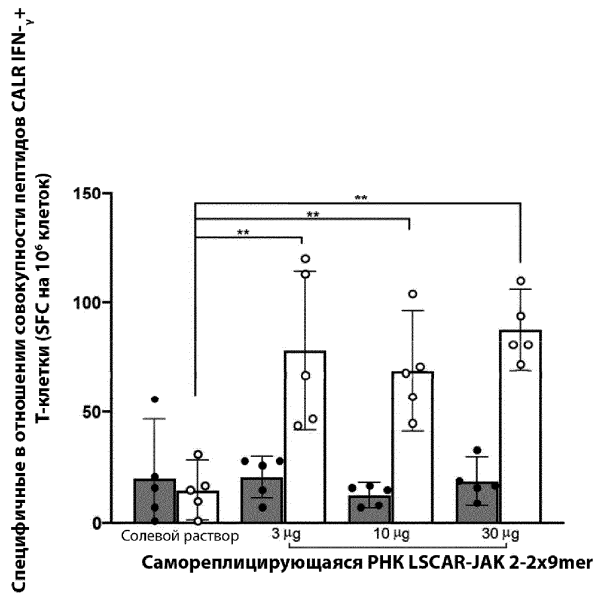
Фиг. 18В



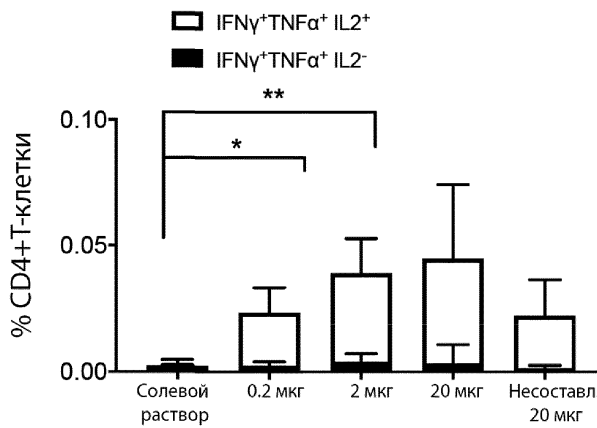
Фиг. 19



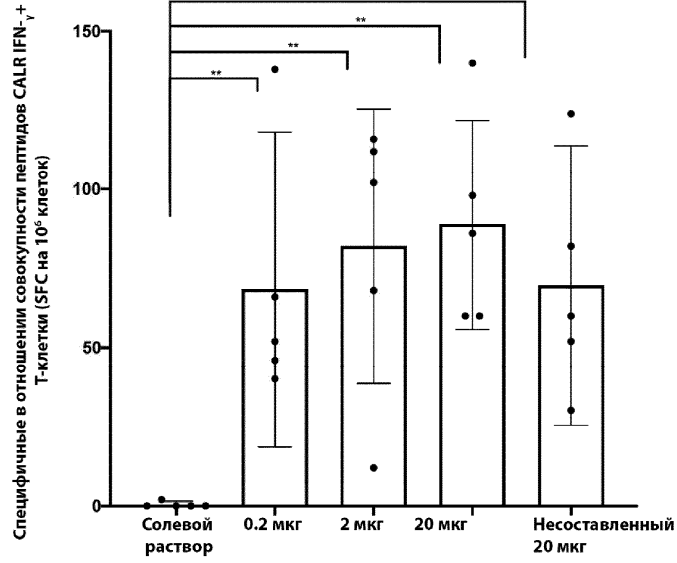
Фиг. 20



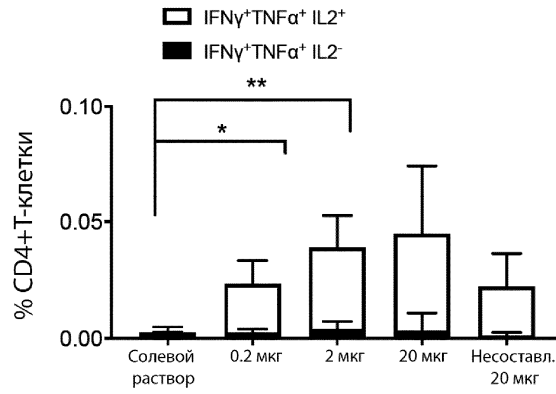
Фиг. 21А



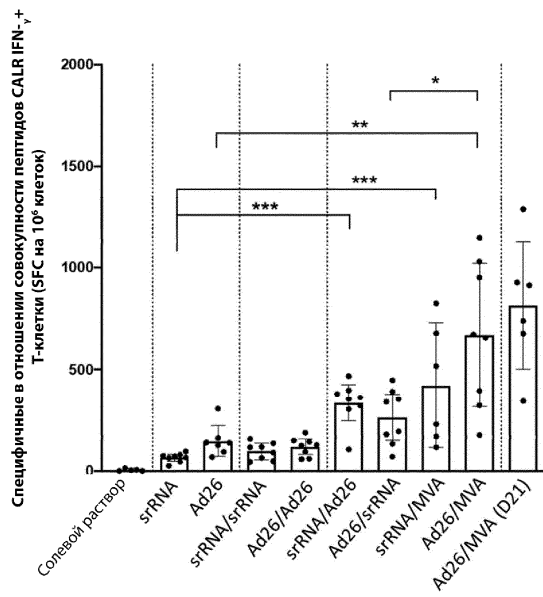
Фиг. 21В



Фиг. 22А

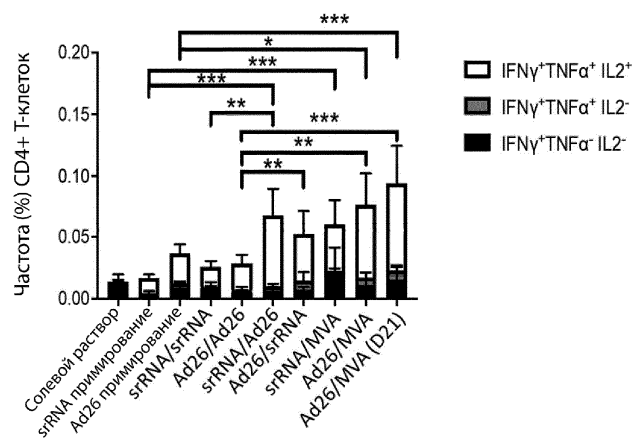


Фиг. 22В



Фиг. 23А





Фиг. 23В

